



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANA PAULA DO AMARAL MÔNACO FOGANHOLI

**HOSPEDABILIDADE DE *Meloidogyne paranaensis* EM
PLANTAS MEDICINAIS, COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Mentha pulegium* E EFEITO DO
PARASITISMO DE *M. paranaensis* SOBRE AS
SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS EM *M. pulegium***

ANA PAULA DO AMARAL MÔNACO FOGANHOLI

**HOSPEDABILIDADE DE *Meloidogyne paranaensis* EM
PLANTAS MEDICINAIS, COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Mentha pulegium* E EFEITO DO
PARASITISMO DE *M. paranaensis* SOBRE AS
SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS EM *M. pulegium***

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Agronomia, da Universidade
Estadual de Londrina.

Orientadora: Profa. Dra. Débora Cristina
Santiago

Londrina
2012

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

F655h Foganholi, Ana Paula do Amaral Mônico.
Hospedabilidade de *Meloidogyne paranaensis* em plantas medicinais,
composição química do óleo essencial de *Mentha pulegium* e efeito do
parasitismo de *M. paranaensis* sobre as substâncias fenólicas em *M.*
pulegium / Ana Paula do Amaral Mônico Foganholi. – Londrina, 2012.
120 f.

Orientador: Débora Cristina Santiago

Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina,
Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia,
2012.

1. Nematoda em plantas – Teses. 2. *Meloidogyne* – Teses. 3. Plantas –
Parasito – Teses. 4. Plantas medicinais. 5. *Mentha pulegium* – Teses. – I.
Santiago, Débora Cristino. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de
Ciências Agrárias. Programa Pós – Programa de Pós-Graduação em
Agronomia. III. Título.

CDU 631.467.2

ANA PAULA DO AMARAL MÔNACO FOGANHOLI

**HOSPEDABILIDADE DE *Meloidogyne paranaensis* EM PLANTAS
MEDICINAIS, COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Mentha pulegium E EFEITO DO PARASITISMO DE *M. paranaensis*
SOBRE AS SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS EM *M. pulegium***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Agronomia, da Universidade Estadual de
Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Profa Dra Débora Cristina Santiago
UEL – Londrina – PR

Profa Dra Alaíde Aparecida Kryzanowski
IAPAR Londrina –PR

Profa Dra Maria Isabel Balbi Peña
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Luiz Henrique Ilkiu Vidal
UEL – Londrina –PR

Prof. Dr. José Carlos Vieira de Almeida
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Seiji Igarashi (suplente)
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. José Roberto Pinto de Souza
(suplente)
UEL – Londrina – PR

Prof. Dra. Débora Cristina Santiago
Orientadora
UEL – Londrina – PR

Londrina, 23 de fevereiro de 2012.

À minha irmã Carla Ariane do Amaral (*in
memoriam*) a quem eu amo tanto, pela
proteção e amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, pela minha vida, minha saúde, força, proteção e tudo de bom que recebi na minha vida.

Agradeço a minha orientadora Dra Débora Cristina Santiago pelo apoio, conhecimento passado e, principalmente, pela amizade durante esses anos.

Ao Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) pela estrutura para execução dos experimentos, pelos ensinamentos e apoio dos funcionários em especial: ao Dr. Rui Gomes Carneiro, Clarice Correia André, Eugênio Brandet, João Osvaldo Maria, Alexandra Scherer, Braz da Silva e José Carlos Gomes.

À Universidade Estadual de Londrina (UEL) pela oportunidade de realizar o curso de mestrado e doutorado, pelo aprendizado e compreensão de professores e colegas, pela estrutura, pelos serviços prestados por funcionários, em especial pelas professoras Terezinha de J. Faria e Juliana F. de S. Daniel, aos colegas Jurandir P. Pinto, Juliane Orives, Flávia Ferreira, Silvieli Aline dos S. Rocha, Matheus Goveia, Fernando César Baida e Sandy Cristina Rieger e todos que de forma direta e indiretamente estiveram presentes durante o curso.

Aos meus familiares que sempre me apoiaram. Ao meu pai Edson Paulo Mônaco e minha mãe Maria Castorina do Amaral, que me deram não somente a vida, mas principalmente a minha educação e condições de estudo.

Ao meu marido, por sua paciência, pelo amor, por sempre estar disposto a me ajudar em qualquer situação e principalmente pelo apoio que me conforta e me deixa mais forte para superar meus desafios.

FOGANHOLI, Ana Paula do A. M. **Hospedabilidade de *Meloidogyne paranaensis* em plantas medicinais, composição química do óleo essencial de *Mentha pulegium* e efeito do parasitismo de *M. paranaensis* sobre as substâncias fenólicas em *M. pulegium*.** 2012. 120 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

RESUMO

Considerando o valor das plantas medicinais, não apenas como recurso terapêutico, mas também como fonte de recursos econômicos, e a importância dos nematoides de galhas radiculares, a presente Tese foi desenvolvida originando três trabalhos. O primeiro teve como objetivo avaliar o comportamento de 14 espécies de plantas medicinais frente ao parasitismo de *Meloidogyne paranaensis* em casa-de-vegetação. As plântulas medicinais foram inoculadas com suspensão de 5000 ovos e juvenis de segundo estágio (J_2) de *M. paranaensis* e mantidas em vasos por 60 dias. Após esse período, foi avaliada a multiplicação dos nematoides nas raízes através da contagem de ovos e J_2 nos sistemas radiculares, e estimativa dos fatores de reprodução (FR). Comportaram-se como suscetíveis a *M. paranaensis* as plantas: *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare*, *Plectranthus barbatus*, *Solanum esculentum* e *Mentha pulegium*; como resistentes *Taraxacum officinale*, *Matricaria recutita*, *Melissa officinalis*, *Hyssopus officinalis*, *Lippia alba*, *Kalanchoe pinnata* e *Sedum praealtum*; como imunes *Artemisia dracunculoides* e *Petiveria alliacea*. O segundo trabalho foi desenvolvido com o objetivo de comparar o teor e a composição do óleo essencial de *Mentha pulegium* em diferentes estágios de desenvolvimento, em condições controladas, utilizando análises por Cromatografia gasosa (CG) e cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG / EM). A hidrodestilação de folhas frescas de *M. pulegium* coletadas aos 60, 70 e 85 dias após o transplante (DAT) apresentaram rendimento do óleo essencial de 0,17%, 0,23% e 0,17%, respectivamente. As análises de CG e CG / EM revelaram diferenças qualitativas e variação na proporção dos componentes do óleo. O mentofurano (0,21%; 0,33%), mirtenal (1,2%; 5,49%) e metil éter coahuilensol (1,2%, 1,08%) foram detectados apenas nas amostras coletadas aos 60 e 70 DAT. As concentrações dos principais compostos variaram nos três estágios de cultivo da planta. A concentração do pulegona aumentou de 26,65% nas amostras das duas primeiras coletas para 31,05% na amostra da terceira coleta. A piperitenona (36,32%) foi o componente principal da última coleta. Todas as amostras de óleo essencial obtidas nos três estágios distintos de *M. pulegium*, também, mostraram atividade antimicrobiana contra *Cladosporium herbarum*, apresentando três áreas de inibição do fungo com valores de $R_f = 0,80$; 0,85 e 0,90. Já o terceiro trabalho teve como objetivo avaliar o perfil de substâncias fenólicas presentes nos extratos metanólicos das folhas de *M. pulegium* parasitadas e não pelo nematoide *M. paranaensis*, assim como o efeito *in vitro* dos extratos sobre juvenis deste nematoide. Para o experimento foram utilizados os níveis de inoculo de *M. paranaensis*: zero e 10000 ovos + J_2 /mL e 30 repetições. Para o nível de inoculo zero, foram colocados em cada plântula 10 mL de água e no tratamento com nematoide foram aplicados 10 mL de uma suspensão contendo 1000 ovos + J_2 /mL de *M. paranaensis* por plântula. As plântulas foram mantidas por 30, 45 e 60 dias em casa-de-vegetação. Após esse período, foram realizadas a extração e contagem de ovos e J_2 dos sistemas radiculares e os FRs

foram estimados. Foi verificado que a reprodução do nematoide aumentou de acordo com o desenvolvimento das plantas de *M. pulegium*, com FRs de 0,061; 0,685; 2,324, respectivamente, em cada data de coleta. Amostras em triplicatas das folhas de *M. pulegium*, inoculadas e não inoculadas com *M. paranaensis*, foram secas e moídas, em seguida foram obtidos seus extratos com metanol à temperatura ambiente. Os extratos metanólicos foram fracionados em coluna de sílica utilizando os solventes diclorometano e metanol. As frações eluídas com metanol foram analisadas por CLAE-DAD. A partir da comparação com padrões de compostos fenólicos, foram identificados: ácido ferulico, (-)-epicatequina, ácido caféico e ácido fumárico nos extratos obtidos de plantas sem e com parasitismo. Porém, não foi verificada nenhuma diferença quanto ao perfil de substâncias fenólicas entre as plantas parasitadas e não pelo *M. paranaensis*, indicando que nas plantas de poejo estudadas nesse experimento, o parasitismo de *M. paranaensis* não alterou o perfil das substâncias fenólicas. Com relação ao efeito nematicida dos extratos, foi observada ação inibitória 'in vitro' do extrato de poejo sobre a eclosão de juvenis de *M. paranaensis*, assim como efeito sobre a mortalidade dos J₂.

Palavras-chave: Nematoides das galhas. CG / EM. Poejo. Perfil químico. Nematicida.

FOGANHOLI, Ana Paula do A. M. **Hospedability of *Meloidogyne paranaensis* in medicinal plants, chemical composition of the essential oil of *Mentha pulegium* and effect of parasitism of *M. paranaensis* on phenolic substances in *M. pulegium*.** 2012. 120f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

ABSTRACT

Considering the value of medicinal plants, not only as a therapeutic resource, but also as a source of economic resources and the importance of root knot nematodes, this thesis has been developed resulting in three pieces. The first one was to evaluate the behavior of 14 species of medicinal plants against the parasitism of the nematode *Meloidogyne paranaensis* and was divided into three experiments, conducted in greenhouse. Seedlings were medical inoculated with a suspension of 5000 eggs and second stage juveniles (J₂) of *M. paranaensis* and kept in pots for 60 days. After this period, it was evaluated the multiplication of the nematodes in the roots by counting of eggs and J₂ in root systems, and estimation of the reproduction factors (RF). They behaved as susceptible to *M. paranaensis* plants: *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare*, *Plectranthus barbatus*, *Solanum esculentum* and *Mentha pulegium*; as resistant: *Taraxacum officinale*, *Matricaria recutita*, *Melissa officinalis*, *Hyssopus officinalis*, *Lippia alba*, *Kalanchoe pinnata* and *Sedum praealtum*; *Artemisia dracunculus* and *Petiveria alliacea* as immune. The second study was conducted with the aimed to compare the oil content and composition from leaves obtained in different stages of development in controlled conditions, using GC and GC/MS analysis. Hydrodistillation of fresh leaves of *Mentha pulegium* collected in the three different periods of cultivate (60, 70 and 85 days) afforded the oil essential in 0,17%; 0,23% e 0,17% yield, respectively. The GC and GC/MS analyses revealed qualitative differences and a variation in the proportions of the oil components. The menthofuran (0.21%; 0.33%), myrtenal (1.2%; 5.49%), coahuilensol methyl ether (1.2%, 1.08%) were detected in only sample of the first and second developmental stages (60 and 70 DAT). The concentrations of the compounds varied across the three main stages of the crop. The concentration of the pulegone was increased from 26.65% in the early stages to 31.05% in climaterio stage, however, piperitenone (36.32%) was the main compound in this last stage. All samples of essential oil obtained in the three distinct stages of *M. pulegium* showed antimicrobial activity against *Cladosporium herbarum*, featuring three areas of inhibition of the fungus with values of f = 0.80, 0.85 and 0.90. The third study was to evaluate phenolic substances profile present in metanoic extracts of *M. pulegium* leaves parasited and not by *Meloidogyne paranaensis*, so as the effect of extracts over juvenile eclosion, mobility and mortality of these nematodes *in vitro*. For the experiment was adopted the entirely experimental design using casualised inoculo levels of *M. paranaensis*: zero and 10000 eggs + J₂/mL and 30 repetitions. For the inoculum level zero, it was placed in each seedlings 10 mL of water and treatment with nematode were applied 10 mL suspension containing 1000 eggs + J₂/mL of *M. paranaensis* by seedlings. The seedlings were maintained for 30, 45 and 60 days in greenhouse. After this period, took place egg count and extraction and root systems and J₂ reproduction factors (RF) were estimated. It was verified that the reproduction of the nematode increased according to the development of plants of *M. pulegium*, with 0.061 RFs;

0.685; 2.324 respectively in each pickup date. Samples in triplicates from the leaves of *M. pulegium*, inoculated and non-inoculated with *M. paranaensis*, were dried and ground, then were obtained their statements with methanol at ambient temperature. The extracts were fractionated in methanolic silica column using dichloromethane and methanol solvent. The eluted fractions with methanol were reviewed by HPLC-DAD to assess the effect of parasitism of *M. paranaensis* on the phenolic substances profile extract. From the comparison with standards of phenolic compounds, ferulic acid, have been identified: (-)-epicatechin, caffeic acid and fumaric acid in extracts obtained from plants without and with parasitism. However, there was no difference as to the profile verified of phenolic substances among plants that are parasitized and not by *M. paranaensis*, indicating that plants of pennyroyal studied in this experiment the parasitism of *M. paranaensis* did not alter the profile of phenolic substances. In relation to the purpose, of extracts was observed nematicide action in vitro inhibitory of pennyroyal extract on the outbreak of juvenile *M. paranaensis*, as well as some effect on the mortality of J₂.

Key-words: Root-knot nematodes. CG / MS. Pennyroyal. Chemical profile. Nematicide.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 NEMATOIDES	16
2.1.1 Gênero <i>Meloidogyne</i>	17
2.1.2 <i>Meloidogyne Paranaensis</i>	18
2.1.3 Reação de Diferentes Plantas Medicinais a Espécies de <i>Meloidogyne</i>	19
2.2 PLANTAS MEDICINAIS	23
2.2.1 Histórico.....	24
2.2.2 Biodiversidade Brasileira	25
2.2.3 Importância	26
2.2.4 Cultivo.....	27
2.2.5 Generalidades sobre o Gênero <i>Mentha</i> L. (Lamiaceae).....	28
2.2.6 A Espécie <i>Mentha pulegium</i>	31
2.2.7 Óleos Voláteis.....	32
2.2.8 Fatores que Afetam a Produção de Óleos Essenciais (Época de Colheita)	33
2.2.9 Composição Química do Óleo Essencial de <i>Mentha pulegium</i>	35
2.2.10 Atividade Antifúngica do Óleo Essencial de <i>M. pulegium</i> L.....	41
2.2.11 <i>Cladosporium herbarum</i>	42
2.2.11.1 Podridão de <i>Cladosporium</i>	43
2.2.12 Efeito de Extratos de Plantas sobre <i>Meloidogyne</i> spp	44
3 COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA A – HOSPEDABILIDADE DE PLANTAS MEDICINAIS A <i>Meloidogyne paranaensis</i>	50
4 ARTIGO B – COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Mentha pulegium</i> L. EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO	61

4.1 RESUMO E ABSTRACT	62
4.2 INTRODUÇÃO	63
4.3 MATERIAL E MÉTODOS	64
4.3.1 Cultivo de <i>Mentha Pulegium</i>	64
4.3.2 Coleta do Material Vegetal.....	65
4.3.3 Extração do Óleo Essencial.....	65
4.3.4 Análise do Óleo Essencial por Cromatografia Gasosa e por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de massas.....	65
4.3.5 Bioensaio	66
4.3.5.1 Preparação do isolado de <i>Cladosporium herbarum</i>	66
4.3.5.2 Ensaio de Bioautografia em cromatografia em camada delgada (CCD)	67
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
4.4.1 Composição Química do Óleo Essencial.....	67
4.4.2 Atividade contra <i>Cladosporium Herbarum</i>	70
4.5 CONCLUSÕES	71
4.6 REFERÊNCIAS.....	71
5 ARTIGO C – EFEITO DO PARASITISMO DE <i>Meloidogyne paranaensis</i> SOBRE O PERFIL DE SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS PRESENTES EM EXTRATOS DE FOLHAS DE <i>Mentha pulegium</i> E DESTES SOBRE JUVENIS DE <i>M. paranaensis</i>	76
5.1 RESUMO E ABSTRACT	76
5.2 INTRODUÇÃO	77
5.3 MATERIAL E MÉTODOS	80
5.3.1 Efeito do parasitismo de <i>Meloidogyne paranaensis</i> sobre o perfil de substâncias fenólicas nos extratos das folhas de <i>Mentha pulegium</i> empregando HPLC-DAD	80
5.3.2 Efeito de extratos de folhas de <i>M. pulegium</i> sobre juvenis de <i>M. paranaensis</i>	84
5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
5.5 CONCLUSÕES	92
5.6 REFERÊNCIAS.....	98

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
REFERÊNCIAS	98
ANEXO	115
ANEXO A – Normas Revista Nematologia Brasileira	116

1 INTRODUÇÃO

O Brasil conta com 22% de toda a biodiversidade vegetal do mundo, o que faz da nossa flora nativa uma das mais ricas fontes de substâncias com potencial farmacológico (CARVALHO, 2009).

A utilização de plantas medicinais e a fitoterapia estão em expansão em todo o mundo. Estima-se que do total de medicamentos consumidos hoje, cerca de 40% são de origem natural. Os fitoterápicos movimentam anualmente cerca de 22 bilhões de dólares, com um crescimento de 12% ao ano. No Brasil, este segmento responde por cerca de 7% do mercado farmacêutico, ou seja, 400 milhões de dólares por ano, gerando cerca de 100 mil empregos diretos e indiretos (BOLZANI, 2005).

Segundo Verlet (1992), as plantas medicinais são de grande importância, pois algumas fornecem óleos voláteis e estão presentes no cotidiano das pessoas. Estas plantas, ou as substâncias voláteis delas extraídas, têm sido usadas como flavorizantes, aromatizantes e terapêuticos nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética. Pesquisas indicam aumento regular no mercado de produtos naturais, apresentando a média anual de crescimento estimada em 22% nos setores industriais de perfumaria, aromatizantes para produtos alimentícios, assim como em setores de processamento de óleos essenciais.

Os países em desenvolvimento têm sido a principal fonte de óleos brutos, devido à existência de políticas de incentivo para a diversificação da produção e, também, para o incremento do volume de exportações e a redução das importações. Dados relativos à década de 90 demonstram que a produção mundial chegou a 45.000 t anuais, o que representa 700 milhões de dólares. Deste total, 35% são provenientes de espécies cultivadas. Estima-se que a produção brasileira de óleos essenciais corresponda a 13,15% da produção mundial, em toneladas, sendo responsável por cerca de 45 milhões de dólares anuais (VERLET, 1993).

Segundo Kimati et al. (2005), dentre as várias plantas aromáticas cultivadas no Brasil, as do gênero *Mentha* situam-se em posição de destaque. O óleo essencial proveniente destas plantas pode ser empregado nos mais variados ramos da indústria de alimentos, cosméticos, farmacêutica, de higiene e do tabaco.

Muitos pesquisadores, instituições ambientalistas e outros afins vêm enfatizando a necessidade de cultivo das espécies medicinais de forma equilibrada

levando-se em consideração todos os fatores genéticos, ecológicos e fisiológicos envolvidos na obtenção e manutenção da qualidade. Em se tratando de plantas medicinais há grande necessidade de se primar pela qualidade, uma vez que as quantidades de compostos ativos presentes nestas são relativamente pequenas, além de que o material a ser utilizado como medicamento deve ser isento de resíduos e ter boas condições sanitárias (ANDRADE; CASALI, 1999). Portanto, o levantamento de todos esses fatores permite o manejo mais equilibrado do ambiente da planta para que transmute sua energia e matéria à síntese de substâncias importantes no ambiente e sua utilização pelo ser humano (BROWN JÚNIOR, 1988). Tais conhecimentos auxiliam e são determinantes na adequação de estratégias de cultivo para cada espécie.

As plantas medicinais devem ser cultivadas em locais e épocas ideais ao seu desenvolvimento e produção econômicas. Em países com tradição de cultivo de plantas medicinais, têm-se optado pelo conceito de buscar o zoneamento mais adequado a cada espécie (ANDRADE; CASALI, 1999).

Ribeiro e Diniz (2008), descrevem os fatores de produção em abióticos (físicos e químicos) e bióticos (biológicos). Abióticos, como fatores sobre os quais não há qualquer possibilidade de interferência humana, exceto em termos de modificações do microclima local e fatores bióticos constituídos por insetos, vermes e microorganismos que normalmente interagem com as plantas, podendo parasitá-las, prejudicando-lhes a fotossíntese e/ou a síntese de produtos secundários. Compõem os fatores bióticos, ainda, plantas infestantes (ervas daninhas) que concorrem com as plantas medicinais em absorção de água e nutrientes.

Segundo Correa Júnior, Ming e Scheffer (1991) as plantas medicinais podem ser atacadas por pragas, doenças e nematoides parasitas de plantas, os quais comprometem qualitativa e quantitativamente as propriedades curativas e a produção.

Os nematoides estão amplamente distribuídos no solo, e suas comunidades, compostas por várias espécies, completam grupos maiores que são os parasitas de plantas. Na agricultura são importantes pelos níveis de danos que provocam e, também, devido ao desconhecimento por parte de técnicos e agricultores de sua presença nas áreas de cultivo (FERRAZ; SANTOS, 1995).

Dentre os gêneros de nematoides, o destaque é para *Meloidogyne* spp. que caracteriza os formadores de galhas (MOURA, 1996). Encontram-se

amplamente distribuídos em lavouras no Brasil, causando grandes perdas para os produtores e para a economia do país (CAMPOS, 1997). Dentre os nematoides de galhas é de grande importância, no Paraná, a espécie *Meloidogyne paranaensis* (CARNEIRO et al., 1996b), principalmente devido à distribuição geográfica e pela severidade dos danos causados nas diferentes culturas.

Cesnik (1957); Gaskin (1958); Costa Manso et al., (1985); Goswami e Vijayalakshwi (1986); Haseeb e Pandey (1987); Izquierdo, Huepp e Chacon (1987); Patel et al., (1989); Moura, Régis e Moura (1990); Mesquita, Souza e Mattos (1993); Araujo, Mattos e Souza (1994); Macedo Filho, Mattos e Souza (1994); Souza, Mattos e Karl (1995); Maciel e Ferraz (1996); Karl et al., (1997); Dias et al., (1998); Prodócimo e Lozano (1998); Souza, Campos e Maximiniano (1998); Park, Kim e Khan (2004); Moreira, Santos e Almeida (2008); Couto, Campos e Gomes (2008); e Mônico et al. (2008) estudaram a hospedabilidade de diferentes espécies de plantas medicinais ao nematoide do gênero *Meloidogyne*. Entretanto, há poucos relatos sobre a hospedabilidade destes vegetais a *M. paranaensis*.

Considerando o valor das plantas medicinais, não apenas como recurso terapêutico, mas também como fonte de recursos econômicos, torna-se importante ter conhecimento da reação destas aos nematoides, uma vez que estas podem hospedar e aumentar as populações desse parasita no solo, bem como terem afetadas suas características medicinais em decorrência do parasitismo.

Portanto, o presente estudo teve por objetivos avaliar a reação de 14 espécies de plantas medicinais ao nematoide *Meloidogyne paranaensis*; verificar a variação da composição química do óleo essencial, ao longo do ciclo de desenvolvimento, de *Mentha pulegium*; analisar a atividade do óleo contra o fungo *Cladosporium herbarum* em teste de autobiografia em placas cromatográficas de gel de sílica; estudar o efeito do parasitismo de *M. paranaensis* no perfil químico de substâncias fenólicas presentes nos extratos metanólicos das folhas de *M. pulegium* e determinar o efeito dos extratos apolares sobre a eclosão, mobilidade e mortalidade de juvenis de *M. paranaensis*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 NEMATOIDES

Os nematoides são organismos tipicamente vermiformes e não segmentados, ocorrem nos mais variados habitats, e muitas espécies vivem no solo e parasitam plantas. Entre os parasitas de plantas, a maioria possui dimensões diminutas e não são visíveis a olho nu. Seu deslocamento no solo é bastante limitado, não ultrapassando a centímetros, tendo no escoamento da água de chuva ou de irrigação, e conseqüente transporte de terra, o principal meio de disseminação; também a ação do homem é importante na disseminação através do transporte de mudas e uso de implementos agrícolas contaminados. Essa dificuldade de locomoção própria faz que a ocorrência dos nematoides se faça, inicialmente, em reboleiras (RITZINGER; COSTA, 2004).

A monocultura e a elevada densidade de plantas em áreas infestadas levam a altas populações de nematoides no solo, com grande potencial de inóculo nas áreas cultivadas, criando condições favoráveis para severos danos às lavouras. Os parasitas nativos e os introduzidos constituirão o patossistema, preservando todo o seu potencial de agressividade (REBELO, 1998).

Segundo Kerry (1987), o controle dos nematoides parasitas de plantas tem no uso de cultivares resistentes, na rotação de culturas e no controle químico as medidas mais recomendadas. Entretanto, para qualquer desses métodos existem inconvenientes. Considerado como o método ideal de controle, o emprego de plantas resistentes nem sempre é possível, pois depende de disponibilidade de variedades que combinem características de resistência com qualidades agrônômicas desejáveis. Também a rotação de culturas é, muitas vezes, de difícil utilização pela inviabilidade econômica das culturas recomendadas, embora algumas possam ser empregadas como adubo verde. Já o controle químico não convém, muitas vezes, pela baixa eficiência e pelos efeitos adversos decorrentes de seu uso, como intoxicação de seres humanos e animais, desequilíbrio na biologia do solo, contaminação do lençol freático e por deixar, em determinadas circunstâncias, resíduos tóxicos nos produtos agrícolas (THOMASON, 1987; MATTOS et al., 2007).

2.1.1 Gênero *Meloidogyne*

O gênero *Meloidogyne* Göeldi 1887, Família Heteroderidae, compreende as espécies conhecidas por “nematoides formadores de galhas”, considerados os mais importantes para a agricultura mundial por sua ampla distribuição geográfica e alta capacidade destrutiva causando perdas de mais de US\$100 bilhões por ano (SASSER; FREKMAN, 1987; EISENBACK; TRIANTAPHYLLOU, 1991; CAMPOS, 1997).

Os prejuízos causados no agronegócio brasileiro por nematoides vai muito além das perdas diretas, já que seu controle é realizado, atualmente, por rotação de culturas menos rentáveis e, principalmente, pelo uso de nematicidas que oneram significativamente a produção (CARNEIRO, ALMEIDA; QUÉNÉHÉRVÉ, 2000).

Todas as espécies de *Meloidogyne* apresentam o mesmo ciclo de vida, entretanto a diferenciação sexual, reprodução e fecundidade, por exemplo, são afetados por fatores ambientais e pela espécie vegetal à qual o nematoide se associa (MOURA, 1996). Com o desenvolvimento embrionário no interior do ovo há a formação do juvenil de primeiro estágio (J_1); este, ao sofrer uma troca de cutícula, origina o juvenil de 2º estágio (J_2), que eclode do ovo e migra para o solo em busca de raízes de planta hospedeira. Após penetrar nas raízes e estabelecer sítio permanente de alimentação no parênquima vascular ou tecidos vasculares, denominados células gigantes, o nematoide sofre mais três ecdises e torna-se adulto sedentário. A fase adulta é marcada por acentuado dimorfismo sexual, sendo os machos vermiformes e as fêmeas piriformes (EISENBACK; TRIANTAPHYLLOU, 1991).

A duração do ciclo biológico é influenciada por fatores como temperatura, umidade, tipo de solo, práticas culturais e planta hospedeira. De modo geral, o ciclo completa-se em três a quatro semanas (BERGAMIN FILHO, KIMATI; AMORIN, 1995; TIHOHOD, 2000).

Para a maioria dos nematoides, a faixa de temperatura ótima vai de 15 a 30°C (GONÇALVES; SILVAROLLA, 2001). Segundo Taylor e Sasser (1978) a faixa ideal para *M. arenaria*, *M. incognita* e *M. javanica* é de 25 a 30°C, enquanto para *M. hapla* vai de 15 a 25°C.

A temperatura pode influenciar a distribuição geográfica, a

embriogênese, o desenvolvimento, a eclosão, a mobilidade, além de influenciar também o crescimento do hospedeiro, produzindo modificações morfológicas e fisiológicas (GONÇALVES; SILVAROLLA, 2001).

Conhecer as espécies de nematoides presentes nas áreas de cultivo é imprescindível para que as medidas de controle sejam efetivas (MOURA, 1996). No Brasil, as espécies do gênero *Meloidogyne* principalmente *M. javanica* (Treub) Chitwood, *M. incognita* (Kofoid e White) Chitwood, *M. arenaria* (Neal) Chitwood, *M. hapla* (Chitwood), *M. exigua* (Göeldi) e *M. coffeicola* (Lordello) são responsáveis por limitação substancial na produtividade de várias culturas como café, algodão, cana-de-açúcar, soja, hortaliças, frutíferas e olerícolas (CARNEIRO et al. 1996; CARNEIRO, ALMEIDA; QUÉNÉHERVÉ, 2000; TIHOHOD, 2000).

Outras espécies de nematoides de galhas vêm apresentando importância crescente no país nos últimos anos. A espécie *M. paranaensis* têm causado prejuízos à cultura do cafeeiro nos Estados de São Paulo e Paraná por vários anos consecutivos (CARNEIRO et al., 1996b). *Meloidogyne mayaguensis* também vem causando danos severos em plantios comerciais de goiabeira (*Psidium guajava*). Os primeiros registros desta espécie no país foram em Petrolina (PE), Curaçá e Maniçoba (BA) por Carneiro et al., (2001). *Meloidogyne ethiopica* Whitehead teve sua ocorrência detectada por Carneiro et al. (2003) em quivi (*Actinida deliciosa*) na Serra Gaúcha, cuja introdução do patógeno no país se deu, muito provavelmente, com mudas de quivi importadas do Chile no final dos anos 80.

2.1.2 *Meloidogyne Paranaensis*

A espécie formadora de galhas *M. paranaensis*, que se reproduz por partenogênese mitótica, foi inicialmente detectada em plantas de café no Estado do Paraná. Esta espécie era previamente identificada como *M. incognita* (KOFROID; WHITE) Chitwood, e por cerca de duas décadas foi considerada apenas uma variante de *M. incognita* expressando alta virulência ao cafeeiro (CARNEIRO et al., 1996b).

A sua disseminação é ampla nos Estados do Paraná e São Paulo, onde causa grandes prejuízos e chegando a tornar inviável a atividade cafeeira (GONÇALVES; SILVAROLLA, 2007). Em Minas Gerais, principal pólo cafeeiro do país, há relatos de sua ocorrência nos municípios de Patrocínio e Serra do Salitre na

região do Alto Paranaíba (CASTRO, LIMA; CARNEIRO, 2003) e Piumhi no sul do Estado (CASTRO et al., 2008). Silva, Oliveira e Zambolim (2009) relataram a primeira ocorrência dessa espécie no estado de Goiás parasitando o cafeeiro ('Catuaí 99'). Além destes quatro estados brasileiros, *M. paranaensis* já foi detectado na Guatemala e nos Estados Unidos (Havaí) (CARNEIRO et al., 2004).

A hospedabilidade e reprodução de *M. paranaensis* foram relatadas em *Ilex paraguariensis* L. (erva-mate) (SANTIAGO et al., 2000), cultivares de *Glycine max* L. Merrill (soja) (CASTRO, LIMA; CARNEIRO, 2003; ROESE, OLIVEIRA; LANES, 2004), cultivares de *Avena strigosa* Schreb. (aveia preta) e *Avena sativa* L. (aveia branca) (MORITZ, SIMÃO; CARNEIRO, 2003a; CARNEIRO et al., 2006a), cultivares de *Zea mays* L. (milho) (MORITZ, SIMÃO; CARNEIRO, 2003b; CARNEIRO et al., 2007), diferentes espécies de plantas daninhas (ROESE; OLIVEIRA, 2004; MÔNACO et al., 2008), *Manihot esculenta* L. (mandioca) (CARNEIRO et al., 2006b), diferentes espécies de gramíneas (CARNEIRO et al., 2006c), híbridos de sorgo e cultivares de milheto (CARNEIRO et al., 2007), e de *Triticum aestivum* L. (trigo) (SCHERER et al., 2006).

2.1.3 Reação de Diferentes Plantas Medicinais a Espécies de *Meloidogyne* spp.

Cesnik (1957), no Brasil, descreveu os sintomas da meloidogynose causada por *M. javanica* em plantas de *Tropaeolum majus*. As plantas desenvolvidas em vasos mostraram sinais de definhamento, com folhas menores que o normal. Galhas radiculares e massas de ovos externas foram observadas sem dificuldade. Em certos casos, as galhas ocorreram acompanhadas de fendilhamento das raízes.

Gaskin (1958), nos Estados Unidos, incluiu *Achillea millefolium* entre as plantas resistentes a uma população mista de *M. incognita* e a subespécie *M. incognita* var. *acrita*, em casa-de-vegetação, por não ter conseguido extrair fêmeas de suas raízes.

Costa Manso, Mattos e Tenente (1985), após verificarem frequente ocorrência de casos de meloidogynose em plantas medicinais cultivadas comercialmente no Distrito Federal, avaliaram as reações de 23 espécies à infestação de *M. javanica* em casa-de-vegetação. *Matricaria chamomilla* L., *Plantago major* L. e *Portulaca oleracea* L. foram altamente suscetíveis, enquanto *Allium* sp., *A. ascalonicum* L., *Cymbopogon citratus* D.C., *Phytolacca dodecandra*, *Jatropha* sp.,

Eleutherine plicata Urb. e *Spilanthes acmella* Murr. foram classificadas como imunes.

Lordello, Lordello e Donalisto (1986) verificaram alta suscetibilidade do *Pilocarpus microphyllus* a *M. incognita* raça 1, exigindo a adoção de medidas preventivas de controle, especialmente o uso de terra isenta desses nematoides na produção dessas mudas.

A incidência de nematoides de galhas, também, foi constatada em plantas medicinais e aromáticas por Haseeb e Pandey (1987) na Índia, que identificaram 22 novos hospedeiros de *M. incognita* e 21 de *M. javanica*.

Izquierdo, Huepp e Chacon (1987), coletaram 15 espécies de plantas nos cafezais de propriedades rurais de La Mandarina e de El Chorro, com o objetivo de determinar se plantas da Estação Central de Investigação de Café e Cacau em Santiago de Cuba eram hospedeiras dos nematoides de galhas. Constataram a presença de fêmeas de *Meloidogyne* sp. nas raízes das plantas medicinais *Portulaca oleracea* e *Mimosa pudica*.

Moura, Régis e Moura (1990) verificaram as reações de 10 espécies de plantas, dentre elas quatro medicinais, aos nematoides *M. incognita* raça 1 e *M. javanica*. *Mentha crispera*, *Vetiveria zizanioides* e *Chenopodium ambrosioides* foram imunes às duas espécies de nematoides, enquanto *Coleus amboinicus* (hortelã-da-folha-larga) foi imune apenas a *M. javanica*.

Em relato realizado por Mesquita et al. (1993), as espécies *Melissa officinalis* e *Galinsoga parviflora* foram qualificadas como altamente suscetíveis, *Eupatorium maximiliani*, *Chenopodium quinoa* e *Talinum triangulare* como suscetíveis, *Cymbopogon citratus* como moderadamente resistente, *Pothomorphe peltata* e *Pfaffia glomerata* como resistentes, *Lippia gemminata* como altamente resistente e *Bryophyllum calycinum*, *Gomphrena globosa*, *Mentha piperita*, *Spilanthes acmella* e *Vetiveria zizanioides* como imunes a *M. incognita*. Nesse estudo, conduzido em Brasília, em casa-de-vegetação, foram inoculados 6000 ovos por planta e avaliadas após sete a nove semanas, pelo número de galhas e de massas de ovos.

Araujo, Mattos e Souza (1994), avaliaram as reações de 19 procedências de *Pfaffia glomerata* a *M. javanica*. Mudas cultivadas em vasos foram inoculadas com 6000 ovos por planta, e avaliadas sete semanas depois, pelos índices de galhas e de massas de ovos, onde observou-se grande variação entre as reações, sendo uma procedência classificada como suscetível, três como altamente

suscetíveis, duas como resistentes e as restantes como imunes.

Macedo Filho et al. (1994), avaliaram as reações de 12 genótipos de *Mentha* a *M. javanica*. As plantas foram inoculadas com 5000 ovos e as avaliações foram realizadas após cinco, sete e nove semanas da inoculação, pelos índices de galhas e de massas de ovos. Predominaram as reações de alta suscetibilidade e de suscetibilidade. Apenas *M. piperita*, de duas procedências distintas, mostrou-se medianamente resistente ao nematoide.

Ao verificarem a suscetibilidade de 65 espécies de plantas medicinais a *M. javanica* e/ou *M. incognita*, Souza, Mattos e Karl (1995), observaram que 19 mostraram resistência e 42 mostraram-se como intermediária a pelo menos uma das espécies do nematoide. Entretanto, das 31 plantas consideradas como sendo as mais cultivadas, 19 foram suscetíveis a *M. javanica* e/ou *M. incognita*. Os autores fizeram a classificação das plantas conforme adaptação da escala de Taylor e Sasser (1978): resistente (nenhuma massa de ovos ou galha); intermediária (1 a 30); suscetível (mais do que 30).

Maciel e Ferraz (1996) avaliaram as taxas reprodutivas de *M. incognita* raça 2 e de *M. javanica* em oito espécies de plantas medicinais, sob condições de casa-de-vegetação, com base nos índices de massas de ovos e nos fatores de reprodução dos nematoides. A terminologia adotada na caracterização das plantas testadas foi a de Canto-Sáenz (1985), sendo classificadas em hospedeiras eficientes (favoráveis), moderadamente eficientes e não eficientes. Os autores verificaram que *Achillea millefolium*, *Arctium lappa*, *Bryophyllum calycinum* e *Crassula portulacea* foram hospedeiras não eficientes ou desfavoráveis a ambas as espécies. *Plectranthus barbatus* e *Polygonum hidropiperoides* foram eficientes à reprodução das duas espécies. *Achyrocline satureoides* e *Tropaeolum majus* foram eficientes para *M. javanica* e não para *M. incognita*.

Karl, Souza e Mattos (1997) testaram a patogenicidade de *Meloidogyne javanica* em *Ocimum basilicum* var. *basilicum*, *O. sanctum*, *Melissa officinalis* e *Ageratum conyzoides* em condições de microparcels, em campo. Mudanças sadias, obtidas por estaquia, foram transplantadas para microparcels e inoculadas com suspensão de ovos nos níveis de 1.000, 2.000 ou 4.000 ovos por planta, para basilicão e mentrasto, e 2.000 e 4.000 ovos por planta, para erva-cidreira e tulsi. O nível de infecção pelo nematoide foi quantificado pelo número de galhas e de massas de ovos por sistema radicular, expresso por uma escala de 0 a

5. As quatro espécies de plantas foram altamente suscetíveis ao nematoide, com todas as plantas inoculadas recebendo o índice 5 para galhas e massas de ovos (mais que 100 galhas e massas de ovos por sistema radicular). Entretanto, apenas o basilicão mostrou-se intolerante à infecção por *M. javanica*, apresentando significativa redução nos pesos fresco e seco da parte aérea em comparação com as testemunhas sadias.

O efeito da planta medicinal *Ageratum conyzoides* sobre a população de *M. incognita* foi avaliado por Dias et al. (1998). Os autores constataram que o comportamento desta planta e do tomate (testemunha) foram semelhantes, sugerindo que o mentrasto não foi eficiente na redução das populações de *M. incognita* no solo.

Prodócimo e Lozano (1998) constataram em Curitiba, e Região Metropolitana (Quatro Barras e Almirante Tamandaré), PR a ocorrência de nematoides de galhas em 71 amostras de plantas medicinais. Cerca de 50% das plantas estavam parasitadas por uma ou mais espécies de *Meloidogyne*. Foram encontradas quatro espécies: *M. hapla*, *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*, além de alguns espécimes que não puderam ser identificados.

Em levantamento realizado por Souza, Campos e Maximiliano (1998) em 28 municípios dos Estados de Minas Gerais (176 amostras), São Paulo (2 amostras), Rio Grande do Norte (3 amostras), Pará (3 amostras) e Pernambuco (5 amostras) em hortaliças e plantas medicinais, para estudar a ocorrência e a distribuição de fitonematoides nessas plantas, *Meloidogyne incognita* foi constatado em 27,5% das amostras, *M. javanica* em 24,8% e *M. hapla* em 5,2%. Outros gêneros de nematoides também foram encontrados associados a essas plantas.

Park et al. (2004) testaram a hospedabilidade de 22 espécies medicinais a *M. hapla*, em casa-de-vegetação na Korea, com base no índice de galhas proposto por Taylor e Sasser (1978) e no fator de reprodução (FR) ($FR = Pf/Pi$) (Oostenbrink, 1966). Doze espécies foram suscetíveis ao nematoide com índice de galhas de 2,6-5,0 e FR 1,3-10,6, três foram imunes e cinco espécies foram consideradas resistentes com FR de 0,3-0,6. *Aster scaber* e *Agastache rugosa* foram tolerante e hipersensível, respectivamente.

Moreira et al. (2008) avaliaram a reação de 10 plantas medicinais a *M. incognita* raça 2, e verificaram que o número de galhas e o fator de reprodução foram iguais a zero em *Mentha villosa*, *Cymbopogon citratus*, *Lippia alba* e *Peumus*

boldus. Em *Mentha arvensis* var. *piperacens* e *Cymbopogon winterianus* não houve formação de galhas, mas foram observadas mais que 20 fêmeas isoladas e raras massas de ovos (FR<1,0) nas raízes, enquanto em *Plectranthus amboinicus*, *Ocimum basilicum*, *O. gratissimum* e *Rosmarinus officinalis* foram observadas galhas pequenas (20 a 80) e FR<1,0, indicando a menor hospedabilidade dessas medicinais ao fitonematoide.

Couto, Campos e Gomes (2008) com o objetivo de verificar a ocorrência de *Meloidogyne* spp. em plantas medicinais no Rio Grande do Sul, submetem amostras a exames de dissecação de raízes, das quais foram extraídas fêmeas adultas de *Meloidogyne* spp. para identificação das espécies por eletroforese de isoenzimas. Os autores constataram em *Digitalis purpurea* e *Stachys byzantina* a presença de *M. incognita* Est. I2, e em *Bryophyllum tubiflorum* e *Plectranthus barbatus*, *M. arenaria* Est. A3.

Plantas consideradas medicinais por Lorenzi e Matos (2008) foram avaliadas por Mônaco et al. (2008), que verificaram que *Portulaca oleracea*, *Chenopodium album*, *Talinum paniculatum*, *Verbena litoralis*, *Lepidium pseudodidymum*, *Momordica charantia*, *Ageratum conyzoides*, *Physalis angulata* e *Polygonum persicaria* comportaram-se como suscetíveis ao nematoide *M. paranaensis*. Constataram também que *Porophyllum ruderale*, *Ipomoea quamoclit*, *Leonurus sibiricus*, *Sida rhombifolia*, *Emilia sonchifolia*, *Sonchus oleraceus*, *Solanum americanum* foram resistentes enquanto que *Leonotis nepetaefolia* foi imune.

2.2 PLANTAS MEDICINAIS

De acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias EMBRAPA (2004), as plantas medicinais podem ser definidas como aquelas que apresentam uma ou mais substâncias químicas com ação medicamentosa capazes de interagir com o organismo humano e de outros animais, restabelecendo sua saúde e equilíbrio.

Já a Organização Mundial de Saúde (OMS) diz que planta medicinal é qualquer planta que possua em um ou em vários de seus órgãos, substâncias (princípios ativos) usadas com finalidade terapêutica, ou que estas substâncias sejam ponto de partida para a síntese de produtos químicos e farmacêuticos.

Segundo Fuck (2006), uma planta é considerada medicinal quando

são encontradas em sua composição substâncias (princípio ativo) que provocam no organismo humano reações que podem variar da cura ao abrandamento da doença. O grau de concentração do princípio ativo da planta, bem como sua forma de preparo e administração, é determinado pela ação terapêutica ou tóxica da espécie.

2.2.1 Histórico

Desde os primórdios dos tempos, os homens buscam na natureza recursos para melhorar suas próprias condições de vida, aumentando suas chances de sobrevivência. O uso das plantas como alimento sempre existiu e a este se incorporou a busca de matéria-prima para a confecção de roupas e ferramentas, além de combustíveis para o fogo. A simples observação das variações sazonais mostradas pelas plantas, certamente deslumbrou os primeiros observadores da natureza, que provavelmente viam nos vegetais grande sabedoria em antecipar as estações do ano, assim como uma força admirável em ressurgir do lodo ou do solo após as vicissitudes climáticas. Tal admiração deve ter criado um respeito místico, que certamente contribuiu para o uso ritual das plantas nos primeiros períodos (LORENZI; MATOS, 2008).

O efeito causado por algumas plantas impensadamente ingeridas contribuiu para transferir as plantas à categoria de entidades divinas. Plantas com propriedades alucinógenas foram rapidamente incluídas em rituais religiosos e a elas foi atribuída a propriedade mágica de colocar os homens em contato direto com os deuses. Populações indígenas de norte a sul nas Américas incluíam o tabaco em seus rituais, por seus efeitos narcóticos, hábito este rapidamente transferido aos colonizadores europeus. Muitas vezes os efeitos de determinadas plantas foram extrapolados para aliviar a dor em doentes agonizantes (LORENZI; MATOS, 2008).

Muitos povos descreveram a utilização de ervas como forma de medicamento em seus registros e manuscritos, mas muitos séculos se passaram até que o verdadeiro poder das plantas fosse reconhecido (DEVIIENNE et al., 2004).

Apesar do decorrer dos milênios, o homem ainda busca soluções para vários problemas de saúde. As grandes descobertas de princípios ativos de origem vegetal somente foram possíveis após avanços tecnológicos para o isolamento e elucidação estrutural. Várias substâncias ativas que possuem atividade farmacológica, muitas vezes, indicadas pelo uso popular, tiveram suas atividades

comprovadas cientificamente (DEVIIENNE et al., 2004).

Segundo dados da OMS, 80% da população de baixa renda não tem acesso à medicina moderna e medicamentos essenciais, recorrendo aos produtos de origem natural como única fonte terapêutica (DI STASI, 1996). O consumo de medicamentos de origem vegetal decorre, basicamente, do fato destes produtos representarem terapias de menor custo em relação àquelas normalmente oferecidas pela indústria farmacêutica (DEVIIENNE, RADDI; POZETTI, 2004).

Devienne, Raddi e Pozetti (2004) enfatizam, ainda, que apenas 30% dos medicamentos comercializados são originados direta ou indiretamente de plantas. A identificação de novas fontes naturais de compostos químicos visa o desenvolvimento, além de possibilitar a autonomia no gerenciamento de suas políticas de saúde. Nesse contexto, produtos naturais obtidos de plantas demonstram ter valor incalculável para a sociedade contribuindo, significativamente, para a melhoria da qualidade de vida da população.

2.2.2 Biodiversidade Brasileira

O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000, o que faz da nossa flora nativa uma das mais ricas fontes de substâncias com potencial farmacológico (SIMÕES; SPITZER, 2001).

As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Pesquisadores da área de produtos naturais mostram-se impressionados pelo fato desses produtos encontrados na natureza revelarem uma gama quase que inacreditável de diversidade em termos de estrutura e propriedades físico-químicas e biológicas (WALL; WANI, 1996 citado por SIMÕES; SPITZER, 2001).

A exploração de plantas de uso medicinal da flora nativa através da exploração direta nos ecossistemas tropicais (extrativismo) tem levado à reduções drásticas das populações naturais dessas espécies, seja pelo processo predatório de exploração, seja pelo desconhecimento dos mecanismos de perpetuação das mesmas. Assim, a domesticação e cultivo aparecem como opções para obtenção da matéria prima de interesse farmacêutico e redução do extrativismo nas formações

florestais (REIS; MARIOT, 2001).

Por se tratar de uma área de pesquisa relativamente recente no país, a incorporação aos currículos de cursos superiores como disciplina de abordagem obrigatória iniciou apenas na década de 80 (FURLAN, 1996). Ao mesmo tempo, o número de pesquisadores dedicados aos estudos com plantas medicinais é muito reduzido, comparando ao número de espécies que necessitam de estudos (GOTTLIEB; BORIN, 1997). Assim, muito ainda há por se fazer em termos de tecnologia de produção, processamento, controle e qualidade, etc.

2.2.3 Importância

As plantas representaram durante séculos, única fonte de agentes terapêuticos para o homem. No início do século XIX, com o desenvolvimento da química farmacêutica, as plantas passaram a representar a primeira fonte de substâncias para o desenvolvimento de medicamentos. Atualmente, apesar do grande desenvolvimento da síntese orgânica e de novos processos biotecnológicos, 25% dos medicamentos prescritos nos países industrializados são originários de plantas e 120 compostos de origem natural, obtidos a partir de cerca de 90 espécies de plantas, são utilizados na terapia moderna. De fato, os produtos naturais estão envolvidos no desenvolvimento de 44% de todas as novas drogas (CRAGG, NEWMAN; SNADER, 1997).

O crescimento deste setor vem estimulando pesquisadores e indústrias farmacêuticas internacionais a investirem em pesquisa e patenteamento de novas substâncias naturais, bem como extratos padronizados. O interesse internacional nas plantas medicinais nativas do Brasil é grande, pois o país possui a maior biodiversidade do planeta e uma rica medicina tradicional, pouco conhecida e difundida (CARVALHO, 2009).

Apenas 8% das espécies vegetais da flora brasileira foi estudada em busca de compostos bioativos e 1.100 espécies vegetais foram avaliadas em suas propriedades medicinais. Destas, 590 plantas foram registradas no Ministério da Saúde para comercialização (GARCIA et al., 1996).

As informações anteriores revelam a necessidade de se buscar alternativas para superar a dependência externa, principalmente quando se confrontam os altos preços médios praticados no Brasil em comparação com

aqueles praticados nos países desenvolvidos. O panorama brasileiro nessa área mostra que 84% de todos os fármacos são importados e que 78% da produção brasileira é feita por empresas multinacionais (BERMUDEZ, 1995).

Há enorme interesse por parte de grandes empresas multinacionais neste setor da indústria, uma vez que elas estão capacitadas tecnologicamente para a nova tendência do mercado. Como exemplo, pode-se citar a Merck, que possui plantações próprias no Brasil de jaborandi e fava-d'anta, para extração de pilocarpina e rutina, respectivamente, que são comercializadas no mercado externo (ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS, 1998).

Mais recentemente, o estudo das plantas medicinais e aromáticas está sendo abordado também sob o enfoque agrícola, servindo como alternativa de produção para pequenos, médios e grandes produtores. Já existem no Brasil, na Região Sul, cooperativas de pequenos produtores de plantas medicinais, em especial produtores de camomila, que estão colocando seu produto no mercado interno e em alguns países do Mercosul, dentro dos melhores padrões de qualidade (MARTINS, 2000).

É notória a necessidade da indústria nacional de investir em pesquisa e desenvolvimento, principalmente na área de pré-processamento e armazenamento, para alcançar os padrões de qualidade exigidos pelo mercado internacional. A área de pré-processamento e armazenamento de plantas medicinais e aromáticas é a mais deficiente em informações científicas dentro do trabalho multidisciplinar envolvendo plantas medicinais (MING, 1999).

2.2.4 Cultivo

O Estado do Paraná é o maior produtor brasileiro de plantas medicinais-aromáticas. Há cerca de 30 propriedades paranaenses, que cultivam exclusivamente ervas medicinais, adotando geralmente, o sistema orgânico de produção (EMATER, 2010).

Segundo o CENTEC (2004) o cultivo de plantas medicinais tem como objetivo principal produzir medicamentos a custo baixo e para isso requer vontade, dedicação e conhecimento, pois, embora seja simples requer a assessoria técnica.

Rebello (1998) destaca que a introdução de inúmeras plantas

exóticas, conhecidas e estudadas é um fator primordial na perda da resistência a pragas, tal perda a transforma em foco de parasitas que, quando avolumados, quebram a resistência das plantas vizinhas, estabelecendo-se a reboleira doente, que produzirá o inóculo que adoecerá o cultivo. Como se não bastasse a introdução ainda poderá veicular novos patógenos ou incrementar a virulência de novos patógenos controlados que eram antagônicos na sua origem, ausentes, agora, no local de cultivo, onde o novo organismo foi introduzido. Não se pode esquecer que introduções de um local para o outro, mesmo dentro da origem das plantas, também podem oferecer perigos, pela alteração de manejo na nova área de cultivo.

O cultivo das plantas medicinais além de possibilitar a sobrevivência das plantas espontâneas em seus ambientes, uma vez que minimiza o seu extrativismo, permite maior previsibilidade na composição fitoquímica. É aconselhável, em muitos casos, o cultivo das plantas medicinais para a melhoria da qualidade da droga. Esta melhoria pode ser resultado do cultivo de espécies, variedades ou híbridos que tenham os caracteres desejados; pode ser devido ao melhor manejo das condições de solo, práticas agrícolas, controle de fungos e insetos etc; pode ser devido a melhores condições de colheita e tratamento pós-colheita como secagem em temperaturas adequadas, dentre outros (ANDRADE; CASALI, 1999).

Ribeiro e Diniz (2008) enfatizam que ao contrário de qualquer produção vegetal, o cultivo de plantas medicinais não visa maximizar exclusivamente a produção, mas combinar a maior produtividade com a melhor qualidade (concentração de princípio ativo/peso). Esta especificidade deve orientar a adoção de todos os princípios de produção vegetal. Técnicas de colheita, secagem e armazenagem também são decisivas para evitar perdas de princípios e substâncias ativas, até a utilização final em formulações terapêuticas.

2.2.5 Generalidades sobre o Gênero *Mentha* L. (Lamiaceae)

A família Lamiaceae compreende cerca de 200 gêneros, com 2000 a 5000 espécies, entre as quais se encontram diversas plantas aromáticas (HEDGE, 1992).

O gênero *Mentha* tem ampla distribuição natural em todos os continentes, exceto na América do Sul e Antártida. Seus centros de diversidade são

Europa, Austrália e Ásia Central, sendo a diversidade europeia encontrada ao nível de espécies, enquanto na Ásia Central encontra-se variação dentro de *Mentha longifolia* (CHAMBERS, 1992).

É um dos gêneros mais complexos do reino vegetal devido a que inclui aproximadamente 30 espécies e 13 híbridos resultantes do cruzamento espontâneo e seleção das espécies, as quais podem sumariamente distinguir-se em dois grupos: mentas em espiga, com flores dispostas em uma espiga terminal não folhosa, e mentas rasteiras, com flores dispostas em verticilos, escalonados na axila das folhas pecioladas (SCHWEITZER, 1986; DORMAN et al., 2003).

O nome genérico *Mentha* provém da palavra grega “menthe”. Segundo a mitologia grega Menthe era amada por Plutão, deus dos infernos, e isto enfureceu Perséfone, esposa de Plutão que a transformou numa planta destinada a crescer na entrada das cavernas que davam acesso direto ao inferno. A planta era a hortelã (TESKE; TRENTINI, 1997).

As mentas ou hortelãs são plantas herbáceas, geralmente perenes, rizomatosas ou estoloníferas, de folhas opostas, sésseis ou pecioladas, serreadas e que contêm flores pequenas, lilases ou azuladas, verticiladas pendunculadas, dispostas em verticilos axilares ou inflorescência espiciformes terminais (DIMITRI, 1980).

Dentre as mais populares destacam-se: a hortelã verde (*Mentha viridis*); o mentrasto (*Mentha rotundifolia*); a menta-do-levante (*Mentha citrata*); a hortelã-crespa (*Mentha crispa*); a hortelã-romana (*Balsamita major*); a hortelã-pimenta que é a mais refrescante das hortelãs (*Mentha piperita*); e a menta japonesa ou hortelã-doce (*Mentha arvensis*), rica em óleo essencial, cujo principal componente é o mentol (MAIA, 1958).

No Brasil, a menta começou a ser cultivada em pequena escala pelos imigrantes japoneses, que a trouxeram para o interior de São Paulo, no começo do século XX (MAIA, 1998). O Brasil passou a ter grande importância mundial na produção do óleo essencial de menta durante a Segunda Guerra Mundial, quando os Estados Unidos viram-se privados da importação deste óleo, sendo necessário outro fornecimento dessa matéria prima (GRISI et al., 2006).

O Instituto Agronômico de Campinas (IAC), por meio da seleção de novos clones de *Mentha arvensis*, obteve a variedade IAC-701, adaptada às condições da Região Sul e Sudeste, com boa produção, elevados teores de óleo e

mentol, sendo resistente à ferrugem (doença causada pelo fungo *Puccinea menthae*). Esse trabalho contribuiu para o Brasil tornar-se o maior produtor mundial de mentol e óleo desmentolado, na década de 1950 (GRISI et al., 2006).

A partir de 1974, ocorreu uma queda acentuada na produção de óleo bruto de menta, causada pela diminuição das áreas de plantio e pelo baixo nível tecnológico do agricultor brasileiro (CZEPAK, 1998). O advento do mentol sintético ajudou na queda dos preços, o que levou os agricultores a abandonarem o cultivo. Mesmo assim, a produção de mentol natural continua tendo vantagens sobre o sintético, devido à pureza e qualidade superiores. O mentol sintético é contaminado com moléculas tóxicas durante o processo de produção, tornando-o impróprio para o uso em muitos produtos alimentícios e farmacêuticos (MAIA, 1998).

Uma vez que existe mercado e demanda, a *Mentha* deve ser considerada uma espécie importante para conservação de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas. A introdução de novos materiais genéticos de *Mentha* é indispensável para obtenção de um pool gênico adequado à pesquisa nas áreas de melhoramento e domesticação. Exemplo desse fato é a conservação de germoplasma das espécies de *Mentha* introduzidas de outros países, que fornece material genético para domesticação, caracterização, desenvolvimento de variedades e prospecção de genes (GRISI et al., 2006).

Várias espécies de *Mentha* têm sido investigadas, tanto por suas atividades biológicas como também pelos óleos essenciais produzidos por suas folhas (PAULUS et al. 2005). A síntese e a composição dos óleos essenciais, em diversas plantas aromáticas, são influenciadas pelo genótipo, estágio de desenvolvimento da planta e condições ambientais (MAROTTI et al., 1994).

Embora apresentem grande diversidade de constituintes, os principais são os monoterpenos (SEIGLER, 1998) que têm a função ecológica de proteção contra estresses bióticos e abióticos (GERSHENZON; CROTEAU, 1991; HARBORNE, 1991).

Em *Mentha* foi demonstrado que a biossíntese de óleos essenciais ocorre especificamente nos tricomas glandulares peltados, distribuídos ao longo da superfície foliar (GERSHENZON, MAFFEI; CROTEAU, 1989; McCASKILL, GERSHENZON; CROTEAU, 1992). A produção e a distribuição dos tricomas na folha não é uniforme (TURNER, GERSHENZON; CROTEAU, 2000) e, embora ocorra em ambas as superfícies, apresenta geralmente maior densidade na

superfície abaxial (MARTINS; MAJER, 1998).

Esse gênero apresenta dificuldades para sua classificação devido à grande variabilidade em suas características morfológicas e a facilidade de hibridização (LORENZO et al., 2002).

2.2.6 A Espécie *Mentha Pulegium*

Mentha pulegium L., conhecida como poejo, poejinho, poejo-das-hortas, poejo-real, poejo-do-rei, erva-de-são-lourenço, hortelã-miúdo, menta-miúda, menta-selvagem, vique, puejinho, poleo, pulion, poesco, pennyroyal (LORENZI; MATOS, 2008; RIBEIRO; DINIZ, 2008) é uma erva prostada, perene, graminóide, com cerca de 10 cm de altura, com folhas muito aromáticas, de margem inteira e limbo pontilhado de glândulas translúcidas, de menos de 1cm de comprimento. Flores de corola violeta, reunidas em fascículos nas axilas das folhas.

Segundo Ribeiro e Diniz (2008), o poejo é uma planta nativa do Oriente Médio e Norte da África, foi dispersa na Europa pelos árabes e romanos. Introduzida na América, aclimatou-se em regiões subtropicais semi-áridas. Desenvolve-se a pleno sol, não tolera geadas severas ou temperaturas elevadas associadas a alta umidade do ar. Requer solos bem drenados, com boa fertilidade, bom teor de matéria orgânica e pH entre 5,0 e 6,5. Sua propagação é por mudas tiradas por divisão de touceira. O plantio pode ser efetuado durante o ano todo, desde que haja umidade adequada no solo.

As plantas colhidas durante a floração são empregadas em todos os países onde ocorre, na forma de infuso preparado da maneira usual, no tratamento caseiro de desordens digestivas, amenorréia, gota, resfriados e para aumentar a micção, segundo a literatura etnofarmacológica. Sua administração em doses elevadas, equivalente a 5g do óleo essencial, tem ação abortiva e hepatotóxica. Em aromaterapia são atribuídas ao óleo essencial desta planta propriedades mucolítica, anticatarral, tônica e estimulante, hipertensiva e cardiotônica, carminativa, estimulante hepatobiliar e emenagoga, com indicação para tratamento de bronquite catarral crônica, bronquite asmática, coqueluche, leucorréia e dismenorréia. Externamente é usada pra tratamento de afecções da pele (LORENZI; MATOS, 2008).

Embora sem comprovação experimental conduzida cientificamente,

a planta e seu óleo essencial são considerados como antimicrobianos, inseticidas e repelentes de cães e gatos (LORENZI; MATOS, 2008).

2.2.7 Óleos Voláteis

A ISO (International Standard Organization) define óleos voláteis como os produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos. De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Também podem ser chamados de óleos essenciais, óleos etéreos ou simplesmente essências (SIMÕES; SPITZER, 2001).

Entretanto, sua principal característica é a volatilidade. Outra característica importante é o aroma agradável e intenso da maioria dos óleos voláteis, sendo assim, por isso, também chamados de essências. Eles também são solúveis em solventes orgânicos apolares, como éter, recebendo, por isso, a denominação de óleos etéreos ou, em latim, *aetheroleum*. Em água, os óleos voláteis apresentam solubilidade limitada, mas suficiente para aromatizar as soluções aquosas, que são denominadas hidrolatos (SIMÕES; SPITZER, 2001).

Segundo Simões e Spitzer (2001), outras características são:

- Sabor: geralmente acre (ácido) e picante;
- Cor: quando recentemente extraídos são geralmente incolores ou ligeiramente amarelados; são poucos os óleos que apresentam cor;
- Estabilidade: em geral, os óleos voláteis não são muito estáveis, principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade e metais;
- A maioria dos óleos voláteis possui índice de refração e são opticamente ativos, propriedades estas usadas na sua identificação e controle da qualidade.

O mercado mundial de óleos essenciais vem crescendo constantemente, estima-se aumento de 7,5% entre os anos de 1997 e 2000. Avalia-se a produção brasileira de óleos essenciais em 45 milhões de dólares, o que corresponde a 13,1% da produção mundial. O maior problema da agroindústria produtora de óleos é a concorrência com sistemas sintéticos. Felizmente, a indústria que mais necessita deste, a alimentícia, tem substituído os produtos sintéticos por naturais, por causa das exigências atuais do mercado consumidor. Empresas como a NESTLÉ vêm favorecendo o uso dos flavorizantes naturais, correspondendo a

75% do montante dos flavorizantes utilizados por esta indústria (VERLET, 1993; SALGADO, 2005). Um dos desafios à expansão de culturas produtoras de óleos essenciais é desenvolver ou procurar linhagens genéticas com características agronômicas satisfatórias e composição química desejável. Verdadeiros bancos de germoplasma estão sendo desenvolvidos por empresas especializadas na comercialização de sementes de ervas, temperos e culturas especiais (SIMON, 1993).

A complexidade da composição do óleo essencial e a concentração dos seus constituintes são resultados dos muitos processos metabólicos que ocorrem nas plantas, cuja biossíntese é afetada por vários fatores como clima, solo, regiões geográficas, duração do dia e da noite, idade da planta, órgão onde se localiza, estresses etc. Além disto, ainda há a estabilidade destes compostos após a extração, sendo que alguns não são usados pelas indústrias devido à sua baixa estabilidade (MATTOS et al., 2007).

Os óleos essenciais podem ocorrer em diferentes estruturas secretoras especializadas dependendo da família da espécie vegetal, como tricomas (Lamiaceae), células parenquimáticas diferenciadas (Lauraceae), canais oleíferos (Apiaceae) ou em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (Rutaceae). Podem estar estocados em certos órgãos, como nas flores (laranjeira), folhas (capim-santo) ou ainda nas casacas dos caules (canelas), madeira (pau-rosa), raízes (vetiver), rizomas (gengibre), frutos (funcho) ou sementes (noz-moscada) (MATTOS et al., 2007).

Os óleos essenciais apresentam funções ecológicas na planta, especialmente como inibidores da germinação, na proteção contra predadores, na atração de polinizadores, na produção contra a perda de água e aumento da temperatura, entre outras (CRAVEIRO; MACHADO, 1986).

2.2.8 Fatores que Afetam a Produção de Óleos Essenciais (Época de Colheita)

Os ambientes nos quais as plantas se desenvolvem exercem grande influência sobre a produção e a composição química dos óleos essenciais. Os fatores ambientais podem ser bióticos (fungos simbiotes e parasitas) e abióticos (temperatura, luz, fotoperíodo, água, nutrientes) (GARLET, 2007). O estudo da influência dos fatores ambientais na variabilidade dos monoterpenos, como

principais constituintes dos óleos essenciais de espécies de *Mentha*, é de grande importância segundo Gershenzon, Mcconkey e Croteau (2000), pelo fato dessas substâncias terem significado bioquímico, ecológico, fisiológico e implicações evolutivas.

Sangwan et al. (2001) afirmam que a produção de óleos essenciais está intimamente ligada à fisiologia de toda a planta e, assim, depende do estágio metabólico, desenvolvimento e diferenciação do tecido onde ocorre a síntese do óleo. Fatores ambientais como temperatura, umidade relativa, radiação, fotoperíodo e práticas culturais influenciam o acúmulo e a composição dos óleos essenciais (AFLATUNI, 2005). A composição quantitativa dos óleos essenciais de muitas plantas aromáticas, conforme Marotti et al. (1994), é muito influenciada pelo genótipo e condições agrônomicas, como época de colheita, idade da planta e densidade de plantio. Para Maia (1998), plantas que se desenvolvem sob diferentes condições de cultivo contêm óleos essenciais com diferentes características.

Estudando *M. x piperita*, Rohloff et al. (2005) observaram que a melhor época de colheita para garantir as características quantitativas e qualitativas do óleo essencial foi o período de pleno florescimento. Ainda observaram que os teores de mentol e mentona tendem a ser maiores em dias longos, ao contrário do mentofurano, que predomina em dias curtos, como também concluiu Bernáth (1992).

Court et al. (1993), estudando épocas de colheita de *M. piperita* no Canadá obtiveram resultados diferentes quanto à produção e conteúdo do óleo essencial. Maiores produções de biomassa e de óleo foram encontradas no final do mês de agosto e início de setembro. As concentrações de mentol, neomentol e metil acetato aumentaram com o desenvolvimento da planta, enquanto que a mentona e a isomentona tiveram maiores concentrações em plantas imaturas e o mentofurano e pulegona estiveram mais presentes no florescimento.

Em pesquisa realizada na Turquia, no verão, Mueller-Riebau et al. (1997), afirmam que o melhor momento da colheita de *M. pulegium* para manter os óleos essenciais com os maiores ingredientes ativos é julho. Já na espécie *Mentha x villosa*, na estação seca, a maior produção de óleo ocorre aos 88 dias após o transplante das mudas, estando associado ao aumento das estruturas vegetativas da planta neste período, com posterior decréscimo devido à senescência dessas estruturas. Na estação chuvosa estes picos de produção ocorreram aos 95 dias após o transplante, possivelmente retardado devido as chuvas que causaram queda

das folhas mais velhas (MATTOS et al., 1996).

Clark e Menary (1984) afirmam que não somente a época da colheita, mas também o número de colheitas por período influencia o rendimento e qualidade do óleo essencial, uma vez que obtiveram maior teor de mentol na primeira colheita de *M. x piperita*.

Innecco et al. (2003), ao avaliaram sete épocas de colheita em *M. x villosa* Huds., concluíram que a melhor época para obter os melhores rendimentos de óleo foi aos 80 e 90 dias do transplântio na estação seca, e na chuvosa aos 95 dias após o plantio, no espaçamento de 0,60 x 0,30 m.

Para *M. arvensis*, em condições climáticas brasileiras, Czepak (1995) obteve maior rendimento de mentol no óleo essencial em colheitas aos 60 a 80 dias após o plantio. Sacramento e Campos (2002), por outro lado, obtiveram maiores valores de massa seca ao colher menta aos 135 dias de cultivo. Ainda em *M. arvensis*, Randhawa e Satinder (1996) observaram maior rendimento de óleo na colheita entre 120 e 135 dias após o plantio; ao atrasar a colheita de 120 para 150 dias, observaram aumento nos teores de mentol e acetato de mentila e diminuição no teor de mentona. De maneira semelhante, Ram e Kumar (1997) obtiveram maiores teores de mentol em *M. arvensis* ao colher aos 110 e 120 dias após o plantio, quando comparada à colheita aos 90 dias.

2.2.9 Composição Química do Óleo Essencial de *M. pulegium*

As espécies da família Lamiaceae, pela riqueza em óleos essenciais, têm sido amplamente investigadas sob o ponto de vista agrônômico e químico, não somente com o intuito de maximizar seu conteúdo em óleo essencial, mas também devido à variação dos constituintes importantes desses óleos (MARTINS, 1998).

Estudos sobre a composição química do óleo essencial de *M. pulegium* iniciaram-se com Umney e Bennett no ano de 1905. Os autores verificaram 75% de pulegona no óleo essencial de *M. pulegium*.

LaFace (1922) constatou em seu trabalho um rendimento de 1,75% de óleo essencial de *Mentha pulegium* contendo 52% de pulegona.

Romeo e Giuffre (1927) verificaram 0,90% no rendimento do óleo de *M. pulegium* (base seca) e Krastelevskii (1925) constatou na planta fresca um

rendimento de 0,63%. Anon (1930) verificou no óleo de poejo da África do Sul alto teor pulegona (93%). Na Turquia, Gurgun (1948) observou no óleo essencial de *M. pulegium* a presença de 30 % de pulegona em seu conteúdo.

De Souza (1950) estudou as propriedades físicas do óleo essencial de *M. pulegium* e observou que a variedade brasileira é bastante semelhante à de outros países, especialmente América do Norte. No entanto, o conteúdo pulegona é apenas cerca de 9%, em comparação com 16-30% na variedade dos EUA e 80-90% na União Europeia.

Costa e Do Vale (1952) verificaram no óleo essencial de *M. pulegium* 83% ou mais de pulegona, alguns menthone e β -cariofileno e fenóis não identificados, bem como outros compostos.

Chopra, Vashist e Handa (1964) verificaram através de cromatografia e exames das frações do óleo essencial de *M. pulegium* coletados em Jammu e Caxemira, estados da Índia, a presença de pulegona 73,46%, isopulegone 5,25%, pulegol 4%, menthone 2,7%, isomentona 1,86%, piperityl acetato de 1%, piperitenol 0,99%, cadinene 0,87%, e um alcalóide não identificado.

No Japão, Fujita e Fujita (1967) compararam os componentes do óleo essencial de *M. gattefossei* com os de *M. pulegium*. Estes óleos essenciais deram 19 picos nos cromatogramas de gás, dos quais 14 eram idênticos. Assim, estas plantas são consideradas muito semelhantes. Mentol foi considerado o último produto da biossíntese em espécies de *Mentha*, *M. pulegium* é de um grau ligeiramente maior de evolução do que *M. gattefossei*.

Zwaving e Smith (1971) verificaram como componentes principais encontrados em plantas de *M. pulegium*, coletadas na Áustria, limoneno (11%), octyl-3-acetate (0.8%), octanol-3 (1%), menthone (8%), isomenthone (7%), e piperitone (70%). Pulegona que, normalmente, é encontrada em óleos de *M. pulegium* em quantidades variando de 10-90%, não estava presente no óleo investigado.

No Japão, Fujita e Fujita (1972) detectaram como componentes do óleo essencial de *M. pulegium*: α -pineno, β -pineno, limoneno, 3-octanone, p-cimeno, acetato de 3-octil, 3-octanol, 1-octen-3-ol, 3-methylcyclohexanone (I), mentona, isomentona, isopulegone, pulegona, piperitona, cis-óxido de pulegona (II), óxido de trans-pulegona (III), piperitenone, dehydroxymenthofuran óxido (IV), menthofuran

óxido (V), cariofileno, β -humuleno e parafinas normais (C18-32) e os ácidos láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, β methyladipic-ácido (VI), ácido β -mentil- δ -isobutyrylvaleric (VII), fenol, c-cresol, p-cresol, salicylaldehyde e eugenol.

Em estudo realizado em Portugal, Frazao, Domingues e Souza (1974) observaram no óleo essencial de *M. pulegium* os compostos: piperitona, neoisomentol, mentona, pulegona, isomentona, e mentol.

Em Angola, estudo cromatográfico e químico dos óleos essenciais de *M. pulegium* foram feitos por Proença da Cunha, Roque e Cardoso do Vale (1976). Os autores constataram 2,60% de α -pinene, 1,44% de β -pinene, 1,06% de D-camphene, 1,45% de D-limoneno, 3,05% de p-cymene, 6,80% de D-menthone, 5,02% de isomentona, 42% de pulegona, 10,07% de isopulegona, 16,24% de d-mentol, e 6,80% de isopulegol. β -cariofileno, aromadendreno e, também, foram detectados por camada delgada e cromatografia de gás.

Aiquel, Bravo e Retamar (1977) ao obterem a fração do óleo essencial de *M. pulegium* observaram α -pinene 0,7%, limoneno 0,5%, (-)-mentona 25,0%, (+)-isomentona 20,7%, pulegona 50,1%, e sesquiterpenoides 2,5%.

Kjonaas e Croteau (1983) constataram pulegona como o principal componente do óleo essencial de *M. pulegium*.

Montes et al. (1986) verificaram a determinação de pulegona no óleo essencial de *M. pulegium* no Chile. Constataram no óleo a presença de 96,48% de pulegona. Também identificaram no óleo a presença de α - [80-56-8], e β -pinene, camphene, limonene, phellandrene, p-cymene, 1-methylcyclohexanol, 3-octanol, mentil acetato, neomenthol, isomenthol, menthone e menthofuran.

Na Turquia, Mueller-Riebau, Berger e Yegen (1995) estudaram os óleos essenciais de *Thymbra spicata*, *Satureja thymbra*, *Salvia fruticosa*, *Laurus nobilis*, *M. pulegium*, *Inula viscosa*, *Pimpinella anisum*, *Eucalyptus camaldulensis*, e *Origanum minutiflorum* e identificaram 20 componentes. Das plantas avaliadas destacaram como principais compostos: γ -terpinene, p-cimeno, timol, carvacrol, assim como 1,8-cineol, pulegona, e anetol.

Pino, Rosado e Fuentes (1996) ao analisarem a composição química de *M. pulegium* de origem cubana identificaram 33 constituintes, sendo que neoisomentol (20,68%) e o pulegona (25,14%) foram os componentes principais.

Mueller-Riebau et al. (1997) ao estudarem as variações sazonais na

composição química de óleos essenciais de plantas aromáticas na Turquia, verificaram que o principal constituinte do óleo essencial de *M. pulegium* é pulegona. Ismaili-Alaoui et al. (1997) ao estudarem os constituintes de *M. pulegium* no Marrocos verificaram R(+)-pulegona como principal constituinte do óleo. Moldao-Martins (1998), também, verificaram como principal componente encontrado no óleo de *M. pulegium* a pulegona.

Reis-Vasco, Coelho e Palavra (1999) identificaram 21 componentes por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa e quantificados por cromatografia gasosa. Ambos óleos de *M. pulegium* L. hidrodestilados e supercrítico contiveram os monoterpenos oxigenados pulegona ($\approx 80\%$) e mentona ($\approx 9\%$) como os componentes principais.

Martins et al. (2000), relatam que dentre os componentes químicos relatados no óleo essencial do poejo a presença de borneol indica que seu uso deve ser evitado por grávidas, especialmente nos três primeiros meses de gestação.

Através de CG / EM, Chalchat et al. (2000) identificaram no óleo essencial de *M. pulegium* da Iugoslávia 22 componentes (89,9% do total de óleo). O principal deles foi mentona (30,9%), enquanto os outros importantes pulegona (14,1%) e neomentol (13,8%) e óxido de cariofileno (9,0%).

Lorenzo et al. (2002) ao obterem óleos essenciais por hidrodestilação das folhas de *M. pulegium* e *M. rotundifolia* (L.) Huds. no Uruguai, verificaram que o grupo de monoterpenos oxigenados foi o mais importante em ambos os óleos, sendo que a pulegona, isomentona e mentona foram os constituintes encontrados em maior quantidade no óleo de *M. pulegium*, no entanto, o ôxido de piperitenona e (Z)-hidrato de sabineno foram os encontrados em maior quantidade na *M. rotundifolia*. Enantioméricamente puras (-)-mentona, (+)-isomentona, (+)-isomentol, (-)-mentol e (+)-pulegona foram detectadas por cromatografia gasosa multidimensional no caso do óleo de *M. pulegium*.

O estudo dos óleos essenciais obtidos a partir de 10 populações selvagens de *M. pulegium* espalhados por toda a Grécia mostrou que o conteúdo da pulegona varia muito, desde $< 0,1-90,7$ do total de óleo. Apenas duas populações têm óleos ricos em pulegona (42,9% e 90,7%), enquanto os restantes têm um baixo teor de pulegona (até 35,6%). Estes últimos são ricos tanto em menthone / isomentona ou em piperitone / piperitenone ou em piperitone (até 97,2% do total de óleo) (KOKKINI et al., 2002).

Majidi, El Idrissi e Hnach (2003) constataram em seu trabalho que pulegona é o principal constituinte do óleo essencial de poejo (*M. pulegium*).

Aghel et al. (2004) através de hidrostilação verificaram que os principais componentes do óleo de *M. pulegium* foram pulegona (37,8%), mentona (20,3%), e piperitenona (6,8%).

Kokkini et al. (2004) verificaram a variação clinal de óleos essenciais de *M. pulegium* ao longo do gradiente climático da Grécia. O teor de óleo variou de 1,0 a 3,8 g mL/100 (d.w.) e compostos de C-3 oxigenado p-mentane constituíram em todas as populações a maior parte do óleo (78,6-99,7% do total de óleo). Pulegona (variando de 0,1-90,7% do total de óleo), piperitona (não-detectado 97,2%), mentona (0,2-53,4%), isomentona (0,1-45,1%), piperitenone (0,1-39,8%) e isopiperitenone (não-detectado 23,5%).

Agnihotri et al. (2005) verificaram a composição do óleo essencial de *M. pulegium* cultivada no noroeste do Himalaia na Índia. Oito compostos responsáveis por cerca de 87-98% do óleo foram caracterizados como pulegona (65,9-83,1%), mentona (8,3-8,7%), isomentona (3,8-4,0%), neo-mentol (0,7-1,3%), acetato de pulegol (0,1-1,2%), piperitone (1,3-3,2%), γ -Terpinene (0,9-1,2%), β -cariofileno (0,1-0,9%) e β -cariofileno óxido (0,3-1,9%).

Stoyanova et al. (2005) determinaram por cromatografia gasosa e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa os compostos químicos do óleo essencial de *M. pulegium* da Bulgária. O rendimento de óleo obtido por destilação de água e vapor foram 1,54% e 1,48%, respectivamente. Os componentes básicos, entre os 21 identificados foram pulegona (42,9-45,4%), piperitenona (21,7-23,1%) e isomentona (11,3-12,8%).

Os componentes do óleo essencial da *M. pulegium* foram isolados através de hidrodestilação e analisados utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa. No óleo foi encontrado 53 componentes. Os componentes principais foram: pulegona (43,5%), piperitone (12,2%), p-menthane-1 ,2,3-triol (6,5%), γ -elemenene (3,6%), guaiene (cis- β) (3,0%), carvacrol acetato (2,6%) e Ph Et alc. (2,4%) (EL-GHORAB, 2006).

Rim In-Sook e Jee Cha-Ho (2006) verificaram que o poejo tem potente atividade acaricida e que apresenta essencialmente pulegona (> 99%) em sua composição química.

Franzios et al. (2007), ao verificarem a atividade inseticida de óleos essenciais de menta observaram que os principais constituintes foram: pulegona, menthone e carvona. Os autores consideraram que pulegona é significativamente mais eficaz (nove vezes) como inseticida, enquanto menthone e carvona são menos eficazes (seis e duas vezes, respectivamente).

Sá et al. (2007) em primeiro relato da caracterização dos constituintes químicos do óleo essencial do poejo, cultivado no município de Ilhéus no Brasil, verificaram através de análise em CG do óleo a presença de 13 constituintes químicos, dos quais seis foram identificados, perfazendo a identificação de 94,0% dos componentes químicos do óleo. Os dois constituintes químicos majoritários são a pulegona (61,4%) e o beta-cubebeno (18,7%). Em menores quantidades foram encontrados borneol (6,6%) e mentol (6,7%). Foram identificados como constituintes minoritários mentona (0,3%) e isomentol (0,7%). O óleo essencial da espécie *M. pulegium* cultivada em Ilhéus é rico em monoterpenos oxigenados, os quais representam 75,8% da sua composição. Dessa classe de compostos, 61,4% deve-se à presença da pulegona. Piperitona e piperitenona não foram detectadas em quantidades acima de 0,1% no cultivar de Ilhéus.

Na Grécia, Cook et al. (2007) estudaram o componente dos óleos essenciais da inflorescência (I), da folha (L) e da haste (S) de plantas de *M. pulegium* de três populações na ilha de Zakynthos. Verificaram que o óleo tinha como principal componente a pulegona foi o principal constituinte de todos os óleos. Os outros componentes principais foram piperitenona, isomentona e piperitona.

Gruenwald, Brendler e Jaenicke (2000) apud Lorenzi e Matos (2008), relatam através de estudo químico e farmacológico de *M. pulegium* a presença de até 2% de óleo essencial, cujo principal componente é a pulegona, substância responsável pelo cheiro e por suas ações tóxicas, acompanhada de mentona e isomentona, bem como de flavonóides, especialmente diosmina e hesperidina. Contém também ácido rosmárico.

Ribeiro e Diniz (2008) argumentam que são encontrados 33 compostos no óleo essencial do poejo, dos quais o neoisomentol (20,68%) e a pulegona (25,14%) são os de maior concentração, mentona, linalol, limoneno, lippiona, além de flavonóides.

Mahboubi e Haghi (2008) ao verificarem a composição química do óleo essencial de *M. pulegium* revelaram com a análise do óleo essencial a

presença de piperitona (38,0%), piperitenona (33,0%), alfa-terpineol (4,7%), e pulegona (2,3%) como os principais componentes.

Karray-Bouraoui et al. (2009) ao estudarem a composição do óleo essencial de *M. pulegium* verificaram mentona, pulegona e neomentol como os principais componentes.

Em estudo realizado no Egito por Aziz e Craker (2009) constataram-se pulegona (88,05%) e isomentona (5,75%) como os principais componentes de poejo. Petrakis et al. (2009) afirmam em seu trabalho que pulegona constitui um monoterpeneo que ocorre em espécies de *Mentha*, principalmente em *M. pulegium* L. (poejo).

Elhoussine, Zineb e Abdellatif (2010) constataram que o principal constituinte do óleo de *M. pulegium* foi piperitona (35,56%), outros constituintes predominantes foram: piperitenona (21,18%), α -terpineol (10,89%), pulegona (6,452%), óxido de piperitona (4,02%), mentol (3,28%), mentona (3,09%), neomentol (2,80%), mentofuran (2,15%), isomentona (1,56%), carvona (1,13%), acetato de geranil (1,06%), germacreno D (1,03%) e limoneno (1,02%).

Miguel et al., (2010) observaram que os principais constituintes do óleo essencial de *M. pulegium* é mentol, menthone, isomentona e pulegona.

Ao verificarem os componentes do óleo essencial de *M. pulegium* Aziz e Abbass (2010) constataram a presença de pulegona como o principal componente.

Hmiri et al. (2011) também verificaram a presença de 80,28% de pulegona no óleo essencial de *M. pulegium*.

2.2.10 Atividade Antifúngica do Óleo Essencial de *Mentha pulegium* L.

Estudos sobre as atividades antimicrobianas de óleos essenciais de plantas nativas têm sido relatados em muitos países tais como Brasil, Cuba, Índia e México, que possuem uma flora diversificada e uma rica tradição na utilização de plantas medicinais para uso como antibacteriano ou antifúngico (MARTÍNEZ et al., 1996; NAVARRO et al., 1996; AHMAD; BEG, 2001; DUARTE et al. 2005)

Com relação à atividade antifúngica do óleo essencial de *M. pulegium* frente ao fungo *Cladosporium herbarum* apenas um trabalho foi encontrado na literatura de Mueller et al. (1995), onde relataram a presença de

apenas um composto ativo, para o qual encontraram evidências de que se tratava da pulegona.

Hmiri et al. (2011) estudaram a atividade antifúngica do óleo essencial de *M. pulegium* contra *Alternaria alternata* e *Penicillium expansum* verificando que foi eficiente para inibir completamente o crescimento micelial de ambos os fungos, sugerindo que este óleo possa ser utilizado na conservação de certos alimentos (maçãs, peras, etc.).

Bouchra et al. (2003), verificaram a composição química e atividade antifúngica de óleos essenciais de plantas contra *Botrytis cinerea*. Entre os sete óleos essenciais avaliados, os de *Origanum compactum* e *Thymus glandulosus* inibiram significativamente o crescimento do micélio fúngico. A inibição da *Botrytis cinerea* foi de 100% para ambos os óleos a 100 ppm, enquanto as concentrações inibitórias para 50% (IC50) foram 35,1 e 79,2 ppm, respectivamente. *Mentha pulegium* apresentou atividade moderada a 250 ppm com inibição do crescimento micelial de 58,5% e IC50 era 233,5 ppm. Os principais constituintes dos óleos estudados foram também examinados, timol e carvacrol, que são os dois principais constituintes da *Thymus glandulosus* e *Origanum compactum*, exibiram a maior atividade antifúngica com 100% de inibição a 100 ppm.

Daferera, Ziogas e Polissiou (2003) constataram a eficácia dos óleos essenciais de plantas sobre o crescimento de *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp., e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Óleos essenciais de *Lavandula angustifolia*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* e *M. pulegium* apresentaram menor atividade inibitória. O crescimento dos microorganismos testados foi afetado na concentração $\leq 1000 \mu\text{g} / \text{mL}$. Óleo de poejo encontrado foi rico em cis-menthone e pulegona.

2.2.11 *Cladosporium Herbarum*

Cladosporium herbarum é um fungo da classe Deuteromycetes, ordem Moniliales, família Dematiaceae (ALMEIDA, 2006).

A espécie *C. herbarum* apresenta grande abundância de conídios produzidos em conidióforos grandes e escuros que podem se ramificar no ápice. Os conídios estão dispostos nos conidióforos em grupos ramificados, tendo os conídios mais jovens seu desenvolvimento a partir do ápice ou das laterais dos conídios mais

maduros, formando cadeias acropetais simples ou ramificadas. O fungo apresenta conidiogênese blástica. (KRUGNER et al., 1995).

O fungo *C. herbarum* já foi relatado na cultura da ervilha (STANGARLIN et al. 2005), acerola (PAPA, 2005), maracujazeiro (FISCHER et al., 2005), espigas de milho (PEREIRA et al., 2005), ameixas, pêssegos, nectarinas (MARTINS et al., 2005) e uvas (CAMILI; BENATO, 2005).

O *C. herbarum* é o agente causal da podridão de *Cladosporium* e da cladosporiose ou verrugose.

2.2.11.1 Podridão de cladosporium

Segundo Martins et al. (2005) a podridão de *Cladosporium* é relatada com mais frequência em ameixas, ocorrendo também em pêssegos e nectarinas.

Camili e Benato (2005) relatam que essa doença também ocorre em uvas mantidas sob armazenamento refrigerado por longo período e o fungo é capaz de crescer mesmo à temperatura de 0° C. Este penetra as bagas através da película, antes da colheita ou no armazenamento. Os sintomas nas bagas são lesões circulares, bem definidas. Sob condições de alta umidade relativa, o fungo se desenvolve na superfície das bagas afetadas, resultando em colônias de coloração verde oliva nas quais há produção de grandes quantidades de esporos. A infecção pode ocorrer em temperaturas de 4-30°C, com ótimo de 20-24°C (HEWITT, 1994).

O agente causal da doença é o fungo *C. herbarum*, que sobrevive em restos de cultura, de onde é disseminado pelo ar até atingir a superfície de um fruto injuriado. A presença de ferimentos nos frutos é indispensável para que a infecção ocorra, uma vez que o fungo é considerado um parasita fraco, não conseguindo penetrar na superfície intacta dos frutos. Os sintomas são lesões pequenas, recobertas de esporulação do fungo, de coloração verde-escuro, limitadas à superfície dos frutos, podendo eventualmente atingir a polpa (MARTINS et al., 2005).

2.2.12 Efeito de Extratos de Plantas sobre *Meloidogyne* spp.

Extratos naturais podem ser um dos métodos mais promissores para o controle de patógenos do solo, a exemplo dos nematoides parasitas de plantas, podendo representar uma alternativa aos produtos químicos e se tornarem uma nova ferramenta para o manejo em pequenas áreas (COIMBRA et al., 2006).

Os extratos vegetais utilizados no controle de fitopatógenos apresentam algumas vantagens em relação aos nematicidas sintéticos, que são muito tóxicos e prejudiciais ao meio ambiente. Dentre as inúmeras vantagens do uso de extratos de plantas para controle de nematoides, podem-se destacar características tais como: menos poluente, menos tóxico ao homem, baixo poder residual, baixo custo, e podem ser produzidos localmente (MARTINEZ, 2002).

Dentre as diversas espécies vegetais descritas como fonte de princípios ativos no controle de fitonematoides, encontram-se as plantas medicinais. Essas plantas vêm sendo utilizadas por meio da incorporação de suas partes vegetais, secas ou frescas, ou sob forma de extratos aplicados ao solo (LOPES, 2004).

Nandal e Bhatti (1986), ao adicionarem ao solo os extratos de folhas de mamona (*Ricinus communis*), observaram um efeito nematicida sobre *M. javanica*, reduzindo a eclosão de juvenis e a formação de galhas radiculares. Entretanto, os autores notaram que, ao final de 60 dias, o número de galhas e a eclosão de juvenis aumentaram; sugerindo que tal efeito poderia ser devido à degradação do componente tóxico. Rich, Rahi e Opperman (1989) também observaram que o extrato de mamona possui atividade nematicida por possuir certos compostos, como a ricina, que poderiam ser usados no controle de *M. incognita*.

Chatterjee et al. (1982) testaram extratos aquosos de manjerição (*Ocimum sanctum* e *O. basilicum*) quanto a mortalidade de juvenis de segundo estágio (J₂) de *M. incognita*. Os autores verificaram que os extratos mataram os J₂ e que o eugenol e o linalol foram os compostos ativos responsáveis pela ação nematicida.

Khurma e Singii (1997) encontraram efeito tanto na mortalidade quanto na eclosão de J₂ de *M. incognita* e *M. javanica*, quando usaram extrato de sementes de sesbani (*Sesbania sesban*).

Abid et al. (1997) testaram 60 extratos etanólicos de plantas contra J₂ de *M. javanica*. Verificaram a mortalidade de 100% dos nematoides quando expostos por 72 horas aos extratos de fruta-do-conde (*Annona squamosa*), bruta (*Cocculus pendulus*), trombeta-roxa (*Datura fastuosa*) e *Solanum surattense*.

Dias et al. (2000) obtiveram extratos aquosos pela maceração e infusão de arruda (*Ruta graveolens*), Artemísia (*Artemisia verlotorum*), bardana (*Arctium lappa*), capim cidreira (*Cymbopogon citratus*), catinga de mulata (*Tanacetum vulgare*), confrei (*Symphytum officinalis*), erva de bicho (*Polygonum acre*), fedegoso (*Senna occidentalis*), hortelã (*Mentha* spp.), lantana (*Lantana camara*), losna (*Artemisia absinthium*), malva (*Malva silvestris*), mamona (*Ricinus communis*), melão de São Caetano (*Momordica charantia*), mentrasto (*Ageratum conyzoides*) e mil folhas (*Achilea millefolium*) foram avaliados quanto a atividade nematostática e nematicida sobre J₂ de *M. incognita*. Os autores verificaram que os extratos que apresentaram maior atividade nematicida foram os macerados de mentrasto, bardana, artemísia, losna, confrei e catinga de mulata e a infusão de catinga de mulata e melão de São Caetano.

Amaral et al. (2001) prepararam extratos metabólicos de 12 diferentes espécies vegetais para serem submetidas a testes *in vitro* de motilidade e mortalidade de J₂ de *M. exigua*. Os melhores resultados foram obtidos com o extrato de cebola (*Allium cepa*). O extrato provocou considerável redução no número de galhas, sem qualquer efeito fitotóxico sobre as mudas avaliadas.

Costa et al. (2002) aplicaram extratos de capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*), café-arábico (*Coffea arabica*), leucena (*Leucaena leucocephala*), mentrasto (*Chenopodium ambrosioides*), mamona (*Ricinus communis*) e arruda (*Ruta graveolens*) em plantas de tomate infestadas por *M. incognita* para estudar seus efeitos na patogenicidade e na reprodução desse patógeno *in vivo*. Os extratos de tecidos de plantas de *Brachiaria decumbens*, *Coffea arabica* e *Leucaena leucocephala* reduziram a produção de ovos, mas em altas dosagens reduziram, também, o peso da matéria fresca da parte aérea dos tomateiros. Aplicações de extratos de tecidos de *Chaenopodium ambrosioides* e de *Ricinus communis* reduziram também o peso da matéria fresca da parte aérea e causaram alta toxicidade às plantas em desenvolvimento.

Salgado e Campos (2003) avaliaram a eclosão e mortalidade de J₂ de *M. exigua* em extratos aquosos de urucum-colorau (*Bixa orellana*), cravo-da-índia

(*Syzygium aromaticum*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), pimenta-do-reino (*Piper nigrum*), gengibre (*Zingiber officinale*) e salsa (*Petroselinum crispum*). Os extratos de canela causaram 100% de mortalidade após 24 h do contato dos J₂ com os extratos. Mortalidade acima de 50% ocorreu nos extratos de cravo-da-índia. Os demais materiais testados foram estatisticamente iguais à água. A eclosão foi avaliada durante 16 dias de imersão dos ovos de *M. exigua* nos extratos. Comparando os valores da área abaixo da curva de progresso da eclosão, observou-se que todos os extratos inibiram a eclosão dos J₂ de *M. exigua*. Entre todos os extratos, a maior inibição da eclosão ocorreu para canela e cravo-da-índia.

Rocha, Campos e Silva (2004) estudaram o efeito de extratos de cultura de células de alfafa (*Medicago sativa*), batata doce (*Ipomoea batatas*), insulina (*Cissus sicyoides*), funcho (*Foeniculum vulgare*), fumo (*Nicotiana tabacum*), mostarda (*Brassica rapa*), orquídea (*Dendrobium nobile*), tomate (*Solanum esculentum*) e *Crotalaria juncea* na eclosão, mobilidade e mortalidade de J₂ de *M. incognita*. Os autores constataram que todos os extratos de cultura de células inibiram a eclosão dos J₂ em comparação com a água (testemunha) após sete dias de incubação, com maior inibição para os extratos de tomate, fumo, crotalária, mostarda, funcho e alfafa. Ovos incubados por 96 h nos extratos de alfafa e batata doce tiveram menor número de J₂ eclodidos. A exposição do J₂ por 24h nos extratos causou maior imobilização e mortalidade, com maior imobilização naqueles oriundos de insulina, crotalária, alfafa, batata doce, mostarda e funcho.

Rocha e Campos (2004) verificaram o efeito de exsudatos de cultura de células de tomateiro (*Solanum esculentum*), cafeeiro (*Coffea arabica*), alfafa (*Medicago sativa*), orquídea (*Dendrobium nobile*), mostarda (*Brassica rapa*), batata doce (*Ipomoea batatas*), fumo (*Nicotiana tabacum*), cenoura (*Daucus carota*) e *Crotalaria juncea* em J₂ de *M. incognita*. Os autores observaram que a exceção dos ovos incubados em exsudato de orquídea, todos os demais inibiram a eclosão quando comparados com a incubação em água (testemunha). Entretanto, nos exsudatos de tomateiro, cafeeiro e *C. juncea* a inibição foi mais drástica. Todos os exsudatos reduziram a mobilidade e aumentaram a mortalidade, com maior intensidade em 24 h de exposição. Porém, a maior redução na mobilidade ocorreu nos exsudatos de tomateiro e alfafa, enquanto a maior mortalidade foi no exsudato de tomateiro, seguida pelo de mostarda.

Lopes et al. (2005), avaliaram o efeito dos extratos aquosos de folhas e de sementes de mucuna preta (*Mucuna pruriens*) e de folhas de manjeriço (*Ocimum basilicum*) sobre o parasitismo de *M. incognita* e *M. javanica* em tomateiros. Os extratos foram aplicados de três modos distintos: pulverização foliar, tratamento de sementes e adição ao solo. A pulverização dos extratos de mucuna preta e manjeriço reduziram o número de galhas de *M. incognita* em raízes de tomateiro, em relação à testemunha. O tratamento de sementes com os extratos não afetou significativamente a altura e o peso da parte aérea das plantas, nem a formação de galhas dos nematoides. Apenas a reprodução de *M. javanica* foi reduzida pela adição dos extratos de sementes mucuna no solo.

Coimbra et al. (2006) avaliaram o efeito nematostático e nematicida de extratos aquosos de bulbilhos de alho (*Allium sativum*), folhas de mandioca (*Manihot esculenta*), folhas e sementes de mamão (*Carica papaya*), folhas de hortelã (*Mentha piperita*) e casca de gliricídia (*Gliricidia sepium*) em *Scutellonema bradys*. Todos os extratos vegetais inibiram a mobilidade e causaram mortalidade ao fitonematoide *S. bradys*. Os extratos de hortelã e de mandioca causaram menos de 45% de mortalidade ao finematóide. As maiores porcentagens de mortalidade foram causadas pelos extratos de sementes e folhas do mamoeiro e pelos bulbilhos de alho.

Gardiano (2006) aplicou extratos aquosos de hortelã (*Mentha* spp), bardana (*Arctium lappa*) e mamona (*Ricinus communis*) via adição ao solo e observou a redução no número de galhas em 75,6%, 65,7% e 54,4% e o número de ovos em 81,7%, 75,9% e 56,6%, respectivamente. O autor conclui que extratos aquosos adicionado ao solo, representam uma opção prática e de baixo custo para o pequeno produtor no controle de fitonematoides.

Nasu (2008) estudou a ação nematicida de manipueira - líquido de aspecto leitoso, obtido através do processamento de raízes de mandioca – sobre *M. incognita* em ensaios *in vitro*. Os tratamentos foram manipueira industrial 100%, e diluições em água a 75%, 50%, 25%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4% e 2%, além da testemunha com água e o nematicida Carbofuran a 50 mg L⁻¹. Os resultados demonstraram que os tratamentos com manipueira (10% de diluição) foram superiores aos demais, não diferindo estatisticamente entre si e apresentando 100% de mortalidade *in vitro*. A suspensão nematicida mostrou-se superior à testemunha com água.

Gardiano et al. (2009) avaliaram a adição ao solo dos extratos aquosos de 20 espécies de plantas - artemísia (*Chrysanthemum parthenium*), bardana (*Arctium lappa*), capim cidreira (*Cymbopogon citratus*), carqueja (*Bacharis trimera*), cavalinha (*Equisetum* sp.), cinamomo (*Melia azedarach*), hortelã (*Mentha* sp.), mamona (*Ricinus communis*), manjeriço (*Ocimum basilicum*), melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia*), arruda (*Ruta graveolens*), falso-boldo (*Coleus barbatus*), confrei (*Symphitum officinalis*), erva-de-bicho (*Polygonum acre*), feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), funcho (*Foeniculum vulgare*), guiné (*Petiveria alliacea*), mentrasto (*Ageratum conyzoides*), mucuna-cinza (*Mucuna pruriens*) e nim (*Azadirachta indica*) - sobre a população de *Meloidogyne javanica* em plantas de tomateiro, em casa de vegetação. Os autores verificaram que os extratos de hortelã, bardana e mamona reduziram o número de galhas em 75,6%, 65,7% e 54,4%, e o número de ovos em 81,7%, 75,9% e 56,6%, respectivamente.

Dos Santos et al. (2009) testaram extratos aquosos de 18 plantas do cerrado no estado da Bahia quanto à toxicidade frente a *M. javanica* em tomateiro (*Solanum esculentum*). Os autores avaliaram a ação dos extratos sobre o crescimento de tomateiros, mobilidade e mortalidade de J₂ e reprodução de *M. javanica*. Todos os extratos vegetais testados reduziram significativamente o número de galhas em raízes de tomateiro, com variações de 21,9 % a 73,81 %. Quatorze extratos vegetais reduziram significativamente o número de massas de ovos em tomateiros, reduções estas que variaram de 7,4 % a 54,0 %. Sessenta por cento destes aumentaram a matéria seca em relação à testemunha. Com exceção do extrato de chifre de cabra (*Himatanthus obovatus*), todos os outros inibiram a mobilidade dos nematoides. Índices de 100 % de mortalidade foram observados para os extratos de flor amarela (*Turnera* cf. *simularis*) e ipê roxo (*Tabebuia avellanedae*).

Neves et al. (2009) avaliaram a atividade nematicida de extratos dos frutos de pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*), plantas de mostarda (*Brassica campestris*), de bulbos de alho (*Allium sativum*) e óleo de mostarda sobre *Meloidogyne javanica*, em tomateiro. Os extratos clorofórmico e cetônico de pimenta malagueta e o óleo de mostarda apresentaram melhor controle do nematoide, diferindo estatisticamente da testemunha quanto ao número de galhas. Porém, somente o óleo de mostarda reduziu significativamente o número de ovos quando comparado com a testemunha.

Lanza et al. (2010) estudaram o efeito dos extratos de folhas, caule e raiz de chá da Índia (*Capraria biflora*) sobre a eclosão e mortalidade de J₂ de *Meloidogyne javanica in vitro* com três diferentes métodos de preparação de extratos (infusão, pó dissolvido em água e trituração em liquidificador). Os autores verificaram que, independentemente do método de extração, o órgão vegetal que proporcionou menor eclosão dos juvenis do nematoide, representado pela área abaixo da curva de progresso da eclosão, foi a folha, enquanto que, independentemente do órgão vegetal testado, a 'infusão' proporcionou eclosão significativamente menor que os demais métodos.

Da Silva (2011) verificou que o extrato de capeba (*Pothomorphe umbellata*) teve efeito significativo na mobilidade dos J₂ de *Meloidoyne exigua* comparado à testemunha, com o aumento da concentração do extrato da planta. Com a concentração de 1250 ppm houve redução de 43,2% na mobilidade dos juvenis de *M. exigua*.

3 COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA A

HOSPEDABILIDADE DE PLANTAS MEDICINAIS A *Meloidogyne paranaensis**
(submetido Nematologia Brasileira)

HOSPEDABILIDADE DE PLANTAS MEDICINAIS A *Meloidogyne paranaensis**

Ana Paula do A. Mônaco^{1**}; Rui G. Carneiro², Alexandra Scherer²;

Débora C. Santiago¹

Resumo

Estima-se que, do total de medicamentos consumidos atualmente, cerca de 40 % são de origem natural. No Brasil, este segmento responde por cerca de sete por cento do mercado farmacêutico, envolvendo cerca de 400 milhões de dólares por ano e gerando em torno de 100 mil empregos diretos e indiretos. Os nematoides parasitas de plantas podem comprometer qualitativa e quantitativamente as substâncias ativas das plantas medicinais. No presente estudo, considerando o valor destas plantas, não apenas como recurso terapêutico, mas também como fonte de recursos econômicos, 14 espécies de plantas medicinais foram avaliadas quanto ao comportamento frente ao parasitismo de *Meloidogyne paranaensis*. O trabalho foi dividido em três experimentos, conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com dez repetições. Para tanto, as plântulas foram individualmente inoculadas com suspensão de 5000 ovos e juvenis de segundo estágio (J₂) e mantidas por 60 dias em casa-de-vegetação. Após esse período procedeu-se à extração e contagem de ovos e J₂ dos sistemas radiculares, e os fatores de reprodução (FR) foram estimados. Comportaram-se como suscetíveis ao nematoide estudado: *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare*, *Plectranthus barbatus*, *Solanum esculentum* e *Mentha pulegium*; como resistentes *Taraxacum officinale*, *Matricaria recutita*, *Melissa officinalis*, *Hyssopus officinalis*, *Lippia alba*, *Kalanchoe pinnata* e *Sedum praealtum*; como imunes *Artemisia dracuncululus* e *Petiveria alliacea*.

Palavras-chaves: Reprodução. Resistência. Suscetibilidade. Nematoide-das-galhas.

Summary

It is estimated that, of the total medications consumed currently, around 40 % are of natural origin. In Brazil, this segment answers for about seven per cent of the pharmaceutical market, involving around 400 million dollar per year and generating around 100,000 direct and indirect jobs. The plant-parasitic nematodes can compromise qualitatively and quantitatively healing substances of medicinal plants. In the present study, considering the value of these plants, not only as therapeutic resource, but also as source of economic resources, fourteen species of medicinal plants were evaluated as for resistance the *Meloidogyne paranaensis*. The work was divided in three experiments and conducted in a completely randomized design with ten replications. Thus seedlings were individually inoculated with suspension of 5000 eggs and youthful of second to stadium (J₂) and kept per 60 days in a greenhouse.

* Parte da Tese da primeira autora para obtenção do título de Doutora em Agronomia (Fitopatologia) pela Universidade Estadual de Londrina (PR).

** Autora para correspondência: anapaulamonaco@yahoo.com.br

¹ Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid - BR 445 km 380, Cx. Postal 6001, 86051-990 Londrina (PR) Brasil.

² Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR. Rodovia Celso Garcia Cid - BR 445 km 375, C. Postal 481, 86047-902 Londrina (PR) Brasil.

After that period proceeded to the extraction and counting of eggs and J₂ of the roots systems, and the reproduction factors (RF) were estimated. Behaved as susceptible to nematode studied: *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare*, *Plectranthus barbatus*, *Solanum esculentum* and *Mentha pulegium*; *Taraxacum officinale*, *Matricaria recutita*, *Melissa officinalis*, *Hyssopus officinalis*, *Lippia alba*, *Kalanchoe pinnata* and *Sedum praealtum* as resistant; *Artemisia dracunculus* and *Petiveria alliance* as immune.

Key – words: Reproduction. Resistance. Susceptibility. Root-knot nematodes.

Conteúdo

No Brasil, o uso de plantas medicinais é uma tradição que tem suas origens na cultura indígena. Por centenas de anos têm sido utilizadas para tratar doenças e amenizar dores e incômodos; nos dias atuais, essas plantas ou as substâncias voláteis delas extraídas vem sendo usadas como flavorizantes, aromatizantes e terapêuticos nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (Jorge, 2006). A utilização da fitoterapia está em expansão em todo o mundo. Estima-se que do total de medicamentos consumidos hoje, cerca de 40 % são de origem natural. Os fitoterápicos movimentam anualmente cerca de 22 bilhões de dólares, com crescimento de 12 % ao ano. No Brasil, este segmento responde por cerca de 7 % do mercado farmacêutico, envolvendo cerca de 400 milhões de dólares por ano e gerando em torno de 100 mil empregos diretos e indiretos (Carlini & Rodrigues, 2005). O estado do Paraná é o maior produtor brasileiro de plantas medicinais, sendo responsável pelo abastecimento de 90 % da demanda nacional destes produtos, faturando anualmente cerca de R\$ 25 milhões. Há cerca de 30 propriedades paranaenses que cultivam exclusivamente ervas medicinais, geralmente em sistema orgânico de produção (EMATER, 1998; 2010).

As plantas medicinais podem ser atacadas por nematoides parasitas de plantas, o que pode comprometer qualitativa e quantitativamente suas propriedades curativas e a produção. Dentre estes constatados parasitando plantas medicinais, destacam-se os nematoides de galhas pertencentes ao gênero *Meloidogyne* (Correa *et al.*, 1991). Cesnik (1957); Gaskin (1958); Costa Manso *et al.*, (1985); Goswami & Vijayalakshwi (1986); Haseeb & Pandey (1987); Izquierdo, Huepp & Chacon (1987); Patel *et al.*, (1989); Moura, Régis & Moura (1990); Mesquita, Souza & Mattos (1993); Araujo, Mattos & Souza (1994); Macedo Filho,

Mattos & Souza (1994); Souza, Mattos & Karl (1995); Maciel & Ferraz (1996); Karl et al., (1997); Dias et al., (1998); Prodócimo & Lozano (1998); Souza, Campos & Maximiniano (1998); Park, Kim & Khan (2004); Moreira, Santos & Almeida (2008); Couto, Campos & Gomes (2008); e Mônaco et al. (2008) estudaram a hospedabilidade de diferentes espécies de plantas medicinais a nematóides do gênero *Meloidogyne*. Entretanto, há poucos relatos sobre a hospedabilidade destes vegetais à *M. paranaensis*.

Considerando os valores econômico e terapêutico das plantas medicinais, os danos causados por *Meloidogyne* spp. e a ocorrência generalizada de *M. paranaensis* no estado do Paraná, em propriedades outrora cultivadas com café, o presente trabalho objetivou determinar o comportamento de 14 espécies de plantas medicinais frente ao parasitismo de *M. paranaensis* em casa de vegetação.

Para otimização da instalação e das avaliações, o trabalho foi dividido em três experimentos, em delineamento inteiramente casualizado com dez repetições. No primeiro experimento foram avaliadas as espécies *Ocimum basilicum* (Alfavaca-cheirosa), *Hyssopus officinalis* (Hissopo), *Melissa officinalis* (Erva-cidreira), *Matricaria recutita* (Camomila verdadeira), *Taraxacum officinale* (Dente-de-leão) e *Artemisia dracuncululus* (Estragão), durante o período de 15/10 a 15/12/08, onde a média das temperaturas mínimas foi de 18,15 °C e das máximas de 29,63 °C, sendo a média de 23,40 °C. Durante o segundo experimento (28/11 a 28/01/09) a média das temperaturas mínimas foi de 18,83 °C e das máximas de 29,34 °C, sendo a média de 23,71 °C e foram estudadas: *Plectranthus barbatus* (Boldo), *Origanum vulgare* (Orégano), *Kalanchoe pinnata* (Folha-da-fortuna), *Lippia alba* (Lípia) e *Petiveria alliacea* (Guiné). E no terceiro experimento (09/01 a 09/03/09), com média das temperaturas mínimas de 19,99 °C e máximas de 29,64 °C, sendo a média de 24,15 °C, foram avaliadas *Mentha pulegium* (Poejo) e *Sedum praealtum* (Bálsamo). A escolha das plantas medicinais baseou-se nas espécies de fácil cultivo, ocorrência comum na região de Londrina e importância econômica.

Para obtenção das mudas, sementes certificadas adquiridas das empresas Isla Sementes Ltda. e Feltrim Sementes e estacas foram colocadas para germinar em substrato de areia e terra (2:1, v/v) contidos em vasos plásticos com capacidade para 500 cm³. O substrato foi autoclavado por 2 horas à temperatura de 120 °C. As plântulas obtidas foram transplantadas para outros vasos de mesmo volume e substrato já descrito, mantendo-se uma planta por vaso.

As plantas de poejo, boldo, bálsamo, folha-da-fortuna, lípia, dente-de-leão e guiné, coletadas em canteiros no Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR) foram prensadas, secas, montadas, etiquetadas, registradas e depositadas no herbário da Universidade Estadual de Londrina (UEL), sob números 48474 (guiné), 48473 (lípia), 48475 (boldo), 48890 (bálsamo), 48891 (poejo), 48892 (folha-da-fortuna) e 48893 (dente-de-leão). Não foram coletadas exsiccatas das demais plantas (alfavaca cheirosa, hissopo, erva-cidreira, estragão, orégano, tomate) por serem obtidas a partir de sementes certificadas.

O inóculo inicial de *M. paranaensis* foi obtido a partir de população coletada de raízes de cafeeiro infestado, em campo, o qual foi purificado utilizando-se hospedeiros diferenciadores propostos por Taylor & Sasser (1978), conjugado à técnica de eletroforese para isoenzimas descrita por Carneiro & Almeida (2001). Essa população pura foi mantida em casa de vegetação do IAPAR, em plantas de cafeeiro.

Para utilização nos experimentos, a população pura de *M. paranaensis* ainda foi multiplicada em tomateiros, em casa de vegetação por 60 dias. Em seguida, o inóculo de *M. paranaensis* foi obtido pelo método proposto por Boneti & Ferraz (1981), e ajustado para concentração de 1000 ovos + juvenis de segundo estágio (J_2) / mL. As plantas medicinais foram inoculadas entre 5 e 15 dias após o transplante, de acordo com a taxa de crescimento de cada espécie, com 5 mL da suspensão de inóculo em três orifícios de aproximadamente 2 cm de profundidade, localizados ao redor das plântulas. Plantas de tomateiro (*Solanum esculentum*) 'Rutgers' foram utilizadas como testemunhas da viabilidade dos inóculos de *M. paranaensis*.

As avaliações foram realizadas 60 dias após a inoculação. Para tanto, os sistemas radiculares das plantas foram coletados, separados da parte aérea, lavados cuidadosamente e então processados pela técnica de Boneti & Ferraz (1981) para extração dos ovos. A quantificação dos ovos foi feita em câmara de Peters sob microscopia óptica. Com os valores obtidos para o número de ovos foram estimados os fatores de reprodução individuais ($FR = n^\circ$. de ovos e J_2 extraídos / n° . de ovos e J_2 inoculados), e então determinados os FR médios. Foram consideradas resistentes as espécies vegetais com FR médio < 1 , suscetíveis as com $FR \geq 1$ e imunes as com $FR = 0$ (Oostenbrink, 1966). Para a análise estatística

optou-se pela transformação dos dados em $\sqrt{x+1}$. As médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade, após serem submetidas à análise de variância.

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 1. A viabilidade dos inóculos foi confirmada pelo número de ovos produzidos no tomateiro. Comportaram-se como suscetíveis ao *M. paranaensis*: alfavaca cheirosa, orégano, boldo e poejo; como resistentes: dente-de-leão, camomila verdadeira, erva-cidreira, hissopo, lípia, folha-da-fortuna e bálsamo; como imunes: estragão e guiné.

No primeiro experimento, a alfavaca-cheirosa foi suscetível, enquanto as demais foram resistentes ou imune (estragão) (Tabela 1). Dente de leão, camomila verdadeira e erva cidreira apresentaram valores de FR baixos, indicando elevado nível de resistência. Quanto à produção de ovos, a alfavaca-cheirosa produziu maior quantidade em relação às demais, não se observando diferenças estatísticas entre estas.

No segundo experimento (Tabela 1), o boldo e o orégano foram suscetíveis, sendo que a taxa de reprodução do primeiro foi alta, indicando elevada capacidade de multiplicar o nematóide. Embora o orégano também tenha se comportado como suscetível, a produção de ovos em suas raízes foi significativamente menor que a observada no boldo. As demais espécies medicinais foram resistentes, com valores muito baixos de FR, ou imune a exemplo do guiné. Quanto à produção de ovos, não houve diferença estatística entre elas.

No terceiro experimento, o poejo comportou-se como suscetível e o bálsamo como resistente, havendo diferença estatística entre os valores das produções de ovos (Tabela 1).

Embora haja muitos trabalhos publicados sobre a reação de plantas medicinais a espécies de *Meloidogyne* (Cesnik (1957), Gaskin (1958), Costa Manso et al. (1985), Goswami & Vijayalakshwi (1986), Lordello, Lordello & Donalisto (1986), Haseeb & Pandey (1987), Izquierdo et al. (1987), Patel et al. (1989), Moura, Régis & Moura (1990), Mesquita et al. (1993), Araujo et al. (1994), Macedo Filho et al. (1994), Souza, Mattos & Karl (1995), Maciel & Ferraz (1996), Karl et al. (1997), Dias et al. (1998), Prodócimo & Lozano (1998), Souza, Campos & Maximiniano (1998), Park et al. (2004), Moreira et al. (2008) e Couto et al. (2008), apenas Mônaco et al. (2008) estudaram a interação das plantas medicinais com *M. paranaensis*. Das plantas daninhas avaliadas por esses autores algumas são consideradas medicinais, mas

todas foram espécies diferentes das avaliadas no presente trabalho. Isso impossibilita comparações com resultados obtidos por outros autores.

Com relação à reprodução de *M. paranaensis*, as menores quantidades de ovos foram observadas nas plantas de estragão, dente-de-leão, camomila verdadeira, erva-cidreira, hissopo, guiné, lípia, folha-da-fortuna e bálsamo, sendo que estas apresentam maior potencial para redução populacional deste nematoide em condições de campo.

Por outro lado, com base na reprodução de *M. paranaensis*, as espécies com maior potencial de incremento populacional deste nematoide nas raízes foram tomate, alfavaca cheirosa, boldo e poejo.

Embora não tenha sido determinado o número de ovos por grama de raízes, uma vez que as mesmas não foram pesadas em função das espécies apresentarem diferenças morfológicas não passíveis de comparação, a baixa população observada em algumas espécies não está associada à falta de sítios de alimentação, mas sim ao comportamento de resistência das plantas, uma vez que as raízes estavam com adequado estado de desenvolvimento quando avaliadas, sem sinais de perda de tecido vegetal por necroses ou podridões.

Os resultados obtidos indicam que estragão, dente-de-leão, camomila verdadeira, erva-cidreira, hissopo, guiné, lípia, folha-da-fortuna e bálsamo podem ser cultivados em áreas infestadas por *M. paranaensis*, uma vez que possivelmente sofreriam poucos danos (Tabela 1). É possível, entretanto, que mesmo sendo desfavoráveis à reprodução do nematoide venham a ter seu desenvolvimento prejudicado em campo, uma vez que estas plantas podem ser sensíveis a baixas populações do nematoide. Quanto à eficiência na redução da população do nematóide no solo, as espécies vegetais em que se observaram valores menores do FR serão mais eficientes.

Em relação a alfavaca cheirosa, boldo e poejo, que foram suscetíveis, estas possivelmente poderão ter seu desenvolvimento vegetativo prejudicado em virtude do parasitismo do nematoide, embora a avaliação em campo possa mostrar reações de tolerância. Ainda em relação a essas espécies vegetais, é possível prever que seus cultivos em áreas infestadas por *M. paranaensis* aumentem a população do mesmo no solo, sendo que este aumento deverá ser proporcional ao aumento no fator de reprodução.

Literatura Citada

- ARAUJO, W.P.; MATTOS, J.K.A.; SOUZA, R.M. 1994. Fontes de resistência a *Meloidogyne javanica* entre procedências de *Pfaffia glomerata*. **Fitopatologia Brasileira**, v.19, p. 322-323.
- BONETI, J.I.S. & S. FERRAZ. 1981. Modificação do método de Hussey & Barker para a extração de ovos de *Meloidogyne exigua*, em raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.6, n.3, p. 553.
- CARLINI, E.L.A. & E. RODRIGUES. 2005. Plantas medicinais do Brasil: o pesquisador brasileiro consegue estudá-las? **Revista Fitos**, v.1, n.2, p. 8-18.
- CARNEIRO, R.M.D.G. & M.R.A. ALMEIDA. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides de galhas para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**, v.25, n.1, p.35-44.
- CESNIK, R. 1957. Dois nematódeos parasitando *Tropaeolum majus* L. **Revista de Agricultura**, v.32, n.4, p. 253-260.
- CORREA JÚNIOR, C., L.C. MING & M.C. SCHEFFER. 1991. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. Curitiba: Emater. p.162.
- COSTA MANSO, E.S.B.G.; MATTOS, J.K.A.; TENENTE, R. C.V. 1985. Suscetibilidade de plantas medicinais a *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v.9, n.25, p. 25-26.
- COUTO M.E.O.; CAMPOS E.M.B.; GOMES C.B. 2008. **Ocorrência do nematóide das galhas (*Meloidogyne* spp.) em plantas medicinais no Rio Grande do Sul. *Tropical Plant Pathology*. 33.ed (Suplemento- Ago). Brasília: Brazilian Phytopathological Society.**
- DIAS, C. R.; MACIEL, S. L.; VIDA, J. B., SCAPIM, C. A. 1998. Efeito de quatro espécies de plantas medicinais sobre *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949 em cultivo protegido. **Nematologia Brasileira**, v.22, n.2, p. 58-65.
- EMATER. 1998. Paraná é o maior produtor de plantas medicinais do Brasil e cultiva mais de cem espécies diferentes. Informativo **Vida no Campo**, v.1, v.3, p. 8. (Encarte técnico).
- EMATER. 2010. Plantas medicinais aromáticas e potenciais. Disponível em: <<http://www.emater.pr.gov.br/emater.php?emater=1&mid=76>> Acesso em: 18 maio 2010.
- GASKIN, T.A. 1958. Weed hosts of *Meloidogyne incognita* in Indiana. **Plant Disease Reporter**, v.42, n.6, p. 802-803.
- GOSWAMI, B. K.; VIJAYALAKSHWI, K. 1986. Efficacy of some plants material and non-edible oilseed cakes against *Meloidogyne incognita* on tomate. **Indian Journal of Nematology**, v.16, n.2, p.280-281.

HASEEB A.; PANDEY R. 1987. Incidence of root-knot nematodes in medicinal and aromatic plants--new host records. **Nematropica**, v.17, n.2, p. 209-212.

INSTITUTO DE BOTÂNICA. 1989. Pteridófitas e Fanerógamas. In: INSTITUTO DE BOTÂNICA. Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico. São Paulo, Governo do Estado de SP Secretaria do Meio Ambiente Instituto de Botânica, p. 32-55.

IZQUIERDO, J. E.; HUEPP, G.; CHACON, L. 1987. Detección de nematodos del género *Meloidogyne* em malezas asociadas a los cafetales. **Ciencia Técnica Agrícola**. v.9, n.1, p. 47-54.

JORGE, M.H.A. 2006. **Canteiros de plantas medicinais para multiplicação**. Corumbá: Embrapa Pantanal, p. 1-3.

KARL A.C.; SOUZA R. M., MATTOS J. K. 1997. A patogenicidade de *Meloidogyne javanica* em quatro espécies de plantas medicinais. **Horticultura Brasileira**.v.15, n.2, p.118-121.

LORDELLO, R.R.A.; LORDELLO, A.I.L.; DONALISIO M. G.R. 1986. Nematoides das galhas dificultam a produção de mudas de jaborandi. **Bragantia**, v.45, n.1, p. 195-197.

MACEDO FILHO, B.F.; MATTOS, J.K.A.; SOUZA, R.M. 1994. Susceptibilidade de doze germoplasmas de *Mentha* a *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**. v.18, n.11.

MACIEL, S.L. e FERAZ, L.C.C.B. 1996. Reprodução de *Meloidogyne incognita* raça 2 e de *Meloidogyne javanica* em oito espécies de plantas medicinais. **Scientia Agrícola**, v.53, n.2/3, p. 232-236.

MESQUITA, R.L.; SOUZA, R.M.; MATTOS, J.K.A. Susceptibilidade de plantas medicinais a *Meloidogyne incognita*. 1993. **Nematologia Brasileira**, v.17, p. 17.

MÔNACO, A.P., R.G. CARNEIRO, W.M. KRANZ, J.C. GOMES, A. SCHERER, K.C. NAKAMURA, M.P. MORITZ & D.C. SANTIAGO. 2008. Reação de Espécies de plantas daninhas a *Meloidogyne paranaensis*. **Nematologia Brasileira**. v.32, n.4, p. 279 - 283.

MOREIRA F.J.C.; SANTOS C.D.G., ALMEIDA A.M. 2008. Hospedabilidade de plantas ornamentais e medicinais a *Meloidogyne incognita* raça 2. **Tropical Plant Pathology**. v.33 (Suplemento).

MOURA, R. M.; RÉGIS, E. M. O.; MOURA, A. M. 1990. Reação de dez espécies de plantas, algumas produtoras de óleos essenciais, em relação ao parasitismo de *Meloidogyne incognita* raça1 e *M. javanica*, em população mista. **Nematologia Brasileira**, v.14, p. 39-44.

OOSTENBRINK, M. 1966. **Major characteristic of the relation between nematodes and plant**. Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen - Nederland, 46 p.

PARK, S. D.; KIM, J. C.; KHAN Z. 2004. Host status of medicinal plants for *Meloidogyne* hapla. **Nematropica**, v.34, n.1, p. 39-43.

PATEL C. C. et al. 1989. Relative susceptibility of certain medicinal and aromatic plants to root-knot nematodes. **Pakistan Journal of Nematology**, v.7, n.2, p. 81-82.

PRODOCIMO, V.; LOZANO, L.A.L. 1998. Ocorrência de *Meloidogyne* Goeldi, 1887 (Tylenchida: Heteroderidae) em plantas medicinais na região metropolitana de Curitiba, PR. **Agrárias**. v.17, n.1/2, p. 171-175.

SOUZA J. T., CAMPO, V. P., MAXIMINIANO, C. 1998. Ocorrência e distribuição de nematoides associados a hortaliças e plantas medicinais. **Summa Phytopatologica**, v.24, n.3/4, p. 283-291.

SOUZA, R. M.; MATTOS, J. K. A.; KARL, A.C. 1995. Avaliação preliminares da reação de plantas medicinais a *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*. **Horticultura Brasileira**, v.13, n.2, p. 209-211.

TAYLOR, A.L. & J.N. SASSER. 1978. **Biology, identification and control of the root-knot nematodes** (*Meloidogyne* species). Cooperative Publications of University North Carolina & USAID, Raleigh - EUA, 111p.

Tabela 1 - Número de ovos, fator de reprodução (FR) e reação (S = suscetível, R = resistente, I = imune) de plantas medicinais inoculados com *Meloidogyne paranaensis*, após 60 dias em casa de vegetação.

Espécie	Nome vulgar	Nº. de ovos ¹		FR	Reação
Experimento 1					
<i>Solanum esculentum</i>	Tomate	56280*	a	11,26	S
<i>Ocimum basilicum</i>	Alfavaca-cheirosa	10020	b	2,00	S
<i>Hyssopus officinalis</i>	Hissopo	3044	c	0,61	R
<i>Melissa officinalis</i>	Erva-cidreira	1028	c	0,21	R
<i>Matricaria recutita</i>	Camomila verdadeira	680	c	0,14	R
<i>Taraxacum officinale</i>	Dente-de-leão	57	c	0,01	R
<i>Artemisia dracuncululus</i>	Estragão	0	c	0,00	I
CV (%)		71,55			
Experimento 2					
<i>Solanum esculentum</i>	Tomate	197228	a	39,45	S
<i>Plectranthus barbatus</i>	Boldo	124900	b	24,98	S
<i>Origanum vulgare</i>	Orégano	12625	c	2,53	S
<i>Kalanchoe pinnata</i>	Folha-da-fortuna	340	d	0,07	R
<i>Lippia alba</i>	Lípia	266	d	0,05	R
<i>Petiveria alliacea</i>	Guiné	0	d	0	I
CV (%)		32,71			
Experimento 3					
<i>Solanum esculentum</i>	Tomate	48120	a	9,62	S
<i>Mentha pulegium</i>	Poejo	21685	b	4,33	S
<i>Sedum praealtum</i>	Bálsamo	3828	c	0,76	R
CV (%)		35,27			

*Média de dez repetições. ¹Médias seguidas de mesma letra na coluna e no mesmo experimento não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %.

4 ARTIGO B

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha pulegium* L. EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha pulegium* L. EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO

4.1 Resumo

Esta pesquisa visou comparar o teor e a composição do óleo essencial de *Mentha pulegium* em diferentes estágios de desenvolvimento, em condições controladas, utilizando análises por cromatografia gasosa (CG) e cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG / EM). A hidrodestilação de folhas frescas de *M. pulegium* coletadas aos 60, 70 e 85 dias após o transplântio (DAT) apresentaram rendimento do óleo essencial de 0,17%, 0,23% e 0,17%, respectivamente. As análises de CG e CG / EM revelaram diferenças qualitativas e variação na proporção dos componentes do óleo. O mentofurano (0,21%; 0,33%), mirtenal (1,2%; 5,49%) e metil éter coahuilensol (1,2%, 1,08%) foram detectados apenas nas amostras do primeiro e segundo estágios de desenvolvimento (60 e 70 DAT). As concentrações dos principais compostos variaram nos três estágios de cultivo da planta. A concentração do pulegona aumentou de 26,65% nas amostras das duas primeiras coletas para 31,05% na amostra da terceira coleta. A piperitenona (36,32%) foi o componente principal da última coleta. Todas as amostras de óleo essencial obtidas nos três estágios distintos de *M. pulegium* mostraram atividade antimicrobiana contra *Cladosporium herbarum*, apresentando três áreas de inibição do fungo com valores de $R_f = 0.80$; 0,85 e 0,90.

Palavras-chaves: *Cladosporium herbarum*. CG/EM. Poejo. Pulegona. Bioautografia.

Abstract

This study aimed to compare the oil content and composition from leaves obtained in different stages of development in controlled conditions, using GC and GC/ME analysis. Hydrodistillation of fresh leaves of *Mentha pulegium* collected in the three different periods of cultivate (60, 70 and 85 days) afforded the oil essential in 0,17%; 0,23% e 0,17% yield, respectively. The GC and GC/ME analyses revealed qualitative differences and a variation in the proportions of the oil components. The menthofuran (0.21%; 0.33%), myrtenal (1.2%; 5.49%), coahuilensol methyl ether (1.2%, 1.08%) were detected in only sample of the first and second developmental stages (60 and 70 DAT). The concentrations of the compounds varied across the three main stages of the crop. The concentration of the pulegone was increased from 26.65% in the early stages to 31.05% in climaterio stage, however, piperitenone (36.32%) was the main compound in this last stage. All samples of essential oil obtened in the three distinct stages of *M. pulegium* showed antimicrobial activity against *Cladosporium herbarum*, featuring three areas of inhibition of the fungus with values of $f = 0.80$, 0.85 and 0.90.

Key – words: *Cladosporium herbarum*. GC /ME. Pennyroyal. Pulegone. Bioautography.

4.2 INTRODUÇÃO

O gênero *Mentha* (Lamiaceae) compreende aproximadamente 30 espécies e 13 híbridos (DORMAN et al., 2003) que produzem óleos essenciais ricos em monoterpenos. A biossíntese dos monoterpenos ocorre especificamente em tricomas glandulares, principalmente de folhas e cálices florais (LAWRENCE, 1992) e depende, além dos fatores genéticos, também dos fatores fisiológicos e ambientais (FREITAS, MARTINS e VIEIRA, 2004).

Os óleos essenciais obtidos de plantas do gênero *Mentha* têm significativa importância econômica, verificando-se que do total da produção mundial de óleos essenciais, estimada em 110.000 a 120.000 toneladas ao ano (KOTHARI, 2005), 22.200 toneladas vêm de espécies do gênero *Mentha*, sendo 20.000 toneladas para obtenção de óleos ricos em mentol e mentona, 2.000 toneladas para obtenção de óleo rico em carvona e 200 toneladas para obtenção de óleo rico em linalol e acetato de linalina (SANT SANGANERIA, 2005).

A espécie *Mentha pulegium* L. é conhecida por diversos nomes populares como poejo, poejo-das-hortas, menta-selvagem, puejinho, poleo, pennyroyal, entre outros. Ao óleo essencial da planta, são atribuídas propriedades mucolítica, anticatarral, tônica e estimulante, hipertensiva e cardiotônica, carminativa, estimulante hepatobiliar e emenagoga, com indicação para tratamento de bronquite catarral crônica, bronquite asmática, coqueluche, leucorréia e dismenorréia (LORENZI e MATOS, 2008). Por outro lado, vários registros da literatura comprovaram as atividades inseticida (FRANZIOS et al., 1997; AZIZ e ABBASS, 2010; MIGUEL et al., 2010), antibacteriana (SIVROPOULOU et al., 1995; SARAC; UGUR, 2009; JAZANI, GHASEMNEJAD-BERENJI; SADEGPOOR, 2009; ELHOUSSINE, ZINEB; ABDELLATIF, 2010; HAJLAOUI et al., 2010), antifúngica (MUELLER-RIEBAU, BERGER; YEGEN, 1997; HMIRI et al., 2011), acaricida (LU, 2010) e antioxidante (KAMKAR et al., 2010) do óleo essencial de *M. pulegium*. Embora haja diversos estudos sobre a composição do óleo de *M. pulegium* oriundo de diferentes regiões Zwaving e Smith (1971), Frazao, Domingues e Souza (1974), Proença da Cunha, Roque e Cardoso do Vale (1976), Aiquel, Bravo e Retamar (1977), Pino, Rosado e Fuentes (1996), Lorenzo et al. (2002), Aghel et al. (2004), Agnihotri et al. (2005), Kokkini et al. (2004), Stoyanova et al. (2005), Sá et al. (2007), Cook et al. (2007), Mkaddem, Boussaid e Fadhel (2007), Mahboubi e Haghi (2008),

Ribeiro e Diniz (2008), Kamkar et al. (2010), existem poucos trabalhos sobre a espécie cultivada no Brasil (DE SOUZA, 1950; OLIVEIRA et al., 2011) e apenas um relato sobre a variação da composição do óleo ao longo do ciclo de vida da planta oriunda do Japão (FUJITA; FUJITA, 1970). Portanto, a presente pesquisa objetivou avaliar a variação da composição química do óleo essencial, ao longo do ciclo de desenvolvimento, de *M. pulegium*, em casa de vegetação, no Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), na cidade de Londrina, estado do Paraná, Brasil, assim como a atividade do óleo contra o fungo *Cladosporium herbarum* em teste de autobiografia em placas cromatográficas de gel de sílica.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Cultivo de *Mentha Pulegium*

As mudas de *M. pulegium* foram produzidas a partir de matrizes de plantas coletadas em canteiros do Instituto Agronômico do Paraná - IAPAR, em Londrina-PR, utilizando-se estacas apicais com tamanho de 5 cm.

Para a confirmação da espécie *M. pulegium*, procedeu-se à herborização da mesma segundo recomendações do Instituto de Botânica (1989). Exsiccatas foram coletadas e depositadas no herbário da Universidade Estadual de Londrina (UEL), com o número de depósito 48891.

As estacas foram tratadas com ácido indolbutírico na concentração de 1,5 g/L, através da imersão da porção basal na solução por cinco segundos. Em seguida, as estacas foram enraizadas em caixas de madeira contendo casca de arroz carbonizada e mantidas em câmara de nebulização. Após 15 dias, as estacas enraizadas foram transferidas para vasos plásticos de 500 cm³ de capacidade contendo substrato composto de areia e terra (2:1, v / v) autoclavado por 2 horas a 120°C. Os vasos contendo as estacas foram mantidos em casa-de-vegetação.

A média de temperaturas máximas e mínimas na casa-de-vegetação no período de 14/08/2009 a 13/10/2009 (primeira coleta) foram, 26,11°C e 15,42°C, respectivamente, com média de 20,3°C. Já no período de 14/09/2009 a 23/10/2009 (segunda coleta), a média de temperaturas máximas e mínimas foram, respectivamente, 25,99°C e 15,57°C, com média de 20,35°C, e no período de

24/10/2009 a 07/11/2009 (terceira coleta) a média de temperaturas máximas e mínimas foram, respectivamente, 26,72°C e 16,13°C, com média de 21,03°C.

4.3.2 Coleta do Material Vegetal

As amostras de folhas frescas de *M. pulegium* foram obtidas em três datas diferenciadas. A primeira coleta foi realizada em 13/10/2009, após 60 dias de transplântio em vasos mantidos em casa de vegetação; a segunda coleta foi em 23/10/2009, após 70 dias de transplântio e a terceira se deu em 07/11/2009, após 85 dias de transplântio. Todas as amostras foram colhidas pela manhã, às 8:00h. A escolha das datas de coleta baseou-se na recomendação de Ribeiro e Diniz (2008) de que a colheita do *M. pulegium* deve ser iniciada 2 a 3 meses após o plantio.

4.3.3 Extração do Óleo Essencial

Amostras de folhas frescas de *M. pulegium* (100 g) coletadas nas três diferentes datas foram submetidas ao processo de extração do óleo essencial por hidrodestilação por duas horas, utilizando-se aparelho de Clevenger. As extrações das três amostras foram realizadas em triplicata. Após as extrações, o óleo foi separado da fase aquosa através de extração com diclorometano (4X100mL) em funil de separação. A fase orgânica, após secagem com sulfato de sódio, seguida de filtração, foi concentrada em evaporador rotativo. Foram obtidos em média 0,17g; 0,23g e 0,17g de óleo essencial das folhas das primeira, segunda e terceira coletas, respectivamente.

4.3.4 Análise do Óleo Essencial por Cromatografia Gasosa e por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas

As análises do óleo essencial foram realizadas em aparelho Shimadzu GC-17A, equipado com detector de ionização de chama e coluna capilar de sílica fundida (30m X 0,25mm), com fase estacionária DB-5 (0,25µm de espessura de filme), utilizando nitrogênio como gás de arraste com fluxo de 1,2mL/min. A temperatura foi programada começando em 60°C e, em seguida, aumentado-se 7°C/min até atingir 320°C, mantendo-se esta temperatura constante

por 5 minutos. As temperaturas do injetor e do detector foram 220°C e 300°C, respectivamente. 2,0µL de amostra diluída (1:10 em diclorometano, v/v) foram injetados na taxa de partição do volume injetado de 1:20.

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas foi realizada em aparelho Shimadzu, acoplado a equipamento Shimadzu GC/MS-QP5000, usando coluna capilar de sílica fundida (30 m X 0,25 mm), com fase estacionária DB-1 (0,25µm de espessura de filme) e hélio como gás de arraste com fluxo de 1,2mL/min. A temperatura foi programada começando em 60°C, sendo aumentada de 7 °C/min até atingir 320°C, mantendo-se esta temperatura por 5 minutos. As demais condições cromatográficas foram às mesmas descritas para a análise no aparelho com detector de chama. As condições da espectrometria de massas foram: detector de captura iônica operando por impacto eletrônico, energia de impacto de 70eV, temperatura do separador e fonte iônica de 250°C e fragmentos detectados de 40 a 400 Dalton.

Os constituintes químicos do óleo foram identificados através da comparação de seus espectros de massas com os espectros da literatura (ADAMS, 2007) e da biblioteca NIST98 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg); pela comparação dos índices de retenção (índice de Kovats, IK) dos constituintes do óleo com os registrados na literatura (ADAMS, 2007). Os índices de retenção de Kovats (IK) foram determinados utilizando-se uma curva de calibração de uma série de alcanos injetados nas mesmas condições cromatográficas da amostra. As concentrações dos constituintes do óleo foram calculadas a partir da análise no cromatógrafo a gás com detector de ionização de chamas, relacionando-se a área integral dos picos à área total de todos os constituintes da amostra.

4.3.5 Bioensaio

4.3.5.1 Preparação do isolado de *Cladosporium herbarum*

O isolado do fungo *Cladosporium herbarum* foi repicado em meio inclinado de batata-dextrose-ágar (BDA), contido em tubos de ensaio. Em seguida o material foi incubado por oito dias em estufa BOD à temperatura constante de 28°C para manutenção do microorganismo.

4.3.5.2 Ensaio de bioautografia em cromatografia em camada delgada (CCD)

O teste de bioautografia foi realizado de acordo com o método descrito por Homans e Funnchs (1970). Amostras de 500 µL do óleo essencial obtido de folhas de *M. pulegium* em três diferentes estágios de desenvolvimento foram aplicadas em duas placas cromatográficas de gel de sílica (Merck), eluídas com mistura de diclorometano/acetato de etila 3:1. Uma das placas foi usada como cromatograma de referência e a outra para o teste de autobiografia. Nesta última, foi aplicada, através de borrifador, uma solução nutritiva constituída de 2mL de solução de glicose 30% e 10mL de solução salina, contendo esporos de *C. herbarium* em suspensão. A placa cromatográfica foi colocada em câmara úmida e, em seguida, foi incubada em estufa a 28°C, por três dias. As áreas de inibição do crescimento do micro-organismo foram observadas sob luz ultravioleta de comprimento de onda de 254nm e correlacionadas ao cromatograma de referência.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Composição Química do Óleo Essencial

O óleo essencial foi obtido com rendimentos de 0,17%; 0,23% e 0,17% das amostras de folhas frescas de *Menta pulegium* da primeira (60 dias após o transplântio - DAT), segunda (70 DAT) e terceira (85 DAT) coletas, respectivamente. Os resultados indicaram que não houve variação significativa da quantidade de óleo essencial produzido ao longo dos três estágios de desenvolvimento de *Menta pulegium*, observando-se ligeiro aumento na produção do óleo após 70 dias de cultivo e retorno à concentração das amostras da primeira coleta nas amostras da última coleta. Vários trabalhos da literatura descrevem a obtenção do óleo essencial de *M. pulegium* a partir da planta seca, com rendimentos que variaram de 0,9% a 1,93% (ROMEO; GIUFFRE, 1927; AIQUEL et al., 1977; LORENZO et al., 2002; STOYANOVA et al., 2005; ELHOUSSINE et al., 2010). Entretanto, os resultados obtidos de *M. pulegium* cultivada em Londrina estão de acordo com os obtidos para folhas frescas da espécie, como relatado por Aziz e Craker (2009) que obtiveram rendimento de 0,19% de óleo da planta fresca cultivada em um agrossistema do deserto na região de Nubaria, a oeste do Rio Nilo.

Oliveira et al. (2011) também relatam rendimentos de 0,2% e 0,09% do óleo essencial de *M. pulegium* cultivada no Brasil na primavera e no inverno, respectivamente.

A partir dos cromatogramas obtidos por CG (DIC-detector de ionização de chama) e CG-EM, verificou-se que o óleo da amostra da primeira coleta foi o que apresentou maior diversidade de constituintes, apresentando um total de trinta e cinco compostos, dos quais foram identificados doze. Os óleos das amostras da segunda e da terceira coletas apresentaram ambos vinte constituintes, dos quais foram identificados onze e oito compostos, respectivamente.

Os resultados das análises da composição dos óleos obtidos das amostras nas três coletas de *M. pulegium* são apresentados na Tabela 4.1, onde se observa que do total dos constituintes identificados, sete foram comuns às três amostras analisadas (mentona, *iso*-mentona, *neoisomentol*, pulegona, piperitona, 1,1-dimetoxi-2-nonino e piperitenona), enquanto que outros três constituintes (mentofurano, mirtenal, metilétercoahuilensol) foram detectados somente nas amostras da primeira e segunda coletas, indicando que estes não são sintetizados após 85 dias de cultivo. Entretanto, o mentol não foi detectado no primeiro estágio de desenvolvimento da planta, estando presente somente nos óleos das amostras da segunda e da terceira coletas. Os demais constituintes foram produzidos em períodos específicos, ocorrendo somente em uma das três amostras analisadas.

As análises por CG e CG-EM evidenciaram também a semelhança entre as amostras das três coletas em relação aos constituintes principais, porém as concentrações destes compostos variaram significativamente durante os três estágios de desenvolvimento da planta. Entre os constituintes principais, encontram-se a pulegona e a piperitenona. A pulegona foi o constituinte majoritário nas amostras da primeira e segunda coletas, mantendo a mesma concentração em ambas as coletas. Entretanto, na amostra da terceira coleta, a pulegona foi o segundo constituinte de maior concentração. Embora a concentração da pulegona tenha aumentado significativamente, passando de 26,65% nas amostras das duas primeiras coletas para 31,05 % na amostra da terceira coleta, ela foi ultrapassada pela concentração da piperitenona (36,32%) na amostra desta última coleta. Entre os demais constituintes comuns às amostras das três coletas também se observa o aumento das concentrações ao longo do desenvolvimento da planta, com exceção da piperitenona e do nonino. A concentração do primeiro composto passou de

20,41% no óleo da primeira coleta para 12,60% na amostra da segunda coleta, aumentando para 36,32% no óleo da terceira coleta. Já a concentração do nonino diminuiu drasticamente no último estágio de desenvolvimento da planta.

A pulegona também é descrita como constituinte principal do óleo de *M. pulegium* em inúmeros trabalhos (ANON, 1930; COSTA; DO VALE, 1952; AIQUEL et al., 1977; MONTES et al., 1986; MUELLER-RIEBAU et al., 1997; AGHEL et al., 2004; IN-SOOK; CHA-HO, 2006; AZIZ; ABBASS, 2010). Outros constituintes citados em concentrações significativas após a pulegona são: mentona (FRANZIOS et al., 2007; LORENZO et al., 2002; COOK et al., 2007), isomentona (AZIZ; CRAKER, 2009), piperitona (AGHEL et al., 2004; EL-GHORAB, 2006), neo-mentol (PINO, ROSADO; FUENTES, 1996; CHALCHAT et al., 2000) e 1,8-cineol (MUELLER-RIEBAU et al., 1995), entre outros. Em alguns estudos de óleos de *M. pulegium*, entretanto, a pulegona não ocorre como constituinte majoritário. Chalchat et al. (2000), por exemplo, relataram a mentona como constituinte principal, seguida por pulegona, neomentol e óxido de cariofileno. Zwaving e Smith (1971) estudaram o óleo essencial de *M. pulegium* da Áustria e encontraram como principal componente a piperitona, seguida por limoneno, mentona e neo-mentona, enquanto que a pulegona não foi sequer detectada. Mahboubi e Haghi (2008), por outro lado, descrevem o óleo essencial de *M. pulegium* como pertencente ao quimiotipo piperitona/piperitenona em que os dois compostos ocorreram nas concentrações de 38,0% e 33,0%, respectivamente. Elhoussine et al. (2010) também relataram a piperitona (35,56%) e a piperitenona (21,18%) como principais constituintes do óleo essencial de *M. pulegium* do Marrocos.

Nos estudos do óleo de *M. pulegium* realizados no Brasil, a pulegona aparece como constituinte majoritário. De Souza (1950) relatou a presença de pulegona em uma concentração inferior (9%) às observadas para *M. pulegium* originárias dos Estados Unidos (16-30%) e da União Européia (80-90%). Recentemente, Oliveira et al. (2011) verificaram que o óleo de *M. pulegium* coletada na primavera e no inverno, no município de Ilhéus, região nordeste do Brasil, apresentaram ambos a pulegona como principal constituinte, seguida pelo borneol. A concentração de pulegona foi maior na amostra de óleo obtida na primavera.

Analisando os dados obtidos neste trabalho e os dados da literatura, verifica-se que a composição do óleo de *M. pulegium* depende não só das condições da região onde a planta é cultivada (KOKKINI et al., 2004), mas também

do estágio de crescimento da planta, como constatado também por Fujita e Fujita (1970) que observaram produção abundante de pulegona no estágio inicial de crescimento da planta e após o climatério, enquanto que o L-mentol ocorreu somente no último estágio.

Tabela 4.1 – Constituintes do óleo essencial de *Mentha pulegium*.

Composto	Concentração% Coleta			IK* calculado Coleta			IK literatura
	1**	2	3	1**	2	3	
Mentona	0,47	1,08	1,2	1149	1150	1150	1152
iso-Mentona	0,72	2,33	2,51	1161	1161	1161	1162
Mentofurano	0,21	0,33	ND	1169	1170	-	1164
Mentol	ND	0,74	4,58	-	1175	1175	1171
Neoisomentol	0,58	1,07	3,77	1175	1182	1175	1186
Mirtenal	1,2	5,49	ND	1192	1198	-	1195
Trans-Diidrocarvona	0,99	ND***	ND	1202	-	-	1200
Metilétercoahuilensol	1,2	1,08	ND	1220	1220	-	1221
Pulegona	26,65	26,65	31,05	1237	1237	1237	1237
Piperitona	0,43	2,07	8,38	1246	1252	1249	1252
1,1-dimetoxo-2-nonino	6,23	7,79	1,68	1309	1305	1306	1323
Piperitenona	20,41	12,60	36,32	1345	1345	1346	1343

*IK= Índice de retenção de Kovats

**1 = amostra da 1ª coleta (60 dias após o transplântio); 2 = amostra da 2ª coleta (70 dias após o transplântio); 3 = amostra da 3ª coleta (85 dias após o transplântio)

***ND = não detectado

4.4.2 Atividade Contra *Cladosporium herbarum*

Nos ensaios de bioautografia, as amostras de óleo obtido das três coletas de *M. pulegium* apresentaram três regiões de inibição do crescimento de *Cladosporium herbarum* com valores de $R_f = 0,80$; $0,85$ e $0,90$, indicando que os componentes ativos foram produzidos nos três estágios de desenvolvimento da planta analisados. A atividade do óleo essencial de *M. pulegium* contra *C. herbarum* também foi constatada por Mueller et al. (1995) que relatam a presença de apenas um composto ativo, para o qual encontraram evidências de que se tratava da pulegona, composto este presente em todas as amostras analisadas neste trabalho. A atividade do óleo essencial da espécie também já foi comprovada contra as seguintes espécies de fungos: *Alternaria alternata*, *Penicillium expansum* (HMIRI et

al., 2011); *Botrytis cinerea* (BOUCHRA et al., 2003; DAFERERA, ZIOGAS; POLISSIOU, 2003) e *Fusarium* sp. (DAFERERA; ZIOGAS; POLISSIOU, 2003).

4.5 CONCLUSÕES

A concentração do óleo essencial não variou significativamente nos três estágios de desenvolvimento de *Mentha pulegium* analisados. Quanto à composição do óleo essencial, a modificação mais importante foi a mudança do composto majoritário que, no primeiro e segundo estágios de desenvolvimento da planta era representado pela pulegona, passou a ser a piperitenona no terceiro estágio analisado. Portanto, para se indicar o constituinte principal do óleo essencial de *M. pulegium* há que se mencionar o estágio de crescimento da planta no qual a amostra de óleo foi obtida. O óleo essencial de *M. pulegium* possui potencial de uso como antifúngico por apresentar halos de inibição contra *C. herbarum*.

4.6 REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4. ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2007.

AGHEL, N.; YAMINI, Y.; HADJIAKHOONDI, A.; POURMORTAZAVI, S. M. Supercritical carbon dioxide extraction of *Mentha pulegium* L. essential oil. **Talanta**, Iran, v.62, n.2, p. 407 – 411. 2004.

AGNIHOTRI, V. K.; AGARWAL, S. G.; DHAR, P. L.; THAPPA, R. K.; BALESHWAR KAPAHI, B. K.; SAXENA, R. K.; QAZI, G. N. Essential oil composition of *Mentha pulegium* L. growing wild in the north-western Himalayas India. **Flavour and Fragrance Journal**. Jammu Tawi, India, v.20, n.6, p. 607 – 610. 2005.

AIQUEL, G. R.; BRAVO, A. H.; RETAMAR, J. A. The essential oil of *Mentha pulegium* Linnaeus. **Rivista Italiana Essenze**, Tucuman, Argentina, v. 59, n. 10, p. 541 – 543. 1977.

ANON. Recent investigations on essential oils. **Bulletin of the Imperial Institute**, London, v.28, p. 8 – 27. 1930.

AZIZ, E. E.; ABBASS, M. H. Chemical composition and efficiency of five essential oils against the pulse beetle *Callosobruchus maculatus* (F.) on *Vigna radiata* seeds. **Journal of Agricultural & Environmental Sciences**. Giza, Egypt. v.8, n.4, p. 411 – 419. 2010.

AZIZ, EMAN E.; CRAKER, L. E. Essential oil constituents of peppermint, pennyroyal, and apple mint grown in a desert agrosystem. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**. Cairo, Egypt. v.15, n.4, p. 361 – 367. 2009.

BOUCHRA, C.; ACHOURI, M.; IDRISSE HASSANI, L. M.; HMAMOUCHE, M. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. **Journal of Ethnopharmacology**. Rabat, Morocco. v.89, n.1, p. 165 – 169. 2003.

CHALCHAT, JEAN-CLAUDE; GORUNOVIC, M. S.; MAKSIMOVIC, Z. A.; PETROVIC, S. D. Essential oil of wild growing *Mentha pulegium* L. from Yugoslavia. **Journal of Essential Oil Research**. Aubiere, França. v.12, n.5, p. 598 – 600. 2000.

COOK, C. M.; MALOUPA, E.; KOKKINI, S.; LANARAS, T. Differences between the inflorescence, leaf and stem essential oils of wild *Mentha pulegium* plants from Zakynthos, Greece. **Journal of Essential Oil Research**. Thermi, Greece. v.19, n.3, p. 239 – 243. 2007.

COSTA, A. F; DO VALE, J. C. Essential oil of *Mentha pulegium*. **Noticias Farmaceuticas**. Coimbra, Portugal. v.18, p. 106 – 112. 1952.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp., and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**. Athens, Greece. v.22, n.1, p. 39 – 44. 2003.

DE SOUZA, A. H. Poejo (pennyroyal, *Mentha pulegium*) and its essential oil. **Revista Brasileira de Farmacia**, v.31, p. 257 – 264. 1950.

DORMAN, H. J.; KOSAR, M.; KAHLOS, K.; HOLM, Y.; HILTUNEN, R. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties and cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, California, v.51, n.16, p. 4563-4569. 2003.

EL-GHORAB, AHMED H. The chemical composition of the *Mentha pulegium* L. essential oil from Egypt and its antioxidant activity. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**. Giza, Egypt. v.9, n.2, p. 183-195. 2006.

ELHOUSSINE, D.; ZINEB, B.; ABDELLATIF, B. GC/MS analysis and antibacterial activity of the essential oil of *Mentha pulegium* grown in Morocco. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**. Fes, Morocco. v.6, n.3, p. 191 – 198. 2010.

FRANZIOS, G.; MIROTSOU, M.; HATZIAPOSTOLOU, E.; KRAL, J.; SCOURAS, Z. G.; MAVRAGANI-TSIPIDOU, P. Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Thessaloniki, Greece. v.45, n.7, p. 2690 – 2694. 2007.

FRAZAO, SILVIA; DOMINGUES, A.; SOUSA, M. B. Essential oil of *Mentha pulegium*. Possibilities of the existence of chemical types in *Mentha pulegium*. **Inst. Nac. Invest. Ind.**, Portugal, v.12, p. 4. 1974.

FREITAS, M. S.; MARTINS, M. A.; VIEIRA, I. J. C. Produção e qualidade de óleos essenciais de *Mentha arvensis* em resposta à inoculação de fungos micorrízicos arbusculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.9, p. 887 – 894. 2004.

FUJITA, S.; FUJITA, Y. Essential oils of the genus *Mentha*. Biochemical study of the essential oils of the essential oil of *Mentha pulegium*. **Nippon Nogei Kagaku Kaishi**. v.44, n.7, p. 293 – 298. 1970.

HAJLAOUI, H.; SNOUSSI, M.; NOUMI, E.; ZANETTI, S.; KSOURI, R.; BAKHROUF, A. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils of five Tunisian aromatic plants. **Italian Journal of Food Science**. Monastir, Tunisia. v.22, n.3, p. 320 – 329. 2010.

HMIRI, S.; RAHOUTI, M.; HABIB, Z.; SATRANI, B.; GHANMI, M.; EL AJIJOURI, M. Evaluation of the antifungal potential of the essential oils of *Mentha pulegium* and *Eucalyptus camaldulensis* in biocontrol against fungi responsible for the deterioration of apples in storage. **Bulletin de la Societe Royale des Sciences de Liege**. Rabat, Morocco, v.80, p.824 – 836. 2011.

HOMANS, A. L.; FUNCHS, A. Direct bioautography on thin – layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v.51, p. 327 – 329. 1970.

IN-SOOK, R.; CHA-HO, J. Acaricidal effects of herb essential oils against *Dermatophagoides farinae* and *D. pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae) and qualitative analysis of a herb *Mentha pulegium* (pennyroyal). **The Korean journal of parasitology**. Cheongju, Korea. v.44, n.2, p. 133 – 138. 2006.

INSTITUTO DE BOTÂNICA. Pteridófitas e Fanerógamas. In: INSTITUTO DE BOTÂNICA. **Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico**. São Paulo, Governo do Estado de SP Secretaria do Meio Ambiente Instituto de Botânica. p. 32 - 55. 1989.

JAZANI, N. H.; GHASEMNEJAD-BERENJI, H.; SADEGPOOR, S. Antibacterial effects of Iranian *Mentha pulegium* essential oil on isolates of *Klebsiella* sp. **Pakistan journal of biological sciences**. Urmia, Iran: PJBS, v.12, n.2, p. 183 – 185. 2009.

KAMKAR, A.; JAVAN, A. J.; ASADI F.; KAMALINEJAD, M. The antioxidative effect of Iranian *Mentha pulegium* extracts and essential oil in sunflower oil. **Food and Chemical Toxicology**. v.48, p. 1796 – 1800. 2010.

KOKKINI, S.; HANLIDOU, E.; KAROUSOU, R.; LANARAS, T.. Clinal variation of *Mentha pulegium* essential oils along the climatic gradient of Greece. **Journal of Essential Oil Research**, Thessaloniki, Greece, v.16, n.6, p. 588 – 593. 2004.

KOTHARI, R. The Indian essential oil industry. **Perfumer and flavorist**, v.30, p. 46-50. 2005.

LAWRENCE, B. M. Chemical components of Labiatae oil and their exploitation. In: HARLEY, R.M.; REYNOLDS, T. (Eds.). **Advances in Labiatae science**, Key: Royal Botanic Gardens, 1992. p. 339 - 436.

LORENZI H.; MATOS F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008, 544p.

LORENZO, D.; PAZ, D.; DELLACASSA, E.; DAVIES, P.; VILA, R.; CAÑIGUERAL, S. Essential oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.45, n.4, p. 519 – 524. 2002.

LU, G. **Insecticidal liquid for controlling bedbug**. (Peop. Rep. China). Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu, p. 3. 2010.

MAHBOUBI, M.; HAGHI G. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. **Journal Ethnopharmacology**, v.119, p.325 – 327. 2008.

MIGUEL, M. G.; ALMEIDA, M. L.; GONCALVES, M. A.; FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. M. Toxic effects of three essential oils on *Ceratitidis capitata*. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, Faro, Portugal, v.13, n.2, p. 191 – 199. 2010.

MKADDEM M., BOUSSAID M.; FADHE, N. B. Variability of volatiles in Tunisian *Mentha pulegium* L. (Lamiaceae). **Journal of Essential Oil Research**. v.19, may/june, p. 211 – 214. 2007.

MONTES, M.; VALENZUELA, L.; WILKOMIRSKY, T.; NIEDMANN, C. Determination of pulegone in the essential oil of Chilean *Mentha pulegium* L. **Annales Pharmaceutiques Francaises**. Concepcion, Chile, v.44, n.2, p. 133 -6. 1986.

MUELLER-RIEBAU, FRANK; BERGER, BERNHARD; YEGEN, OKTAY. Chemical composition and fungitoxic properties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Goettingen, Germany. v.43, n.8, p. 2262 – 2266. 1995.

OLIVEIRA, R. A.; SÁ, I. C. G.; DUARTE, L. P.; OLIVEIRA, F. F. Constituintes voláteis de *Mentha pulegium* L. e *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. **Rev. Bras. Pl. Med.** v.13, n.2, p. 165 – 169. 2011.

PINO, J. A.; ROSADO, A.; FUENTES, V. Chemical composition of the essential oil of *Mentha pulegium* L. from Cuba. Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia, Havana, Cuba. **Journal of Essential Oil Research**, v.8, n.3, p. 295 - 296, 1996.

PROENCA DA CUNHA, A.; ROQUE, O. R.; CARDOSO DO VALE, J. Chromatographic and chemical study of the essential oils of *Mentha pulegium* L. of Angola. Cent. Estud. Farm., Inst. Alta Cult., Lisbon, Port. **Boletim da Faculdade de Farmacia de Coimbra**. v.1, n.1 - 4, p. 23 – 36. 1976.

RIBEIRO, P. G. F; DINIZ, R. C. **Plantas Aromáticas e Medicinais: cultivo e utilização**. Londrina: IAPAR, 2008, 218 p.

ROMEO, G; GIUFFRE, U. Essential oils of *Calaminths nepeta* and of *Mentha pulegium*. **Annali di Chimica Applicata**, v.17, p. 87 - 8, 1927.

SÁ, I. C. G. DE; OLIVEIRA, F. F. DE; DUARTE, L. P.; KNUPP, V. F.; OLIVEIRA, R. A. DE. Componentes químicos do óleo essencial do poejo. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E 9ª SEMANA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO DA UESC CIÊNCIAS EXATAS, DA TERRA E ENGENHARIAS, 8., Ilhéus. **Anais...** Ilhéus: PROPP/UESC, 2007.

SANT, S. Vibrant Indian Opportunities for the flavor and fragrance industry. **Perfumer and flavorist**, v.30, p. 24 – 34. 2005.

SARAC, N.; UGUR, A. The in vitro antimicrobial activities of the essential oils of some Lamiaceae species from Turkey. **Journal of Medicinal Food**. Mugla, Turk. v.12, n.4, p. 902 – 907. 2009.

SIVROPOULOU, A.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. Antimicrobial activity of mint essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. School of Biology, Aristotle University, Thessaloniki, Greece, v.43, n.9, p. 2384 – 2388. 1995.

STOYANOVA, A.; GEORGIEV, E.; KULA, J.; MAJDA T. Chemical Composition of the Essential Oil of *Mentha pulegium* L. from Bulgaria. **Journal of Essential Oil Research**, v.17, set./out. 2005.

ZWAVING, J. H.; SMITH, D. Composition of the essential oil of Austrian *Mentha pulegium*. Lab. Pharmacognosy, State Univ., Groningen, Neth. **Phytochemistry** (Elsevier) v.10, n.8. 1971.

5 ARTIGO C

EFEITO DO PARASITISMO DE *Meloidogyne paranaensis* SOBRE O PERFIL DE SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS PRESENTES EM EXTRATOS DE FOLHAS DE *Mentha pulegium* E DESTES SOBRE JUVENIS DE *M. paranaensis*

5.1 Resumo

A biossíntese de metabólitos secundários pode ser ativada durante o crescimento e desenvolvimento da planta, ou durante períodos de estresse causado por ataque de patógenos. Esse fator tem grande influência no valor terapêutico de preparados fitoterápicos. Nos últimos anos, o interesse pela espécie *Mentha pulegium* tem aumentado devido a suas propriedades medicinais. Assim, o objetivo dessa pesquisa foi avaliar o perfil de substâncias fenólicas presentes nos extratos metanólicos das folhas de *M. pulegium* parasitadas e não pelo nematoide *Meloidogyne paranaensis*, assim como o efeito desses extratos sobre a eclosão, mobilidade e mortalidade de juvenis deste nematoide *in vitro*. Para o experimento foi adotado o delineamento experimental inteiramente casualizado, utilizando os níveis de inóculo de *M. paranaensis*: zero e 10000 ovos + J₂/mL e 30 repetições. Para o nível de inóculo zero, foram colocados em cada plântula 10 mL de água e no tratamento com nematoide foram aplicados 10 mL de uma suspensão contendo 1000 ovos + J₂/mL de *M. paranaensis* por plântula. As plântulas foram mantidas por 30, 45 e 60 dias em casa-de-vegetação. Após esse período, foram realizadas a extração e contagem de ovos e J₂ dos sistemas radiculares e os fatores de reprodução (FR) foram estimados. Foi verificado que a reprodução do nematoide aumentou de acordo com o desenvolvimento das plantas de *M. pulegium*, com FRs de 0,061; 0,685; 2,324, respectivamente, em cada data de coleta. Amostras em triplicatas das folhas de *M. pulegium*, inoculadas e não inoculadas com *M. paranaensis*, foram secas e moídas, em seguida foram obtidos seus extratos com metanol à temperatura ambiente. Os extratos metanólicos foram fracionados em coluna de sílica utilizando os solventes diclorometano e metanol. As frações eluídas com metanol foram analisadas por CLAE-DAD visando avaliar o efeito do parasitismo de *M. paranaensis* sobre o perfil de substâncias fenólicas do extrato. A partir da comparação com padrões de compostos fenólicos, foram identificados: ácido ferulico, (-)-epicatequina, ácido caféico e ácido fumárico nos extratos obtidos de plantas sem e com parasitismo. Porém, não foi verificada nenhuma diferença quanto ao perfil de substâncias fenólicas entre as plantas parasitadas e não pelo *M. paranaensis*, indicando que nas plantas de poejo estudadas nesse experimento o parasitismo de *M. paranaensis* não alterou o perfil das substâncias fenólicas. Com relação ao efeito nematicida dos extratos, foi observada ação inibitória *in vitro* do extrato de poejo sobre a eclosão de juvenis de *M. paranaensis*, assim como aumento da mortalidade dos J₂.

Palavras-chaves: Nematoide de galhas. Poejo. Perfil químico. Eclosão. Nematicida.

Abstract

The biosynthesis of secondary metabolites can be activated during the plant growth and development, or during periods of stress caused by pathogens attack. This factor has a major influence in the therapeutically value of phitotherapeutical mixtures. During the last years, the interest for *Mentha pulegium* species has increased due to its medicinal prosperities. So, the goal of this research was to evaluate phenolic substances profile present in metanoic extracts of *M. pulegium* leaves parasited and not by *Meloidogyne paranaensis* nematodes, so as the effect of extracts over juvenile eclosion, mobility and mortality of these nematodes *in vitro*. For the experiment was adopted the entirely experimental design using casualised inoculo levels of *M. paranaensis*: zero and 10000 eggs + J₂/mL and 30 repetitions. For the inoculum level zero, it was placed in each seedlings 10 mL of water and treatment with nematode were applied 10 mL suspension containing 1000 eggs + J₂/mL of *M. paranaensis* by seedlings. The seedlings were maintained for 30, 45 and 60 days in greenhouse. After this period, took place egg count and extraction and root systems and J₂ reproduction factors (RF) were estimated. It was verified that the reproduction of the nematode increased according to the development of plants of *M. pulegium*, with 0.061 RFs; 0.685; 2.324 respectively in each pickup date. Samples in triplicates from the leaves of *M. pulegium*, inoculated and non-inoculated with *M. paranaensis*, were dried and ground, then were obtained their statements with methanol at ambient temperature. The extracts were fractionated in metanólicos silica column using dichloromethane and methanol solvent. The eluted fractions with methanol were reviewed by CLAE-DAD to assess the effect of parasitism of *M. paranaensis* on the phenolic substances profile extract. From the comparison with standards of phenolic compounds, ferulico acid, have been identified: (-)-epicatechin, cafeico acid and fumaric acid in extracts obtained from plants without and with parasitism. However, there was no difference as to the profile verified of phenolic substances among plants that are parasitized and not by *M. paranaensis*, indicating that plants of pennyroyal studied in this experiment the parasitism of *M. paranaensis* did not alter the profile of phenolic substances. In relation to the purpose, of extracts was observed nematicide action *in vitro* inhibitory of pennyroyal extract on the outbreak of juvenile *M. paranaensis*, as well as some effect on the mortality of J₂.

Key – words: Root-knot nematodes. Pennyroyal. Chemical profile. Outbreak. Nematicide.

5.2 INTRODUÇÃO

Os fitonematoides causam enorme prejuízo à agricultura reduzindo as colheitas e a qualidade do produto final, além de limitarem o uso da área e provocarem gastos adicionais com fertilizantes e defensivos agrícolas (AMARAL et al., 2001).

O controle desses parasitas é uma tarefa difícil e o uso de produtos químicos tem sido restrito, pois além de caros, são altamente tóxicos ao meio ambiente e aos seres vivos. O uso de extratos vegetais com propriedades nematicidas no controle de fitonematoides representa mais uma alternativa para os

pequenos produtores sem riscos de contaminação do ambiente (CHITWOOD, 2002). Várias pesquisas têm demonstrado o efeito nematicida dos extratos de diferentes plantas, quando aplicados diretamente ao solo (NANDAL; BHATTI, 1986; RICH, RAHI; OPPERMAN, 1989; CHATTERJEE et al., 1982; KHURMA; SINGII, 1997; ABID et al., 1997; DIAS et al., 2000; AMARAL et al., 2001; COSTA et al., 2002; SALGADO; CAMPOS, 2003; ROCHA, CAMPOS; SILVA, 2004; ROCHA; CAMPOS, 2004; LOPES et al., 2005; COIMBRA et al., 2006; GARDIANO, 2006; NASU, 2008; GARDIANO et al., 2009; SANTOS et al., 2009; NEVES et al., 2009; LANZA et al., 2010; SILVA, 2011).

Dentre os gêneros de nematoides, destaca-se *Meloidogyne* spp. que caracteriza aqueles formadores de galhas (MOURA, 1996). Estes encontram-se amplamente distribuídos em lavouras no Brasil, causando grandes perdas para os produtores e para a economia do país (CAMPOS, 1997). No Paraná, a espécie *M. paranaensis* (CARNEIRO et al., 1996) é de grande importância, devido à distribuição geográfica e pela severidade dos danos causados nas diferentes culturas.

Algumas plantas medicinais, também, possuem princípios ativos que podem atuar na redução populacional dos fitonematoides (COSTA et al., 2002). Segundo Lopes (2004) essas plantas vêm sendo utilizadas por meio da incorporação das partes vegetais, secas ou frescas, ou sob forma de extratos aplicados ao solo.

Entre as espécies vegetais de grande interesse farmacêutico, encontra-se *Mentha pulegium* L., família Lamiaceae, comumente conhecida como poejo. Esta planta é uma erva rasteira, perene, de folhas pequenas e muito aromáticas, lembrando a hortelã. Na medicina popular, é preconizada em afecções respiratórias, como resfriado e tosse, em distúrbios estomacais, e em irregularidades na menstruação, entre outras afecções (MENGUE; MENTZ; SCHENKEL, 2001).

Os principais grupos de metabólitos bioativos relacionados às propriedades medicinais de *M. pulegium* incluem os flavonóides diosmina e hesperidina (LORENZI; MATOS, 2008). Entretanto, até o momento não há relatos na literatura sobre a atuação dessa espécie no controle de nematoides do solo.

Segundo Gobbo-Neto e Lopes (2007) a expressão do metabolismo secundário é influenciada por fatores mecânicos entre outros, aos quais as plantas estão susceptíveis, como invasão por patógenos. Esse fator tem grande influência no valor terapêutico de preparados fitoterápicos. O controle de qualidade e a

padronização de fitoterápicos têm um papel central na obtenção de produtos com constância de composição e propriedades terapêuticas reprodutíveis.

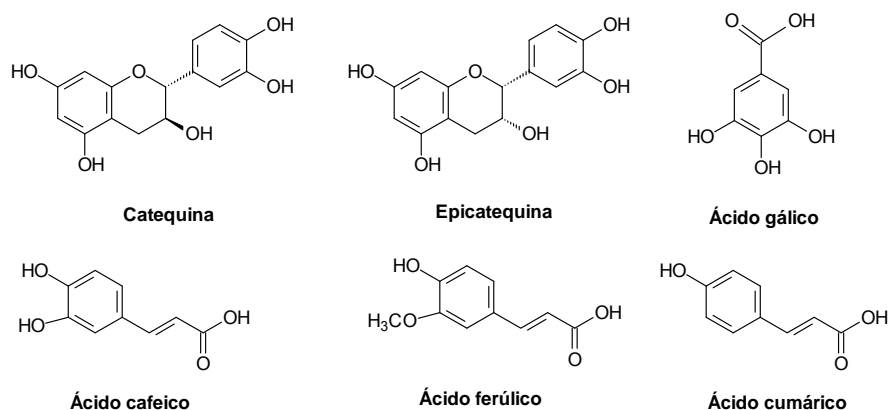
Segundo Martins et al. (1994) os metabólitos secundários produzidos em pequenas quantidades são a expressão da individualidade química dos indivíduos e diferem entre as espécies, qualitativamente e quantitativamente.

Assim, a regulação do metabolismo secundário depende da capacidade genética da planta em responder a estímulos internos ou externos e da existência desses estímulos no momento apropriado. A biossíntese desses metabólitos pode ser ativada durante o estágio de crescimento e desenvolvimento, ou durante períodos de estresse causado por limitação nutricional ou ataque de microorganismos (MANN, 1987).

Os terpenos, compostos fenólicos e os compostos nitrogenados formam as três principais classes de metabólitos secundários das plantas (TAIZ e ZEIGER, 2009).

Os compostos fenólicos contribuem para o sabor, odor e coloração de diversos vegetais. Muitos deles são economicamente importantes quando utilizados como flavorizantes e corantes de alimentos e bebidas (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2003). Podem ser divididos em dois grupos: os flavonóides (polifenóis) e os não flavonóides (fenóis simples ou ácidos), ambos presentes em frutas e vegetais (MELO; GUERRA, 2002; BURNS et al., 2001). A Figura 5.1 mostra as estruturas dos principais compostos fenólicos encontrados em plantas medicinais.

Figura 5.1 – Estruturas de compostos fenólicos: Catequina e Epicatequina (LÔBO et al., 2008), Ácido cafeico (DJOUDI et al., 2007), Ácido cumárico (CORNELIUS et al., 2010), Ácido gálico (DANIEL et al., 2004), Ácido ferúlico (MANACH et al., 2004).



Os principais compostos fenólicos não-flavonóides derivados dos ácidos hidroxicinâmicos são os ésteres dos ácidos caféico, cumárico e ferúlico (MANACH et al., 2004). Quanto aos derivados dos ácidos hidroxibenzóicos, destacam-se o ácido salicílico, gálico, elágico, protocatéico e vanílico (BELITZ; GROSCH, 2004).

Segundo Nicholson e Hammerschmidt (1992), os fenóis produzidos pelas plantas podem ser simples intermediários do metabolismo das plantas, enquanto outros são sintetizados em resposta a uma injúria física, infecção por bactérias, fungos, nematoides, vírus ou qualquer outro tipo de estresse (nutricional, hídrico, poda etc.).

Estudos realizados por Proestos et al. (2005), na Grécia, relatam a presença de compostos fenólicos e flavonóides em *M. pulegium*.

Assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito do parasitismo de *M. paranaensis* no perfil químico de substâncias fenólicas presentes nos extratos metanólicos das folhas de *Mentha pulegium*, bem como determinar o efeito dos extratos apolares sobre a eclosão, mobilidade e mortalidade de juvenis de *M. paranaensis*.

5.3 MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1 Efeito do Parasitismo de *Meloidogyne Paranaensis* sobre o Perfil de Substâncias Fenólicas nos Extratos das Folhas de *Mentha Pulegium* Empregando HPLC-DAD

Obtenção da população de *Meloidogyne paranaensis*: A população inicial do nematoide foi obtida a partir de raízes de cafeeiros infestados no campo. A confirmação da espécie do nematoide foi feita utilizando-se a técnica de eletroforese para isoenzimas, conforme proposto por Carneiro e Almeida (2001). A multiplicação desta população foi feita em tomateiros (*Solanum esculentum*) 'Rutgers', em casa-de-vegetação.

Obtenção de ovos e juvenis de segundo estágio (J₂) de *M. paranaensis*: As raízes de tomateiros 'Rutgers', cultivadas em casa-de-vegetação e infestadas com *M. paranaensis*, foram lavadas cuidadosamente e cortadas em

pedaços de aproximadamente 1,0 cm. A seguir, foram trituradas em liquidificador por 45 segundos em solução de hipoclorito de sódio a 0,5 % e vertidas em peneiras com 0,075 mm de abertura sobre peneira de 0,037 mm de abertura. O material retido na peneira de 0,037 mm foi transferido para um béquer, do qual foram retiradas alíquotas de 1,0 mL para quantificação dos ovos. Para o preparo do inóculo, a suspensão foi calibrada para conter 10.000 ovos+J₂/mL.

Propagação e preparo das mudas: As mudas de *M. pulegium* foram produzidas a partir de matrizes de plantas coletadas em canteiros do Instituto Agrônomo do Paraná - IAPAR, em Londrina-PR, utilizando-se estacas apicais com tamanho de 5 cm. As estacas foram tratadas com ácido indolbutírico na concentração de 1,5 g/L, através da imersão da porção basal na solução por cinco segundos. Em seguida, as estacas foram enraizadas em caixas de madeira contendo casca de arroz carbonizada e mantidas em câmara de nebulização. Após 15 dias, as estacas enraizadas foram transferidas para vasos plásticos de 500 cm³ de capacidade contendo substrato composto de areia e terra (2:1, v / v) autoclavado por 2 horas a 120°C. Os vasos contendo as estacas foram mantidos em casa-de-vegetação. Para a confirmação da espécie *M. pulegium*, procedeu-se à herborização da mesma segundo recomendações do Instituto de Botânica (1989). Exsicatas foram coletadas e depositadas no herbário da Universidade Estadual de Londrina (UEL), com o número de depósito 48891.

Avaliação da reação de *M. pulegium* a *M. paranaensis*: Foi adotado o delineamento experimental inteiramente casualizado com 30 repetições para cada tratamento. Foram utilizados dois níveis de inóculo de *M. paranaensis*: zero e 1000 ovos + J₂/mL. Para o nível de inóculo zero, foram colocados em cada plântula 10 ml de água e no tratamento com nematóide, 10 mL de uma suspensão contendo 1000 ovos + J₂/mL foi colocada em três orifícios de aproximadamente 2 cm de profundidade ao redor das plântulas. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação.

Decorridos 30, 45 e 60 dias da inoculação, os sistemas radiculares das plantas inoculadas com nematóide foram coletados e separados da parte aérea, lavados cuidadosamente e processados através da técnica de Boneti e Ferraz (1981) para extração dos ovos e determinação do fator de reprodução (FR = nº de

ovos final/ nº de ovos inicial). Foram consideradas resistentes, as plantas com FR médios menores que 1, e suscetíveis, as plantas com FR maiores ou iguais a (Oostenbrink, 1966).

Durante o período de 10/09/09 a 11/10/09, a média das temperaturas mínimas foi de 16,25 °C e das máximas de 27,18 °C, sendo a média de 21,11 °C. No período de 10/09 a 25/10/09 a média das temperaturas mínimas foi de 16,34 °C e das máximas de 26,79 °C, sendo a média de 21,05 °C e no período de 10/09 a 08/11/09, a média das temperaturas mínimas de 17 °C e máximas de 27,53 °C, sendo a média de 21,81 °C.

Obtenção do extrato de *Mentha pulegium*: A parte aérea das plantas mantidas em vasos na casa-de-vegetação por 30, 45 e 60 dias, conforme descrito anteriormente, foi coletada no período da manhã (8:00 hs), pesada e seca em estufa a temperatura de 30 °C. Uma amostra de 14,1 g das folhas secas e moídas referente às triplicatas dos dois níveis de inóculo (zero e 1000 + ovos e J₂/ml) foram extraídas com metanol (MeOH) por três dias, à temperatura ambiente. Posteriormente, as soluções extrativas foram concentradas em rotavapor a 40-80°C, sob pressão reduzida. Com as plantas coletadas aos 30 dias sem e com parasitismo obteve-se 0,52 g de extrato metanólico. Aos 45 dias obteve-se 0,69 g de extrato sem o parasitismo e 0,71 g de extrato com o parasitismo. Já com 60 dias foram obtidos 0,50 g de extrato sem o parasitismo e 0,53 g de extrato com o parasitismo.

Porções de 0,45 g de cada extrato foram colocadas em coluna de sílica filtrante, contendo carvão ativo e eluída com diclorometano (CH₂Cl₂) e, posteriormente, com metanol. Foram obtidos no total seis subfrações em CH₂Cl₂ (três com e sem o parasitismo nas três datas de coleta) e seis subfrações em MeOH.

Para determinação do efeito do extrato de *M. pulegium* sobre a eclosão, mobilidade e mortalidade de juvenis de *M. paranaensis* foram utilizadas apenas as subfrações obtidas com diclorometano.

Análise por CLAE-DAD: As subfrações metanólicas foram pesadas e diluídas com metanol grau HPLC/CLAE (High Performance Liquid Chromatography) em um balão de 10 mL. Seis amostras [três com nematoide (CN) e três sem (SN)], obtidas nas diferentes épocas, com concentrações médias de 5 mg/mL foram utilizadas na análise de CLAE.

A caracterização das substâncias fenólicas presentes nos extratos de *M. pulegium* foi realizada em sistema de HPLC/CLAE da Waters (Alliance e2695), acoplado a um detector UV/VIS-PAD 2998. A detecção foi realizada por meio de varredura na faixa de 210 a 400 nm fixando os comprimentos de ondas em 280 e 370 nm. A coluna utilizada para as análises foi da Waters (XTerra MS C-18 5 µm 4,6 X 250 mm), com a temperatura controlada a 28 °C. As amostras foram filtradas com filtros de Nylon de 0,45 µm de tamanho de poro da Millipore Millex-HN e mantidas a 4 °C no equipamento. O tempo de cada análise foi de 75 min com gradiente linear (Tabela 5.1). O volume de injeção das amostras e padrões foi de 20 µL. Em seguida os dados foram adquiridos pelo *software* Empower 2.0.

Tabela 5.1 – Gradiente utilizado nas análises cromatográficas de *Mentha pulegium*.

Tempo (min)	%A	%B
	5,0	95,0
5,00	5,0	95,0
10,00	7,5	92,5
15,00	7,5	92,5
20,00	15,0	85,0
25,00	25,0	75,0
30,00	35,0	65,0
40,00	45,0	55,0
45,00	45,0	55,0
50,00	55,0	45,0
55,00	70,0	30,0
60,00	100,0	0,0
65,00	100,0	0,0
70,00	5,0	95,0
75,00	5,0	95,0

Gradiente: **A**= Acetonitrila (ácido fórmico com 2% v/v); **B**= Água (ácido fórmico 2% v/v); Fluxo de 0,75 mL/min.

A caracterização dos compostos fenólicos presentes nos extratos de *M. pulegium*, usando padrões externos, foi realizada correlacionando os tempos de retenção e os espectros de absorção na região do ultravioleta dos sinais cromatográficos dos extratos e dos padrões injetados nas mesmas condições, em triplicata. Os cromatogramas foram analisados fixando o comprimento de onda em 280 nm.

5.3.2 Efeito de Extratos de Folhas de *M. Pulegium* sobre Juvenis de *M. Paranaensis*

Obtenção da população do nematoide *M. paranaensis*: O inóculo foi obtido a partir de populações puras coletadas de raízes de fumo infestadas, cedidas pelo Iapar, Londrina. Essa população foi mantida em casa-de-vegetação durante 45 dias. Em seguida, utilizou-se o método de Boneti e Ferraz (1981) para obtenção da suspensão do inóculo.

Eclosão de J₂ de *M. paranaensis* em extratos de *M. pulegium*: Para avaliar o efeito dos extratos na eclosão dos juvenis foram depositados 1,0 mL das respectivas subfrações de extratos obtidos com diclorometano e 1,0 mL de suspensão aquosa com aproximadamente 300 ovos do nematoide em tubos tipo eppendorf de 10 mL de capacidade. Os tubos foram incubados em BOD a 26°C por 16 dias. Na testemunha foi utilizada apenas água destilada. Cada tratamento constou de quatro repetições. Os números de J₂ eclodidos e de ovos remanescentes foram avaliados com auxílio de microscópio estereoscópico, após os 16 dias de incubação. Posteriormente, calculou-se a porcentagem de eclosão de J₂ pela fórmula: porcentagem de eclosão = [número de J₂ eclodidos/(número de J₂ eclodidos + número de ovos remanescentes)] x 100.

Efeito dos extratos de *M. pulegium* sobre J₂ de *M. paranaensis*: os J₂ foram obtidos através da incubação da suspensão de inóculo de *M. paranaensis* em câmaras de eclosão, preparadas empregando-se peneiras de tecido poliéster (0,025 a 0,030 mm de abertura) colocadas dentro de badeja plástica contendo água esterilizada até o nível da malha. Os J₂ eclodidos que atravessavam a peneira foram coletados após 72 horas, e quantificados em câmara de Peters.

Cada unidade experimental constituiu-se de um tubo tipo eppendorf de 10 mL de capacidade, com quatro repetições. Dois mililitros de suspensão aquosa com 250 J₂ de *M. paranaensis* foram colocados em cada tubo juntamente com 2,0 mL de cada extrato. Água destilada foi usada como testemunha. Os tubos foram incubados em BOD a 26°C e, após 24 horas, o conteúdo dos tubos contendo os juvenis foi vertido em peneira de 500 mesh, lavado em água corrente, e recolhido para placas de Petri, para avaliação da porcentagem de J₂ móveis e imóveis. Após essa avaliação, as placas foram novamente incubadas por mais 24 horas. Aqueles

J₂ imóveis, depois desse período, foram considerados mortos, uma vez que não se recuperaram após a lavagem e incubação apenas em água.

As médias obtidas foram comparadas pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, ao nível de 5% de significância, após rejeitar a igualdade das mesmas através da análise de variância. Também foram realizados testes de normalidade de Aderson-Darling, e com a costatação da normalidade positiva realizou-se o teste de comparação T de Student para duas médias.

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise de compostos fenólicos por CLAE.

A maioria das espécies de plantas medicinais apresenta um ou mais grupos de metabólitos secundários, dependendo de sua capacidade genética e dos estímulos proporcionados pelo meio em determinado momento (MARTINS et al., 1994). A espécie *M. pulegium* foi pouco estudada quimicamente, embora apresente importância medicinal já descrita. Apenas Proestos et al. (2005), na Grécia, detectaram alguns compostos fenólicos nas folhas da planta.

O aumento da atividade enzimática na síntese de substâncias fenólicas e o acúmulo desses compostos têm sido correlacionados com a resistência de cereais a stress bióticos (DICKO et al., 2005). Em ambos os casos de stress, tanto bióticos (fungos, vírus, insetos etc...) como abióticos (fotoperíodo, deficiência nutricional etc...) e induzida a síntese da enzima fenilalanina amônia liase (PAL) que catalisa as primeiras reações envolvidas na biossíntese de uma variedade de metabólitos, como ligninas, ésteres do ácido hidroxicinâmico e flavonóides (LAMB, 1977).

Os compostos fenólicos constituem um grupo de metabólitos secundários que exercem papéis importantes nas plantas, como a proteção contra stress ambientais (HAHLBROCK; SCHEEL, 1989). Em insetos-praga, esses compostos podem atuar como inibidores digestivos ou produtores de radicais livres (APPEL, 1993).

Neste trabalho foi realizado um estudo inédito quanto à possível modificação no perfil de substâncias fenólicas de *M. pulegium* quando submetida à hospedabilidade ao *M. paranaensis*.

A identificação de cada substância foi realizada através da comparação entre os tempos de retenção e espectros de absorção na região do ultravioleta dos sinais cromatográficos dos extratos e dos padrões injetados nas mesmas condições em triplicata (Figuras 5.2 e 5.3). Nos extratos obtidos de plantas sem o parasitismo de *M. paranaensis* foi possível a identificação do ácido ferúlico, (-)-epicatequina, ácido caféico e ácido fumárico (Figura 5.2). Os perfis cromatográficos (Figura 5.2) dos extratos obtidos das amostras da planta em diferentes estágios de desenvolvimento (30, 45 e 60 dias) apresentaram diferenças pouco significativas, concluindo-se que os compostos fenólicos são biossintetizados com trinta dias de cultivo não sendo alterados até os 60 dias.

A mesma técnica foi utilizada por Proestos et al. (2005) na análise do extrato das folhas de *M. pulegium* após hidrólise ácida, tendo identificado (+)-catequina, ácido caféico, ácido ferúlico e os flavonóides naringenina, apigenina e luteolina. Esses resultados confirmam a presença de compostos fenólicos nas folhas de *M. pulegium*. Os compostos fenólicos e flavonóides geralmente estão presentes em plantas em várias formas glicosiladas, este fato pode explicar a não detecção da aglicona naringenina analisada nesse trabalho. Além disso, outras substâncias com espectros de ultravioleta característicos de compostos fenólicos foram observadas no cromatograma do extrato sem o parasitismo do nematoide, porém não foram identificados pela ausência dos respectivos padrões.

Figura 5.2 – Cromatogramas dos extratos metanólicos de *M. pulegium* obtidos CLAE-DAD aos 60 dias de cultivo. 1: extrato sem parasitismo de *M. paranaensis* 2: ampliação de 1 com as substâncias caracterizadas; 3: extrato com parasitismo de *M. paranaensis* 4: ampliação de 3 com as substâncias caracterizadas.

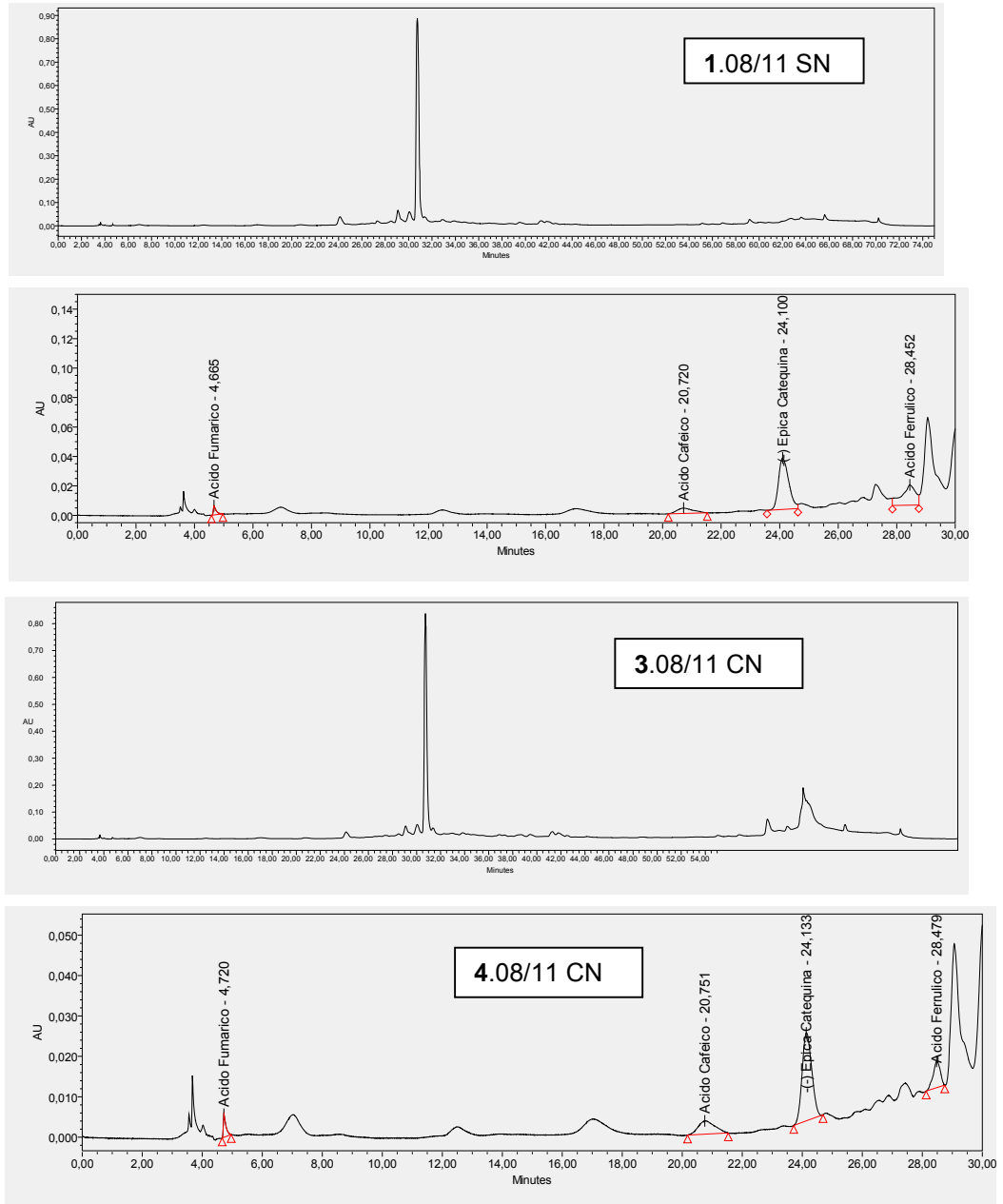
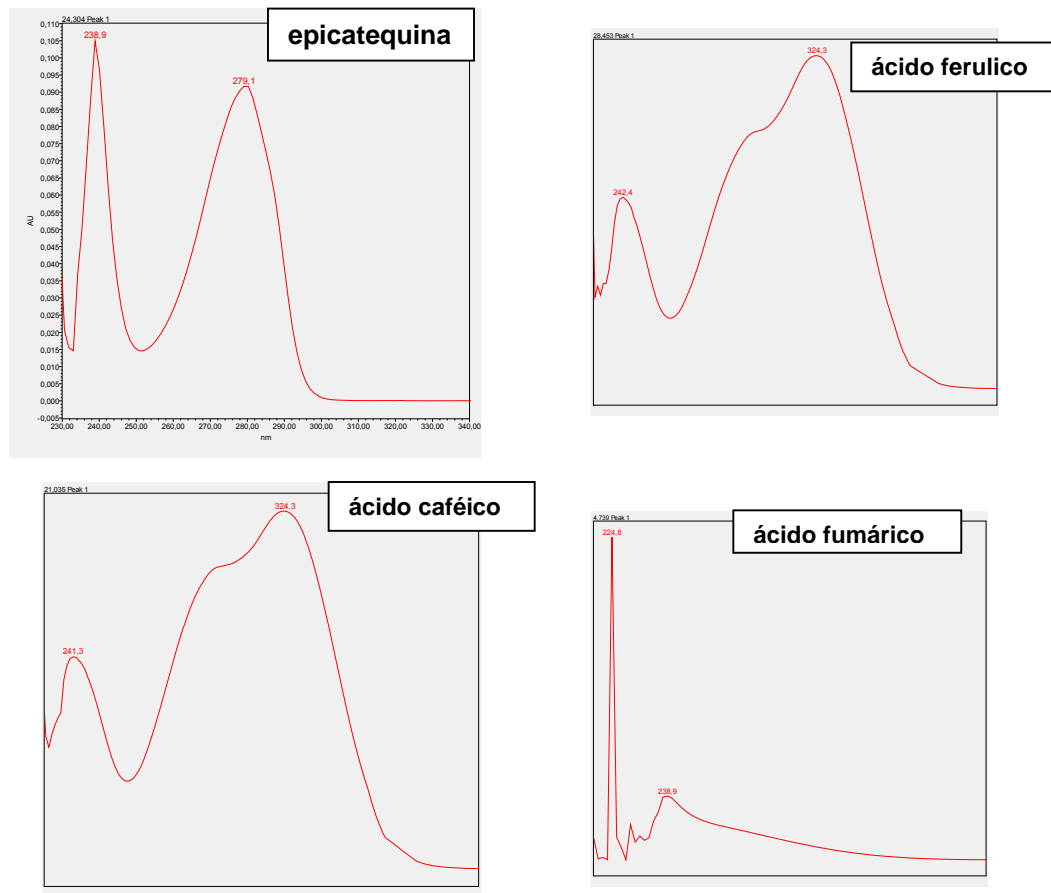


Figura 5.3 – Espectros de absorção na região do ultravioleta dos compostos fenólicos caracterizados nos extratos de *M. pulegium*.



Os resultados obtidos em relação à hospedabilidade de *M. pulegium* a *M. paranaensis* estão apresentados na Tabela 5.2. A viabilidade do inóculo foi confirmada pelo número de ovos produzidos no tomateiro.

Verificou-se que *M. pulegium* não permitiu uma reprodução satisfatória de *M. paranaensis* (reação de resistência) aos 30 e 45 dias da inoculação, mas as plantas apresentaram suscetibilidade após 60 dias da inoculação, quando o nematoide completou seu ciclo de vida. Apesar da baixa reprodução (reação de resistência) nos primeiros períodos de coleta, observou-se que, com o desenvolvimento das plantas, houve um bom desenvolvimento populacional do nematoide tanto no tomate quanto no poejo (Tabela 5.2).

Embora haja muitos trabalhos publicados sobre a reação de plantas medicinais a espécies de *Meloidogyne*, apenas Mônaco et al. (2008) estudaram a interação das plantas medicinais com *M. paranaensis*, entretanto a espécie *M. pulegium* não foi avaliada neste estudo. Baida et al. (2011) ao verificarem a

hospedabilidade de 15 espécies de plantas medicinais, entre elas o poejo, sobre populações de *M. javanica* e *M. incognita*, constataram reação de resistência às duas espécies de nematoide avaliadas.

Tabela 5.2 – Número de ovos, fator de reprodução (FR) e reação (S = suscetível e R = resistente) de *Mentha pulegium* inoculada com *Meloidogyne paranaensis*, após 30, 45 e 60 dias em casa de vegetação.

Espécie	Nº. de ovos	FR	Reação	Época de coleta ⁵
<i>Solanum esculentum</i> (tomate)	14.801 ¹	0,148 ³	R	30 dias
<i>Mentha pulegium</i> (poejo)	6072 ²	0,061	R	
<i>Solanum esculentum</i> (tomate)	17.600	1,76	S	45 dias
<i>Mentha pulegium</i> (poejo)	6.853	0,685	R	
<i>Solanum esculentum</i> (tomate)	37.286	3,728	S	60 dias
<i>Mentha pulegium</i> (poejo)	23.240	2,324	S	

¹ Médias de cinco repetições.

² Médias de 30 repetições.

³ FR = nº de ovos final / nº de ovos inicial

Em consequência do comportamento de suscetibilidade do poejo aos 60 dias de cultivo, estudou-se nos extratos das folhas a possibilidade de haver alguma alteração no perfil de fenólicos em função do parasitismo de *M. paranaensis*. A identificação de compostos fenólicos que são produzidos em resposta à infecção de nematoides é importante para o conhecimento da interação planta-patógeno, além de ser de grande utilidade no desenvolvimento de novas estratégias de controle de plantas e importante para a obtenção do princípio ativo.

Nenhuma diferença foi detectada no perfil de substâncias fenólicas nos extratos obtidos de plantas parasitadas e não por *M. paranaensis*. Nesses extratos também foram identificados o ácido ferúlico, (-)-epicatequina, ácido caféico e ácido fumárico e as demais substâncias visualizadas no extrato sem parasitismo do nematoide, possivelmente ácidos fenólicos e flavonóides (Figura 5.2).

Dessa forma, podemos verificar que nas plantas de poejo estudadas, nas condições desse experimento, o parasitismo de *M. paranaensis* não alterou o perfil das substâncias fenólicas, informação esta ainda não relatada em literatura.

Efeito de extratos de folhas de *M. pulegium* sobre juvenis de *M. paranaensis*.

O uso de extratos naturais pode ser um método promissor de controle de nematoides, podendo substituir alguns produtos químicos e se tornar uma medida alternativa para pequenas áreas (COIMBRA et al., 2006). Demuner et al. (2003) em seus estudos identificaram que, em relação ao nematoide *M. incognita*, mais de uma classe de compostos de plantas (isoflavonóide e amida) apresentam atividade nematicida.

Os extratos vegetais no controle de fitopatógenos apresentam algumas vantagens em relação aos nematicidas sintéticos, que são muito tóxicos e prejudiciais ao meio ambiente, tais como serem menos poluentes, menos tóxicos ao homem, apresentarem baixo poder residual, baixo custo, e podem ser produzidos localmente (MARTINEZ, 2002).

Com relação à eclosão (Tabela 5.3), as testemunhas sem tratamento com extrato, com e sem Tween, apresentaram os maiores percentuais de eclosão de J_2 , diferentes dos tratamentos com o extrato de poejo. Apenas o resultado para a segunda coleta foi semelhante à testemunha com o Tween. Os demais tratamentos (na primeira e terceira coletas) reduziram drasticamente os percentuais de eclosão de J_2 de *M. paranaensis* com diferença para as duas testemunhas, mostrando a ação inibitória *in vitro* do extrato de poejo sobre a eclosão de juvenis de *M. paranaensis*.

Tabela 5.3 – Eclosão, mobilidade e mortalidade de *M. paranaensis* na presença do extrato de Poejo, obtido em três épocas de coleta, testes *in vitro*.

Tratamento	Eclosão (%)	Mobilidade e Mortalidade			
		24 horas ⁴		48 horas ⁵	
		J_2 Imóvel (%)	J_2 Vivo (%)	J_2 Morto (%)	J_2 Vivo (%)
Testemunha	64,8 ¹ a ³	39,8 aA	60,2 aA	34,8 aA	65,2 aA
Testemunha + Tween	49,1 ab	33,3 aA	66,7 aA	35,3 aA	64,7 aA
Poejo E1 ²	6,3 c	30,5 aA	69,5 aA	30,7 aA	69,3 aA
Poejo E2	27,3 bc	36,2 aA	63,8 aA	39,1 aA	60,9 aA
Poejo E3	8,6 c	31,4 aA	68,6 aA	42,7 aA	57,3 aA
CV (%)	54,7	46,8	24,4	33,3	19,1

¹ Dados são médias de quatro repetições;

² Época de coleta: E1 (11/10/2010), E2 (25/10/2010), E3 (25/11/2010);

³ Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey em nível de 5% de significância, e mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste T;

⁴ 1° dia de avaliação de juvenis, após 24 horas na presença do extrato;

⁵ 2° dia de avaliação de juvenis, após 48 horas de aplicação do extrato;

Resultados semelhantes sobre o efeito de extratos também foram observados por outros autores. Salgado e Campos (2003) avaliaram a eclosão e mortalidade de J₂ de *M. exigua* em extratos aquosos de seis espécies de plantas medicinais e condimentares. Todos os extratos inibiram a eclosão dos J₂ de *M. exigua* e, a maior inibição da eclosão ocorreu na canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*). O extrato de canela causou 100% de mortalidade após 24 h de contato com o J₂ e o cravo-da-índia acima de 50%.

Lanza et al. (2010) estudaram o efeito dos extratos de folhas, caule e raiz de chá da Índia (*Capraria biflora*) sobre a eclosão e mortalidade de J₂ de *M. javanica in vitro* e verificaram que a menor eclosão dos juvenis foi observada nos extratos obtidos a partir das folhas.

Efeitos nematicidas de extratos de plantas já foram provados por vários autores. Nasu (2008), estudando *in vitro* a ação nematicida de manipueira sobre *M. incognita*, mostrou que os tratamentos com manipueira até 10% de diluição apresentaram 100% de mortalidade.

No entanto, neste trabalho não houve diferença significativa entre os tratamentos com os extratos, nas diferentes coletas, sobre a mobilidade e mortalidade dos J₂ pelo teste de Tukey. Os valores de (p) para o teste T de Student também não foram significativos, entretanto a não diferença no teste T mostra que não ocorreu recuperação daqueles juvenis que se encontravam imóveis nas primeiras 24 horas de exposição aos extratos, comprovando certo efeito nematicida dos extratos de poejo avaliados (Tabela 5.3).

Coimbra et al. (2006) avaliaram o efeito nematostático e nematicida de extratos aquosos de cinco plantas sobre *Scutellonema bradys*. Todos os extratos vegetais inibiram a mobilidade e causaram mortalidade ao nematoide.

Gardiano (2006) avaliou o efeito de extratos aquosos de folhas guiné (*Petiveria alliacea*) aplicados via pulverização foliar em plantas inoculadas com *M. javanica*. O autor observou redução do número de galhas em 61%. Com extratos de hortelã (*Mentha spp*), bardana (*Arctium lappa*) e mamona (*Ricinus communis*) via adição ao solo observou a redução no número de galhas em 75,6%, 65,7% e 54,4% e do número de ovos em 81,7%, 75,9% e 56,6% respectivamente.

Neves et al. (2009) avaliaram a atividade nematicida de extratos dos frutos de pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*), plantas de mostarda (*Brassica campestris*), de bulbos de alho (*Allium sativum*) e óleo de mostarda sobre *M.*

javanica, em tomateiro. Os extratos clorofórmico e cetônico de pimenta malagueta e o óleo de mostarda apresentaram melhor controle do nematoide. Porém, somente o óleo de mostarda reduziu significativamente o número de ovos.

Silva (2011) verificou que o aumento da concentração do extrato de capeba (*Pothomorphe umbellata*) teve efeito significativo na mobilidade dos juvenis J₂ de *M. exigua*, e que na concentração de 1250 ppm houve redução de 43,2% na mobilidade dos juvenis.

5.5 CONCLUSÕES

Foram identificados os compostos fenólicos ácido ferulico, (-)-epicatequina, ácido caféico e ácido fumárico nos extratos obtidos de plantas sem e com parasitismo.

Não foi verificada diferença quanto ao perfil de substâncias fenólicas entre as plantas parasitadas e não pelo *M. paranaensis*, indicando que o parasitismo desse nematoide não alterou o perfil das substâncias fenólicas.

Foi observada ação inibitória *in vitro* do extrato de poejo sobre a eclosão de juvenis de *M. paranaensis*, assim como efeito sobre a mortalidade dos J₂.

5.6 REFERÊNCIAS

- ABID, M.; CHOUDHARY, M.I.; MAQBOOL, M.A.; RAHMAN, A.U. Preliminary screening of some plants for their nematicidal activity against *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Mediterranea**. v.25, p. 155-157. 1997.
- AMARAL, D.R.; OLIVEIRA, D.F.; CAMPOS, V.P. E CARVALHO, D.A. Efeito de extratos vegetais sobre a Motilidade, Mortalidade e Patogenicidade de *Meloidogyne exigua*. In: SIMPÓSIO DE PESQUISAS DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001, Vitória. **Anais...** Resumos Expandidos Centro de Convenções de Vitória – ES. Vitória: 2001.
- APPEL, H.M. Phenolics in ecological interactions: the importance of oxidation. **Journal of Chemical Ecology**, v.19, p. 1521-1552. 1993.
- BAIDA, F.C.; SANTIAGO, D.C.; VIDAL, L.H.I.; BAIDA, L.C.; STROZE, C.T. Medicinal Plants' Hosting Ability for Nematode Suitability *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*. **Nematropica** v.41, p. 150-153. 2011.
- BELITZ, H.D.; GROSCH, W. **Food chemistry**. New York: Springer Verlag, p. 2004. 774.

BONETI, J.I.S.; FERRAZ, S. Modificação do Método de Hussey & Barker para a extração de ovos de *M. exigua*, em raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.6, n.3, p. 553, out. 1981.

BURNS, J. et. al. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. **Journal Agric. Food Chemistry**. Chicago: v.49, p. 5797-5808. 2001.

CAMPOS, V.P. Café (*Coffea arabica* L.). Controle de doenças. Doenças causadas por nematoides. In: VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L. (Ed.) **Controle de doenças de plantas**. Viçosa, MG: UFV, 1997, p. 141 - 180.

CARNEIRO, R.M.D.G.; CARNEIRO, R.G.; ABRANTES, I.M.O.; SANTOS, M.S.N.A.; ALMEIDA, M.R.A. *Meloidogyne paranaensis* sp. (Nemata: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing coffee in Brazil. **Journal of Nematology**. v.28, p. 177-189, 1996.

CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides de galhas para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v.25, n.1, p. 35-44, jun. 2001.

CARVALHO J.C.T.; GOSMANN G.; SCHENKEL E.P. Compostos Fenólicos simples e heterosídicos. In: Simões C.M.O. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Florianópolis : UFRGS / UFSC, 2003, cap.20. p. 519-535.

CHATTERJEE, A.; SUKUL, N.C.; LASKAR, S.; GHOSHMAJUMDAR, S. Nematicidal principles from two species of Lamiaceae. **Journal of Nematology**. v.14, p. 118-120, 1982.

CHITWOOD, D.J. Phytochemical based strategies for nematode control. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.40, p. 221–249, 2002.

COIMBRA J.L.; SOARES, A.C.F.; GARRIDO, M.S.; SOUSA, C.S.; RIBEIRO, F. L.B. Toxicidade de extratos vegetais a *Scutellonema bradys*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.41, n.7, p. 1209-1211.

CORNELIUS, M.T.F.; CARVALHO, M.G. DE; SILVA, T.M.S. DA; ALVES, C.C. F.; SISTON A.P.N.; ALVES, K.Z.; SANT'ANNA C.M.R.; NETO M.B.; EBERLIN M.N.; BRAZ-FILHO R. Other chemical constituents isolated from *Solanum crinitum* Lam. (Solanaceae). **J. Braz. Chem. Soc.** v.21, n. 12, p. 2211-2219, 2010.

COSTA, J.M.C.; CAMPOS, V.P; POZZA, E.A.; NAVES, R.L.; ANDRADE JÚNIOR, COSTA, M. J. N.; CAMPOS, L. H.; PFENNING, L. H.; OLIVEIRA, D. F. Patogenicidade e reprodução de *Meloidogyne incognita* em tomateiros (*Solanum esculentum*) com aplicação de filtrados fúngicos ou extratos de plantas e de esterco. **Nematologia Brasileira**, v.26, n.1, p. 5-12. 2002.

DANIEL, J.F. DE S.; CARVALHO, M.G. DE; FERREIRA, D.T.; SCHMITZ, W.; SARIDAKIS, H.O. Phenolic compounds and hydroxymethylfurfural from the flowers of *Caesalpinia peltophoroides* and their antibacterial activity. **Rev. Latinoamer. Quím.** v.32, n.1. 2004.

DEMUNER, A.J.; BARBOSA, L.C. de A.; NASCIMENTO, J.C. do; VIEIRA, J.J.; SANTOS, M.A. dos. Isolamento e avaliação da atividade nematicida de constituintes químicos de *Mucuna cinerea* contra *Meloidogyne incognita* e *Heterodera glycines*. **Química Nova**, São Paulo, SP, v.26, n.3, p. 335-339, 2003.

DIAS, C.R.; SCHWAN, A.V.; EZEQUIEL, D.P.; SARMENTO, M.C.; FERRAZ, S. Efeito de extratos aquosos de plantas medicinais na sobrevivência de juvenis de *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Brasileira**, v.24, n.2, p. 203-210. 2000.

DICKO, M.H.; GRUPPEN, H.; BARRO, C.; TRAORE A.S.; BERKEL, W.J.H.; VORAGEN, A.G.J. Impact of phenolic compounds and related enzymes in sorghum varieties for resistance and susceptibility to biotic and abiotic stresses. **Journal of chemical ecology**, v.31, n.11. nov. 2005.

DJOUDI R.; BERTRAND C. ; FIASSON K.; FIASSON, JEAN-LOUIS; COMTE G. ; FENET B. ; RABESA Z. A. **Biochemical Systematics and Ecology Polyphenolics and iridoid glycosides from *Tarena madagascariensis***. v.35, n.5, p. 314-316. 2007.

GARDIANO, C.G. **A atividade nematicida de extratos aquosos e tinturas vegetais sobre *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949**. 2006. Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Fitopatologia, da Universidade Federal de Viçosa (UFV, MG). Minas Gerais, MG.

GARDIANO, C.G.; FERRAZ, S.; LOPES, E.A.; FERREIRA, P.A.; AMORA D.X.; DE FREITAS L.G. Avaliação de extratos aquosos de várias espécies vegetais, aplicados ao solo, sobre *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.30, n.3, p. 551-556. jul./set. 2009.

GOBBO-NETO L.; LOPES N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**. v.30, n.2. São Paulo. mar./apr. 2007.

HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. **Annual Review of Plant Physiology of Plant Molecular Biology**, v.40, p. 347. 1989.

INSTITUTO DE BOTÂNICA. 1989. Pteridófitas e Fanerógamas. In: INSTITUTO DE BOTÂNICA. **Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico**. São Paulo, Governo do Estado de SP Secretaria do Meio Ambiente Instituto de Botânica, p. 32-55.

KHURMA, U.R.; SINGH, A. Nematicidal potential of seed extracts: in vitro effects on juvenile mortality and egg hatch of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*. **Nematologia Mediterranea**. v.25, p. 49-54. 1997.

LAMB, C.J. Phenylalanine ammonia-lyase and cinnamic acid 4-hydroxylase: Characterisation of the concomitant changes in enzyme activities in illuminated potato tuber discs. **Planta**. v.135, p. 169-175. 1977.

LANZA, F.E; RIBEIRO, R.C.F.; REIS, S.T.; FARIA, M.A.V.R.; XAVIER, A.A. Efeito de *Capraria biflora* sobre a eclosão e mortalidade de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica* in vitro. **Unimontes Científica**. Montes Claros, v.12, n.1/2. jan./dez. 2010.

LÔBO, L.T., CASTRO, K.C.F.; ARRUDA, M.S.P.; SILVA, M.N. DA; ARRUDA, A.C.; MÜLLER, A.H.; ARRUDA, G.M.S.P.; SANTOS A.S.; FILHO, A.P. DA S.S. Potencial alelopático de catequinas de *Tachigali myrmecophyla* (leguminosae). **Química Nova** v.31, n.3, São Paulo. 2008.

LOPES, E.A. et al. Efeito dos extratos aquosos de mucuna preta e de manjeriço sobre *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*. Brasil. **Nematologia Brasileira**, v.29, n.1, p. 67-74. 2005.

LOPES, E. A. **Potencial de extratos aquosos e da incorporação ao solo de Mucuna Preta (*Mucuna pruriens* var. *utilis*) para o controle do nematoide das galhas**. Tese (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2004.

LORENZI H.; MATOS F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, p. 544. 2008.

MANACH, C.; SCALBERT, A., MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMENEZ, L.. Polyphenols: food sources and a bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, n.5, p. 727-747. 2004.

MANN, J. **Secondary metabolism**. New York: Oxford University, 2. ed., p. 374. 1987.

MARTINS, E.R., CASTRO, D.M., CASTELLANI, D.C., DIAS, J.E. **Plantas medicinais**. Viçosa, MG: UFV, 1994. 220p.

MARTINEZ S.S. 2002. **O NIM – *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção**. Londrina, IAPAR. Instituto Agrônômico do Paraná, p. 142.

MELO, E.A.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Bol. SBCTA**. Campinas: v.36, n.1, p. 1-11. 2002.

MENGUE, S.S; MENTZ L.A; SCHENKEL, E.P. Uso de plantas medicinais na gravidez. **Revista Brasileira de farmacognosia**, v.11, p. 21-35. 2001.

MÔNACO, A.P.A.; CARNEIRO, R.G.; KRANZ, W.M.; GOMES, J.C.; SCHERER A.; NAKAMURA, K.C.; MORITZ, M.P.; SANTIAGO D.C. Reação de espécies de plantas daninhas a *Meloidogyne paranaensis*. **Nematologia Brasileira**, v.32, n.2, p. 279 – 283. 2008.

MOURA, R. M. **O Gênero *Meloidogyne* e a Meloidoginose**. Parte I. RAAP. v.4. 1996.

NANDAL, S.N.; BHATTI, D.S. Influence of four plant extracts on the hatching of *Meloidogyne javanica* and invasion of host roots. **Nematologia Mediterranea**, Bari, v.14, n.1/2, p. 291-294. 1986.

NASU, E.G.C. **Composição química da manipueira e sua potencialidade no controle de *Meloidogyne incognita* em tomateiro no oeste do Paraná.** 2008. Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós graduação em Agronomia, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNOESTE, PR). Marechal Cândido Rondon, PR.

NEVES, W.S.; FREITAS, L.G.; COUTINHO, M.M.; GIARETTA-DALLEMOLE, R.; FABRY, C.F.S.; DHINGRA, O.D.; FERRAZ, S. Nematicidal activity of extracts of red hot chili pepper, mustard and garlic on *Meloidogyne javanica* in green house. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.4, p. 255-261. 2009.

NICHOLSON, R.L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in diase resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.30, p. 369-89. 1992.

OOSTENBRINK, M. 1966. **Major characteristic of the relation between nematodes and plant.** Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen – Nederland. p. 46.

PROESTOS, C.; CHORIANOPOULOS, N.; NYCHAS, G.J.E.; KOMAITIS, M. RP HPLC Analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of Their Antioxidant Capacity and Antimicrobial Activity. **J. Agric. Food Chem.**, v.53, n.4, p. 1190-1195. 2005.

RICH, J.R.; RAHI, G.S.; OPPERMAN, C.H. Influence of the castor bean (*Ricinus communis*) lectin (Ricin) on motility of *Meloidogyne incognita*. **Nematropica**, Bradenton, v.19, n.1, p. 99–103. 1989.

ROCHA, F.S.; CAMPOS, V.P. Efeito de exsudatos de cultura de células de plantas em juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita*. **Fitopatologia Brasileira**. v.29, p.294-299. 2004.

ROCHA, F.S.; CAMPOS, V.P.; SILVA, J.R.C. Extrato de cultura de células de diversas plantas em juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Brasileira**, v.28, n.2, p. 191-198. 2004.

SALGADO, S.M.L.; CAMPOS, V.P. Ecloração e mortalidade de *Meloidogyne exigua* em extratos e em produtos naturais. **Fitopatologia Brasileira**. v.28, p. 166-170. 2003.

SANTOS, I.L.; COIMBRA, J.L.; REIS, A.T.C.C. Atividade de extratos aquosos de plantas do cerrado do estado da Bahia contra o nematoide das galhas *Meloidogyne javanica*. **Magistra**, Cruz das Almas-BA, v.21, n.3, p. 171-177. jul./set., 2009.

SILVA, L.R. **Efeito do extrato de capeba *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. na mobilidade de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne exigua*.** 2011. Trabalho de Conclusão do Curso Superior de Tecnologia em Cafeicultura (Graduação) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas.

TAIZ, L. e ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4.ed. Artmed, p. 820. 2009.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao determinar a reação de 14 espécies de plantas medicinais quanto ao parasitismo de *M. paranaensis* pode-se verificar que comportaram-se como suscetíveis: *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare*, *Plectranthus barbatus*, *Solanum esculentum* e *Mentha pulegium*; como resistentes: *Taraxacum officinale*, *Matricaria recutita*, *Melissa officinalis*, *Hyssopus officinalis*, *Lippia alba*, *Kalanchoe pinnata* e *Sedum praealtum* e como imunes: *Artemisia dracunculus* e *Petiveria alliacea*.

A concentração do óleo essencial não variou significativamente nos três estágios de desenvolvimento de *M. pulegium* analisados. Quanto à composição do óleo essencial, a modificação mais importante foi a mudança do composto majoritário que, no primeiro e segundo estágios de desenvolvimento da planta era representado pela pulegona, e passou a ser a piperitenona no terceiro estágio analisado. Portanto, para se indicar o constituinte principal do óleo essencial de *M. pulegium* há que se mencionar o estágio de crescimento da planta no qual a amostra de óleo foi obtida. O óleo essencial de *M. pulegium* possui potencial de uso como antifúngico por apresentar halos de inibição contra *C. herbarum*.

Foram identificados os compostos fenólicos ácido ferulico, (-)-epicatequina, ácido caféico e ácido fumárico nos extratos obtidos de *M. pulegium* sem e com parasitismo de *M. paranaensis*. Não foi verificada diferença quanto ao perfil de substâncias fenólicas entre as plantas parasitadas e não pelo *M. paranaensis*, indicando que o parasitismo de *M. paranaensis* não alterou o perfil das substâncias fenólicas.

Foi observada ação inibitória *in vitro* do extrato de poejo sobre a eclosão de juvenis de *M. paranaensis*, assim como efeito sobre a mortalidade dos J₂.

REFERÊNCIAS

- ABID, M.; CHOUDHARY, M. I.; MAQBOOL, M. A.; RAHMAN, A. U. Preliminary screening of some plants for their nematicidal activity against *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Mediterranea**. v.25, p. 155-157. 1997.
- ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS. **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. Rio de Janeiro, RJ: 1998. 132 p.
- AFLATUNI, A. **The yield and essential content of mint (*Mentha ssp*) in northern Ostrobothnia**. 2005. Dissertação – Departamento de Biologia – Universidade de Oulu, Finlândia.
- AGHEL, N.; YAMINI, Y.; HADJIAKHOONDI, A.; POURMORTAZAVI, S. M. Supercritical carbon dioxide extraction of *Mentha pulegium* L. essential oil. **Talanta**. Tehran, Iran, v.62, n.2, p. 407 – 411. 2004.
- AGNIHOTRI, V. K.; AGARWAL, S. G.; DHAR, P. L.; THAPPA, R. K.; BALESHWAR; KAPAHI, B. K.; SAXENA, R. K.; QAZI, G. N. Essential oil composition of *Mentha pulegium* L. growing wild in the north-western Himalayas India. **Flavour and Fragrance Journal**. Jammu Tawi, India, v.20, n.6, p. 607 – 610. 2005.
- AHMAD I. AND BEG A.Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian plants against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v.74, p.113-123. 2001.
- AIQUEL, G. R.; BRAVO, A. H.; RETAMAR, J. A. The essential oil of *Mentha pulegium* Linnaeus. **Rivista Italiana Essenze, Cosmetici, Aerosol**. v.59, n.10, p. 541 – 543. 1977.
- ALMEIDA, L. C. C. Doenças do maracujá. In: oliveira, S.M.A.; TERÃO, D.; DANTAS, S.A.F.; TAVARES, S.C.C.H. **Patologia Pós colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais**. Brasília DF: Embrapa informações tecnológicas, p. 776-799, 2006.
- AMARAL, D. R.; OLIVEIRA, D. F.; CAMPOS, V.P. E CARVALHO, D. A. **Efeito de extratos vegetais sobre a Motilidade, Mortalidade e Patogenicidade de *Meloidogyne exigua***. II Simpósio de pesquisas dos Cafés do Brasil. Resumos Expandidos. Centro de Convenções de Vitória – ES. 2001.
- ANDRADE, F. M. C. ; CASALI, V. W. D. **Plantas medicinais e aromáticas: Relação com o ambiente, colheita e Metabolismo Secundário**. Viçosa: UFV, Departamento de Fitotecnia, p. 139. 1999.
- ANON. Recent investigations on essential oils. **Bulletin of the Imperial Institute**, London, v.28, p.8 – 27. 1930.
- ARAUJO, W. P.; MATTOS, J. K. A.; SOUZA, R. M. Fontes de resistência a *Meloidogyne javanica* entre procedências de *Pfaffia glomerata*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 9, supl., p. 322 – 323. 1994.

- AZIZ, E. E.; ABBASS, M. H. Chemical composition and efficiency of five essential oils against the pulse beetle *Callosobruchus maculatus* (F.) on *Vigna radiata* seeds. **Journal of Agricultural & Environmental Sciences**. Giza, Egypt. v.8, n.4, p. 411 – 419. 2010.
- AZIZ, E. E.; CRAKER, L. E. Essential oil constituents of peppermint, pennyroyal, and apple mint grown in a desert agrosystem. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**. Cairo, Egypt. v.15, n.4, p. 361 – 367. 2009.
- BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia**. v. 1: Princípios e Conceitos. 3 ed. Agronômica Ceres Ltda: São Paulo-SP, p. 918. 1995.
- BERMUDEZ, J. A. Z. **Indústria farmacêutica, estado e sociedade**. São Paulo: Hucitec, p. 204. 1995.
- BERNÁTH, J. Production ecology of secondary plant products. In: CRACKER, L. E.; SIMON, J. E. **Herbs, Spices and Medicinal plants. Recent advances in botany, horticulture and pharmacology**. New York. The Haworth Press, p. 185-234. 1992.
- BOLZANI, V.S., IN CARLINI, E., RODRIGUES. E. Plantas Medicinais do Brasil: o Pesquisador Brasileiro Consegue Estuda-las? **Revista Fitos**. v.1, n.2, p. 8 – 18. 2005.
- BOUCHRA, CHEBLI; ACHOURI, MOHAMED; IDRISSE HASSANI, L. M.; HMAMOUCHE, MOHAMED. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. **Journal of Ethnopharmacology**. Rabat, Morocco. v.89, n.1, p. 165 – 169. 2003.
- BROWN JÚNIOR, K.S. Engenharia ecológica: novas perspectivas de seleção e manejo de plantas medicinais. **Acta Amazônica**, v.18, n.1-2, p. 291 – 303. 1988.
- CAMILI, E. C.; BENATO, E.A. Doenças da uva. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.26, 228, p. 50-55. 2005.
- CAMPOS, V. P. Café (*Coffea arabica* L.). Controle de doenças. Doenças causadas por nematoides. In: VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L. (Ed.) **Controle de doenças de plantas**. Viçosa, MG: UFV, 1997. p. 141 - 180.
- CANTO-SÁENZ, M. The nature of resistance to *Meloidogyne incognita*. In: SASSER, J.N.; CARTER, C. **An advanced treatise on Meloidogyne**. Raleigh: USAID & NCSU, 1985. v.1, p. 225 - 231.
- CARNEIRO, R. G.; MORITZ, M. P.; MÔNACO, A. P. A.; LIMA, A. C. C.; SANTIAGO, D. C. Reação de Cultivares de aveia às raças 1 e 3 de *Meloidogyne incognita* e a *M. paranaensis*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v.30, n.3, p. 281 – 285. 2006a.
- CARNEIRO, R. G.; MORITZ, M. P.; MÔNACO, A. P. A.; LIMA, A. C. C.; SANTIAGO, D. C. Reação de cultivares de mandioca às raças 1 e 3 de *Meloidogyne incognita*, a *M. paranaensis* e a *M. javanica*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v.30, n.3, p. 275 – 279. 2006b.

CARNEIRO, R. G.; MORITZ, M. P.; MÔNACO, A. P. A.; LIMA, A. C. C.; NAKAMURA, K.C.; MORITZ, M.P.; SCHERER, A., SANTIAGO, D. C. Reação de Gramíneas a *Meloidogyne incognita*, a *M. paranaensis* e a *M. javanica*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v.30, n.3, p. 287 – 291. 2006c.

CARNEIRO, R. G.; MORITZ, M. P.; MÔNACO, A. P. A.; NAKAMURA, K.C.; SCHERER, A. Reação de Milho, Sorgo e Milheto a *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. paranaensis*. **Nematologia Brasileira**, v.31, n.2, p. 67 – 71. 2007.

CARNEIRO, R. M. D. G., CARNEIRO, R. G., ABRANTES, I. M. O, SANTOS, M. S. N. A. e ALMEIDA, M. R. A. *Meloidogyne paranaensis* n.sp. (Nemata: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing coffee in Brazil. **Journal of Nematology**. v.28, p.177 - 189. 1996b.

CARNEIRO, R. M. D. G., GOMES, C. B., ALMEIDA, M. R., GOMES, A. C. C. e MARTINS, I. Primeiro registro de *Meloidogyne ethiopica* Whitehead, 1968 em plantas quivi no Brasil e reação em diferentes plantas hospedeiras. **Nematologia Brasileira**, v.27, n.2, p. 152 – 158. 2003.

CARNEIRO, R. M. D. G., MOREIRA, W. A., ALMEIDA, M. R. A. e GOMES, A. L. M. M. Primeiro relato de fitonematoides *Meloidogyne mayaguensis* parasitando goiaba (*Psidium guajava* L.)cv. Paluma. **Nematologia Brasileira**, v.25, n.1, p. 55 – 57. 2001.

CARNEIRO, R. M. D. G., TIGANO M. S.; RANDIG O.; ALMEIDA M. R. A.; SARAH J. L. Identification and genetic diversity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) on coffee from Brasil, Central America and Hawaii. **Nematology**, v.6, n.2, p. 287 – 298. 2004.

CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, A. R. A.; CARNEIRO, R. G. Enzyme phenotypes of Brazilian isolates of *Meloidogyne* spp. **Fundamental and Applied Nematology**, Montrouge, França, v.19, p. 555 – 560. 1996.

CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, A. R. A.; QUÉNÉHÉRVÉ, P. Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* spp. isolates. **Nematology**, Leiden, NL, v.2, p. 645 - 654, 2000.

CARVALHO, P.L. de **A proteção da biodiversidade brasileira: o caso das plantas medicinais**. 2009. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2009_2/Biodiversidade/index.htm>. Acesso em: 16 mar. 2010.

CASTRO, J. M. C.; CAMPOS, V. P.; POZZA, E. A.; NAVES R. L.; ANDRADE JUNIOR W. C.; DUTRA M. R.; COIMBRA J. L.; MAXIMINIANO C.; SILVA J. R. C. Levantamento de fitonematoides em cafezais do Sul de Minas Gerais. **Nematologia Brasileira**, v.31, n.1, p. 56 – 64. 2008.

CASTRO, J. M. C.; LIMA R. D. e CARNEIRO, R. M. D. G. Variabilidade isoenzimática de populações de *Meloidogyne* spp. provenientes de regiões brasileiras produtoras de soja. **Nematologia Brasileira**, v.27, n.1, p. 1-12. 2003.

CENTEC (Instituto Centro de Ensino Tecnológico). Produtor de plantas medicinais. 2. ed. **Rev. Fortaleza**: Edições Demócrito Rocha; Ministério da Ciência e Tecnologia, p. 48. 2004.

CESNIK, R. Dois nematódeos parasitando *Tropaeolum majus* L. **Revista de Agricultura**, v.32, n.4, p. 253 – 260. 1957.

CHALCHAT, JEAN-CLAUDE; GORUNOVIC, M. S.; MAKSIMOVIC, Z. A.; PETROVIC, S. D. Essential oil of wild growing *Mentha pulegium* L. from Yugoslavia. **Journal of Essential Oil Research**. Aubiere, França, v.12, n.5, p. 598 – 600. 2000.

CHAMBERS, H.L. *Mentha*. **Lamiales Newsletter**, v.1, p. 3 – 4. 1992.

CHATTERJEE, A.; SUKUL, N. C.; LASKAR, S.; GHOSHMAJUMDAR, S. Nematicidal principles from two species of Lamiaceae. **Journal of Nematology**. v.14, p.118-120. 1982.

CHOPRA, M. M.; VASHIST, V. N.; HANDA, K. L. Essential oil of *Mentha pulegium* from Jammu and Kashmir. **Indian Oil and Soap Journal**. Jammu, Kashmir, v.30, n.2, p. 41 – 45. 1964.

CLARK, R. J.; MENARY, R. C. The effect of two harvest per year on the yield and the composition of Tasmanian peppermint oil (*Mentha piperita* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.35, p. 1191 – 1195. 1984.

COIMBRA J. L.; SOARES, A. C. F.; GARRIDO, M. S.; SOUSA, C. S.; RIBEIRO, F. L. B. Toxicidade de extratos vegetais a *Scutellonema bradys*. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, v.41, p.1209-1211. 2006.

COOK, CATHERINE M.; MALOUPA, ELENI; KOKKINI, STELLA; LANARAS, THOMAS. Differences between the inflorescence, leaf and stem essential oils of wild *Mentha pulegium* plants from Zakynthos, Greece. **Journal of Essential Oil Research**. Thermi, Greece. v.19, n.3, p. 239 – 243. 2007.

CORREA JÚNIOR, C.; MING, L. C.; SCHEFFER, M. C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. Curitiba: Emater, 1991. p. 162.

COSTA MANSO, E. S. B. G.; MATTOS, J. K. A.; TENENTE, R. C. V. Suscetibilidade de plantas medicinais a *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v.9, p. 25-26. 1985.

COSTA, A. FERNANDES; DO VALE, J. CARDOSO. Essential oil of *Mentha pulegium*. **Noticias Farmaceuticas**. Univ. Coimbra, Portugal, v.18, p. 106 – 112. 1952.

COSTA, M. J. N.; CAMPOS, L. H.; PFENNING, L. H.; OLIVEIRA, D. F. Patogenicidade e reprodução de *Meloidogyne incognita* em tomateiros (*Solanum esculentum*) com aplicação de filtrados fúngicos ou extratos de plantas e de esterco. **Nematologia Brasileira**, v.26, n.1, p.5-12. 2002.

COURT, W. A., ROY, R. C., POCS, R. Effect of data on the yield and quality of the essential oil of peppermint. **Can. J. Plant Sci.**, v.73, n.228, p. 815 – 824. 1993.

COUTO M. E. O.; CAMPOS E. M. B.; GOMES C. B. Ocorrência do nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp.) em plantas medicinais no Rio Grande do Sul. **Tropical Plant Pathology**. Brasília, v.33 Suplemento, ago. 2008.

CRAGG, G. M., NEWMAN, D. J., SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**, v.60, p. 52. 1997.

CRAVEIRO, A. A.; MACHADO, M. I. L. De aromas, insetos e plantas. **Ciência Hoje**, v.4, n.23, p. 54 – 63. 1986.

CZEPAK, M. P. Produção de óleo bruto e mentol cristalizáveis em oito frequências de colheita da menta (*Mentha arvensis* L.) In: Ming, L.C. (Coord), SCHEFFER, M. C.; CORRÊA JUNIOR, C.; BARROS, I. B. I., MATTOS, J. K. A. **Plantas medicinais, Aromáticas e Condimentares: avanços na pesquisa agrônômica**. Botucatu: UNESP, 1998. v.2, p. 53 - 80.

CZEPAK, M. P. Produção de óleo bruto e mentol cristalizável em oito frequências de colheita de Menta (*Mentha arvensis* L.). In: MING, L.C. et al (ed). **Plantas medicinais, aromáticas e condimentares: avanços na pesquisa agrônômica**. Botucatu: UNESP, v.2. p. 53 – 80. 1995.

DA SILVA, L. R. **Efeito do extrato de capeba *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. na mobilidade de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne exigua***. 2011. Trabalho de Conclusão do Curso Superior de Tecnologia em Cafeicultura (Graduação) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais, Campus Muzambinho, Muzambinho, 2011.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp., and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**. Athens, Greece. v.22, n.1, p. 39 – 44. 2003.

DE SOUZA, A. H. Poejo (pennyroyal, *Mentha pulegium*) and its essential oil. **Revista Brasileira de Farmacia**, v.31, p. 257 -264. 1950.

DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G.; POZETTI, G. L. Das plantas medicinais aos fitofármacos. **Revista Brasileira Plantas Medicinais**, Botucatu, v.6, n.3, p. 11-14. 2004.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: UNESP, 1996. p. 230.

DIAS, C. R.; MACIEL, S. L.; VIDA, J. B., SCAPIM, C. A. Efeito de quatro espécies de plantas medicinais sobre *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949 em cultivo protegido. **Nematologia Brasileira**, Brasília, DF, v.22, n.2, p. 58-65. 1998.

DIAS, C. R.; SCHWAN, A. V.; EZEQUIEL, D. P.; SARMENTO, M. C.; FERRAZ, S. Efeito de extratos aquosos de plantas medicinais na sobrevivência de juvenis de *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Brasileira**, v.24, n.2, p. 203-210. 2000.

DIMITRI, M. J. **Enciclopedia Argentina de agricultura e jardineria**. Buenos Aires: ACME, 1980. p. 929 – 930.

DORMAN, H. J.; KOSAR, M.; KAHLOS, K.; HOLM, Y.; HILTUNEN, R. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties and cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, California, v.51, n.16, p. 4563 – 4569. 2003.

DOS SANTOS, I. L.; COIMBRA, J. L.; REIS, A. T. C. C. Atividade de extratos aquosos de plantas do cerrado do estado da Bahia contra o nematoide das galhas *Meloidogyne javanica*. **Magistra**, Cruz das Almas-BA, v.21, n.3, p. 171-177. jul./set. 2009.

DUARTE M. C. T., FIGUEIRA G. M., SARTORATTO A., REHDER V. L. G., MACHADO A. L. M., DELARMELENA C. Anti-Candida activity of essential oils and extracts from native and exotic medicinal plants used in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v.97, p. 305-311. 2005.

EISENBACK, J. D.; TRIANTAPHYLLOU, H. H. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. In: NICKLE, W. R. (Ed.). **Manual of agricultural nematology**. Beltsville: Beltsville Agricultural Research Service, 1991. p. 191 - 274.

EL-GHORAB, AHMED H. The chemical composition of the *Mentha pulegium* L. essential oil from Egypt and its antioxidant activity. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**. Giza, Egypt. v.9, n.2, p. 183-195. 2006.

ELHOUSSINE, DERWICH; ZINEB, BENZIANE; ABDELLATIF, BOUKIR. GC/MS analysis and antibacterial activity of the essential oil of *Mentha pulegium* grown in Morocco. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**. Fes, Morocco. v.6, n.3, p. 191-198. 2010.

EMATER/PR – Empresa Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural do Paraná. Paraná é o maior produtor de plantas medicinais do Brasil e cultiva mais de cem espécies diferentes. **Informativo vida no campo**, Curitiba, ano 1, n.3, 1998 Encarte técnico, p.8.

EMBRAPA/ CENARGEM Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias. **Conservação de recursos genéticos de Plantas medicinais e Aromática**. 2004. Disponível em: < <http://www.cenargem.embrapa.br/recgen/plantasmed.html> > Acesso em: 22 abril 2010.

FERRAZ, S., SANTOS, M. A. Controle biológico de fitonematoides pelo uso de fungos In: Revisão Anual de Patologia de Plantas. 1 ed. Passo Fundo, RG: **EMBRAPA**. 1995. p. 283-314.

FISCHER, I. H.; KIMATI, H.; REZENDE, J. A. M. Doenças do Maracujazeiro. In: KIMATI H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.) **Manual de Fitopatologia: doenças da plantas cultivadas**. v.2, 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005, p. 467-474.

FRANZIOS, G.; MIROTSOU, M.; HATZIAPOSTOULOU, E.; KRAL, J.; SCOURAS, Z. G.; MAVRAGANI-TSIPIDOU, P. Insecticidal and genotoxic activities of mint essential

oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Thessaloniki, Greece. v.45, n.7, p. 2690 - 2694, 2007.

FRAZAO, S.; DOMINGUES, A.; SOUSA, M. B. **Essential oil of Mentha pulegium**. Possibilities of the existence of chemical types in Mentha pulegium. Inst. Nac. Invest. Ind., Port. Int. Congr. Essent. Oils, [Pap.], 6th, 1974, v.12. p. 4.

FUCK, S. B. **Temperatura e luminosidade na germinação das sementes de guaçatonga (Casearia sylvestris)**. 2006. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

FUJITA, S.; FUJITA, Y. Essential oils of the genus Mentha. VII. High-boiling components of the essential oil of Mentha pulegium. **Nippon Nogei Kagaku Kaishi**. Nishinomiya, Japan. v.46, n.6, p. 303 – 307. 1972.

FUJITA, Y.; FUJITA, S. Essential oil of Mentha pulegium and Mentha gattefossei viewed from the standpoint of comparative biochemistry. **Nippon Kagaku Zasshi**. Osaka, Japan. v.88, n.7, p. 767 – 769. 1967.

FURLAN, M. R. Aspectos agronômicos em plantas medicinais. In: DI STASI, L.C. (org.). **Plantas Mediciniais: arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: UNESP, 1996.

GARCIA, E. S.; SILVA, A. C. P.; GILBERT, B.; CORRÊA, C. B. V.; CAVALHEIRO, M. V. S.; SANTOS, R. R.; TOMASINI, T. **Fitoterápicos**. Campinas: André Tosello, p.17. 1996.

GARDIANO, C. G. **A atividade nematicida de extratos aquosos e tinturas vegetais sobre Meloidogyne javanica (Treub, 1885) Chitwood, 1949**. 2006. Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós graduação em Agronomia, Área de Concentração em Fitopatologia, da Universidade Federal de Viçosa (UFV, MG). Minas Gerais, MG.

GARDIANO, C. G.; FERRAZ, S.; LOPES, E. A.; FERREIRA, P. A.; AMORA D. X.; DE FREITAS L. G. Avaliação de extratos aquosos de várias espécies vegetais, aplicados ao solo, sobre Meloidogyne javanica (Treub, 1885) Chitwood, 1949 **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.30, n.3, p. 551-556, jul./set. 2009.

GARLET, T. M. B. **Produtividade, teor e composição do óleo essencial de espécies de Mentha L. (Lamiaceae) cultivadas em hidroponia com variação de potássio**. 2007. Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS). Santa Maria, RS.

GASKIN, T. A. Weed hosts of Meloidogyne incognita in Indiana. **Plant Disease Reporter**, v. 42, n. 6, p. 802 – 803. 1958.

GERSHENZON, J.; CROTEAU, R. **Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites**. San Diego: Academic, 1991. v 1, 452 p.

GERSHENZON, J.; MAFFEI, M.; CROTEAU, R. Biochemical and histochemical localization of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of spearmint. **Plant Physiology**, Rockville, v.89, n.4, p.1351-1357, 1989.

GERSHENZON, J.; MCCONKEY, M. E.; CROTEAU, R. Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint. **Plant physiology**, v.122, p. 205-213, 2000.

GONÇALVES, W.; SILVAROLLA, M. B. Nematoides parasitos do cafeeiro. In: Zambolim, L. (ed). **Tecnologias de produção de café com qualidade**. Viçosa: UFV, 2001, p. 199 - 268.

GONÇALVES, W.; SILVAROLLA M. B. A luta contra a doença causada pelos nematoides parasitos do cafeeiro. **O Agrônômico**, v.59, n.1, p. 54 – 56. 2007.

GOSWAMI, B. K.; VIJAYALAKSHWI, K. Efficacy of some plants material and non-edible oilseed cakes against *Meloidogyne incognita* on tomate. **Indian Journal of Nematology**, v.16, n.2, p. 280 – 281. 1986.

GOTTLIED, O. R.; BORIN, M. R. M. B. Natural products research in Brazil. **Ciência e Cultura**, v.49, n. - 6, p. 315 - 320, 1997.

GRISI, M. C. M.; SILVA, D. B.; ALVES, R. B. N.; GRACINDO, L. A. M. B.; VIEIRA, R.F. Avaliação de genótipos de *Mentha* spp) nas condições do Distrito Federal, Brasil. **Revista Brasileira Plantas medicinais**, Botucatu, v.8, n.4, p. 33 – 39 2006.

GURGEN, A. Investigations on important Turkish essential oils. **Dergisi**. Ankara, Yuksek Ziraat Enstitusu, v.9, p. 332 – 360. 1948.

HARBORNE, J. B. **Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids**. Oxford: Clarendon, 1991. p. 466.

HASEEB A.; PANDEY R. Incidence of root-knot nematodes in medicinal and aromatic plants-new host records. **Nematropica**, v.17, n.2, p. 209 – 212. 1987.

HEDGE, I. C. A global survey of the biogeography of the Labiatae. In: HARLEY, R. M.; REYNOLDS, T. **Advance in labiatae science**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1992. p. 7 - 17.

HEWITT, E. B. Berry rot and raisin molds. In: PEARSON, R.C. & GOHEEN, A.C. **Compendium of grape diseases**. p. 26-28. 1994.

HMIRI, S.; RAHOUTI, M.; HABIB, Z.; SATRANI, B.; GHANMI, M.; EL AJIJOURI, M. Evaluation of the antifungal potential of the essential oils of *Mentha pulegium* and *Eucalyptus camaldulensis* in biocentral against fungi responsible for the deterioration of apples in storage. **Bulletin de la Societe Royale des Sciences de Liege**. Rabat, Morocco, v.80, p. 824 – 836. 2011.

INNECO, R.; CRUZ, G. F.; VIEIRA, A. V.; MATTOS, S. H.; CHAVES, F. C. M. Espaçamento, época e número de colheitas em hortelã rasteira (*Mentha x villosa* Huds). **Revista Ciência Agrônômica**. v.34, n.2, p. 247 - 251, 2003.

ISMAILI-ALAOUI, M.; BENJILALI, B.; BUISSON, D.; AZERAD, R. Roles of bioconversions in processing of natural substances: case of essential oils. **Rivista Italiana EPPOS**. Maroc, França, p. 489 – 504. 1997.

IZQUIERDO, J. E.; HUEPP, G.; CHACON, L. Detección de nematodos del género *Meloidogyne* em malezas asociadas a los cafetales. **Ciencia Técnica Agrícola**, v.9, n.1, p. 47 – 54. 1987.

KARL A. C.; SOUZA R. M., MATTOS J. K. A. Patogenicidade de *Meloidogyne javanica* em quatro espécies de plantas medicinais. **Horticultura brasileira**, v.15, n.2, p. 118 - 121, nov. 1997.

KARRAY-BOURAOUI, N.; RABHI, M.; NEFFATI, M.; BALDAN, B.; RANIERI, A.; MARZOUK, B.; LACHAAL, M.; SMAOUI, A. Salt effect on yield and composition of shoot essential oil and trichome morphology and density on leaves of *Mentha pulegium*. **Industrial Crops and Products**. Tunis, Tunisia. v.30, n.3, p. 338 - 343, 2009.

KERRY, B. R. Biological Control. In: BROWN, R. H.; KERRY, B. R. **Principles and practice of nematodes control in crop**. London: Academic Press. 1987. p. 223 - 263.

KHURMA, U. R.; SINGII, A. Nematicidal potential of seed extracts: in vitro effects on juvenile mortality and egg hatch of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*. **Nematologia Mediterranea** v.25, p.49-54. 1997.

KIMATI H.; AMORIM L.; REZENDE J. A. M.; BERGAMIM FILHO A.; CAMARGO L. E. A. **Manual de Fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005.

KJONAAS, ROBERT; CROTEAU, RODNEY. Demonstration that limonene is the first cyclic intermediate in the biosynthesis of oxygenated p-menthane monoterpenes in *Mentha piperita* and other *Mentha* species. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. Pullman, WA, USA. v.220, n.1, p. 79 – 89. 1983.

KOKKINI, S.; HANLIDOU, E.; KAROUSOU, R.; LANARAS, T. Variation of pulegone content in pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) plants growing wild in Greece. **Journal of Essential Oil Research**. Thessaloniki, Greece, v.14, n.3, p. 224 - 227, 2002.

KOKKINI, S.; HANLIDOU, E.; KAROUSOU, R.; LANARAS, T. Clinal variation of *Mentha pulegium* essential oils along the climatic gradient of Greece. **Journal of Essential Oil Research**. Thessaloniki, Greece, v.16, n.6, p. 588 – 593. 2004.

KRASTELEVSKII, V. The yields of some ethereal oils in Ssuchum. **Arbeiten Chem. Pharmazeut. Inst. Moskaus**. Lief, v.11 p. 163 – 166. 1925.

LAFACE, F. Essential oils from uncultivated plants in Calabria. **Chimie et Industrie**, Paris, v.8, p. 1288 – 1289. 1922.

LANZA, F. E; RIBEIRO, R. C. F.; REIS, S. T.; FARIA, M. A. V. R.; XAVIER, A. A. Efeito de *Capraria biflora* sobre a eclosão e mortalidade de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica* in vitro. **Unimontes Científica**. Montes Claros, v. 12, n. 1/2 - jan./dez. 2010.

LOPES, E. A. et al. Efeito dos extratos aquosos de mucuna preta e de manjeriço sobre *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*. Brasil. **Nematologia Brasileira**, v.29, n.1, p. 67-74, 2005.

LOPES, E. A. **Potencial de extratos aquosos e da incorporação ao solo de Mucuna Preta (*Mucuna pruriens* var. *utilis*) para o controle do nematoide das galhas**. Tese (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2004.

LORDELLO, R.R.A.; LORDELLO, A.I.L.; DONALISIO M. G.R. Nematoides das galhas dificultam a produção de mudas de jaborandi. **Bragantia**, Campinas, v.45, n.1, p. 195 – 197. 1986.

LORENZI H.; MATOS F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008, 544p.

LORENZO, D.; PAZ, D.; DELLACASSA, E.; DAVIES, P.; VILA, R.; CAÑIGUERAL, S. Essential oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.45, n.4, p. 519 – 524. 2002.

MACEDO FILHO, B. F.; MATTOS, J. K. A.; SOUZA, R. M. Susceptibilidade de doze germoplasmas de *Mentha* a *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v.18, p. 11. 1994.

MACIEL, S. L. e FERRAZ, L. C. C. B. Reprodução de *Meloidogyne incognita* raça 2 e de *Meloidogyne javanica* em oito espécies de plantas medicinais. **Scientia Agricola**, v.53, n.2/3, p. 232 – 236. 1996.

MAHBOUBI, M.; HAGHI, G. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. **Journal of ethnopharmacology**. Kashan, Iran, v. 119, n. 2, p. 325 - 327, 2008.

MAIA, N. B. Efeito da nutrição mineral na qualidade do óleo essencial da menta (*Mentha arvensis* L.) cultivada em solução nutritiva. In: MING, L.C. (coord.), SCHEFFER, M. C., JUNIOR CORREA, C., BARROPS, I. B. I., MATTOS, J. K. **Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares: avanços na pesquisa agrônômica**. Botucatu: UNESP, 1998. v.2. p. 81-95.

MAIA, N. B. **Produção do óleo essencial de duas espécies de menta cultivadas em solução nutritivas**. Piracicaba, 1958. p. 10.

MAJIDI, L.; EL IDRISSE, M.; HNACH, M. Biosynthesis, synthesis, and reactivity of R-(+)-pulegone: Principal constituent of the essential oil of pennyroyal mint (*Mentha pulegium*). **Physical & Chemical News**. Errachidia, Morocco. v.14, n.1, p. 99 – 114. 2003.

MAROTTI, M.; PICCAGLIA, R.; GIOVANELLI, E.; DEANS, S. G.; EAGLESHAM, E. Effects of planting time and mineral fertilization on peppermint (*Mentha x piperita* L.) essential oil composition and its biological activity. **Journal of Flavour and Fragrance**, Glasgow, v.9, n.3, p. 125 - 129, 1994.

MARTÍNEZ M. J., BETANCOURT J., ALONSO-GONZÁLEZ N., JAUREGUI A. Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity, **Journal of Ethnopharmacology**, v.52, n.3, p. 171-174. 1996.

MARTINEZ, S. S. **O nim – Azadirachta indica**: natureza, usos múltiplos, produção. IAPAR: Londrina -PR, 2002. p. 142.

MARTINS, E. et al. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 2000. 220p.

MARTINS, E. R. Estudos em *Ocimum selloi* Benth: isoenzimas, morfologia e óleo essencial. In: MING L. C. et al. (Coord.). **Plantas medicinais, aromáticas e codimentares: avanços na pesquisa agronômica**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 1998. v.2, p.97-125.

MARTINS, M. B. G.; MAJER, A. P. Análise Morfo-anatômica do limbo foliar de *Ocimum gratissimum* L. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BOTÂNICA DE SÃO PAULO, 12., 1998, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: ESALQ, 1998.

MARTINS, M. C.; BETTI, J.A.; LEITE, R.M.V.B.C.; LEITE JR., R.P.; AMORIM, L. Doenças das Rosáceas de Caroço. In: KIMATI H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.) **Manual de Fitopatologia**: doenças da plantas cultivadas. v.2, 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005, p. 544-557.

MARTINS, P. M. **Influência da temperatura e da velocidade do ar de secagem no teor e da composição química do óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) STAPF.)**. Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa. Programa de Pós- Graduação em Engenharia Agrícola, para obtenção do título de “Magister Scientiae. Viçosa, Minas Gerais – Brasil. Julho – 2000.

MATTOS, S. H., CHAVES, F. C. M., NASCIMENTO, M. M., FREITAS, J. B. S., MATOS, F. J. A., INNECO, R. Épocas de colheita de hortelã rasteira, *Mentha x villosa* Huds. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 36, 1996, Rio de Janeiro, RJ. **Resumos...** Rio de Janeiro, RJ: SOB, 1996. p. 98.

MATTOS, S. H.; INNECCO R.; MARCO C. A.; ARAÚJO A. V. **Plantas Medicinais e Aromáticas Cultivadas no Ceará**: Tecnologia de Produção e Óleos Essenciais. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2007. p. 110p. (Série BNB Ciência e Tecnologia, n. 2).

McCASKILL, D.; GERSHENZON, J.; CROTEAU, R. Morphology and monoterpene biosynthetic capabilities of secretory cell clusters isolated from glandular trichomes of peppermint. (*Mentha piperita* L.). **Planta**, Berlin, v.187, n.4, p. 445 - 454, 1992.

MESQUITA, R. L.; SOUZA, R. M.; MATTOS, J. K. A. Susceptibilidade de plantas medicinais a *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Brasileira**, v.17, p.17. 1993.

MIGUEL, M. G.; ALMEIDA, M. L.; GONCALVES, M. A.; FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. M. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**. Toxic effects of three essential oils on *Ceratitis capitata*. **Faro**, Portugal, v.13, n.2, p. 191 - 199, 2010.

MING, L. C. Mesa redonda sobre plantas medicinais no ensino de 3º grau. In: CONGRESSO SUL-BRASILEIRO DE PLANTAS MEDICINAIS, **Anais...** Maringá, PR, v. 1, 1999.

MOLDAO-MARTINS, M.; TRIGO, R.; NOLASCO, M. A.; GIL, M. G. BERNARDO; DA COSTA, M. L. BEIRAO. Influence of extraction procedure on the aroma composition of *Thymus zygis* L. and *Mentha pulegium* L. **Developments in Food Science**. Lisbon, Portugal, p. 133 - 141, 1998.

MÔNACO, A. P. A.; CARNEIRO, R. G.; KRANZ, W. M.; GOMES, J. C.; SCHERER A.; NAKAMURA, K. C.; MORITZ, M. P.; SANTIAGO D. C. Reação de espécies de plantas daninhas a *Meloidogyne paranaensis*. **Nematologia Brasileira**, v.2, n.2, p. 279 – 283, 2008.

MONTES, M.; VALENZUELA, L.; WILKOMIRSKY, T.; NIEDMANN, C. Determination of pulegone in the essential oil of Chilean *Mentha pulegium* L. **Annales Pharmaceutiques Francaises**. Concepcion, Chile, v.44, n.2, p. 133 – 6. 1986.

MOREIRA F. J. C.; SANTOS C. D. G., ALMEIDA A. M. Hospedabilidade de plantas ornamentais e medicinais a *Meloidogyne incognita* raça 2. **Tropical Plant Pathology**. Brasília, v.33 (Suplemento). 2008.

MORITZ, M. P.; SIMÃO G.; CARNEIRO, R. G. Reação de Aveia a *Meloidogyne incognita* raças 1 e 3, e a *M. paranaensis*. **Nematologia Brasileira**, v.17, n.2, p. 207 – 210. 2003a.

MORITZ, M. P.; SIMÃO G.; CARNEIRO, R. G. Reação de genótipos de milho às raças 1 e 3 de *Meloidogyne incognita* e a *M. paranaensis*. **Nematologia Brasileira**, v.27, n.2, p. 211 – 214. 2003b.

MOURA, R. M. **O Gênero *Meloidogyne* e a Meloidoginose**. Parte I. RAAP. v.4. 1996.

MOURA, R. M.; RÉGIS, E. M. O.; MOURA, A. M. Reação de dez espécies de plantas, algumas produtoras de óleos essenciais, em relação ao parasitismo de *Meloidogyne incognita* raça1 e *M. javanica*, em população mista. **Nematologia Brasileira**, v.14, p. 39 – 44. 1990.

MUELLER-RIEBAU, FRANK J.; BERGER, BERNHARD M.; YEGEN, OKTAY; CAKIR, C. Seasonal variations in the chemical compositions of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Goettingen, Germany. v.45, n.12, p. 4821 – 4825. 1997.

MUELLER-RIEBAU, FRANK; BERGER, BERNHARD; YEGEN, OKTAY. Chemical composition and fungitoxic properties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Goettingen, Germany. v.43, n.8, p. 2262 – 2266. 1995.

NANDAL, S. N.; BHATTI, D. S. Influence of four plant extracts on the hatching of *Meloidogyne javanica* and invasion of host roots. **Nematologia Mediterranea**, Bari, v.14, n.1/2, p. 291-294. 1986.

- NASU, E. G. C. **Composição química da manipueira e sua potencialidade no controle de *Meloidogyne incognita* em tomateiro no oeste do Paraná.** 2008. Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós graduação em Agronomia, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNOESTE, PR). Marechal Cândido Rondon, PR.
- NAVARRO V., VILLARREAL M.L., ROJAS G., XAVIERB L. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases, *Journal of Ethnopharmacology*, v.53, n.3, p.143-147. 1996.
- NEVES, W. S; FREITAS, L. G.; COUTINHO, M. M.; GIARETTA-DALLEMOLE, R.; FABRY, C. F. S.; DHINGRA, O. D.; FERRAZ, S. Nematicidal activity of extracts of red hot chili pepper, mustard and garlic on *Meloidogyne javanica* in green house. *Summa Phytopathologica*, v.35, n.4, p.255-261. 2009.
- OOSTENBRINK, M. **Major characteristic of the relation between nematodes and plants.** Wageningen (Nederland), 1966. p. 46.
- PAPA, M.F.S. Doenças da Acerola. In: KIMATI H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.) **Manual de Fitopatologia: doenças da plantas cultivadas.** v.2, 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p.15-18.
- PARK, S. D.; KIM, J. C.; KHAN Z. Host status of medicinal plants for *Meloidogyne hapla*. *Nematropica*, v.34, n.1, p. 39 – 43. 2004.
- PATEL C. C. et al. Relative susceptibility of certain medicinal and aromatic plants to root-knot nematodes. *Pakistan Journal of Nematology*, v.7, n.2, p. 81 – 82. 1989.
- PAULUS, D.; MEDEIROS, S. L. P.; SANTOS, O. S.; RIFFEL, C.; FABBRIN, G.; PAULUS, E. Substratos na produção hidropônica de mudas de hortelã. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.23, n.1, p. 48 – 50. 2005.
- PEREIRA, O. A. P.; CARVALHO, R. V.; CAMARGO, L. E. A. Doenças do Milho. In: KIMATI H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.) **Manual de Fitopatologia: doenças da plantas cultivadas.** v.2, 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 477-488. 2005.
- PETRAKIS, E. A.; KIMBARIS, A. C.; PAPPAS, C. S.; TARANTILIS, P. A.; POLISSIOU, MOSCHOS G. Quantitative determination of pulegone in pennyroyal oil by FT-IR Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Athens, Greece. v.57, n.21, p. 10044 – 10048. 2009.
- PINO, J. A.; ROSADO, A.; FUENTES, V. Chemical composition of the essential oil of *Mentha pulegium* L. from Cuba. Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia, Havana, Cuba. *Journal of Essential Oil Research*, v.8, n.3, p. 295 – 296. 1996.
- PRODOCIMO, V.; LOZANO, L. A. L. Ocorrência de *Meloidogyne Goeldi*, 1887 (Tylenchida: Heteroderidae) em plantas medicinais na região metropolitana de Curitiba, PR. *Agrárias*. v.17, n.1 - 2, p. 171 – 175. 1998.

PROENÇA DA CUNHA, ANTONIO; ROQUE, ODETE R.; CARDOSO DO VALE, JOSE. Chromatographic and chemical study of the essential oils of *Mentha pulegium* L. of Angola. Lisbon, Port. **Boletim da Faculdade de Farmacia de Coimbra**. v.1, n.1 - 4, p. 23 – 36. 1976.

RAM, M.; KUMAR, S. Yield improvement in the regenerated and transplanted mint *Mentha arvensis* by recycling the organic wastes and manures. **Bioresource Technology**, v.59, n.2, p. 141 – 149. 1997.

RANDHAWA, G.; SATINDER, K. Optimization of harvesting time and row spacing for the quality oil in cornmint (*Mentha arvensis* L) varieties. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.426, p. 615 – 622. 1996.

REBELO, J.A. Controle de Doenças em plantas medicinais. **Anais... I JORNADA CATARINENSE DE PLANTAS MEDICINAIS – SAÚDE E SUSTENTABILIDADE PARA O 3º MILÊNIO**. Tubarão/SC: UNISUL. 1998. p. 91 - 101.

REIS, M. S.; MARIOT, A. Diversidade natural e aspectos agronômicos de plantas medicinais. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001. p. 10 - 12.

REIS-VASCO, E. M. C.; COELHO, J. A. P.; PALAVRA, A. M. F. Comparison of pennyroyal oils obtained by supercritical CO₂ extraction and hydrodistillation. **Flavour and Fragrance Journal**. Lisbon, Port., v.14, n.3, p. 156 – 160. 1999.

RIBEIRO, P. G. F; DINIZ, R. C. **Plantas Aromáticas e Medicinais: cultivo e utilização**. Londrina: IAPAR, 2008. p. 218.

RICH, J. R.; RAHI, G. S.; OPPERMAN, C. H. Influence of the castor bean (*Ricinus communis*) lectin (Ricin) on motility of *Meloidogyne incognita*. **Nematropica**, Bradenton, v. 19, n. 1, p. 99-103, 1989.

RIM IN-SOOK; JEE CHA-HO. Acaricidal effects of herb essential oils against *Dermatophagoides farinae* and *D. pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae) and qualitative analysis of a herb *Mentha pulegium* (pennyroyal). **The Korean journal of parasitology**. Cheongju, Korea, v.44, n.2, p. 133 – 138. 2006.

RITZINGER, C. H. S. P.; COSTA D. da CUNHA. **Nematoides e alternativas de manejo**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Livro_Banana_Cap_10IDgRfpPx1siRpdf>. Acesso em: 24 mar. 2010.

ROCHA, F. S.; CAMPOS, V. P. Efeito de exsudatos de cultura de células de plantas em juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita*. **Fitopatologia Brasileira**. v.29, p. 294-29, 2004.

ROCHA, F. S.; CAMPOS, V. P.; SILVA, J. R. C. Extrato de cultura de células de diversas plantas em juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Brasileira**, v.28, n.2, p.191-198. 2004.

ROESE, A. D.; OLIVEIRA, R. D. DE LIMA. Capacidade reprodutiva de *Meloidogyne paranaensis* em espécies de plantas daninhas. **Nematologia Brasileira**, v.28, n.2, p.137-141, 2004.

ROESE, A. D.; OLIVEIRA, R. D. DE LIMA; LANES, F. F. DE. Reação de cultivares de soja (*Glycines max* L. Merrill) a *Meloidogyne paranaensis*. **Nematologia Brasileira**, v.28, n.2, p. 131 - 135, 2004.

ROHLOFF, J.; DRAGLAND, S.; MORDAL, R.; IVERSEN, T. H. Effect of harvest time and drying method on biomass production, essential oil yield and quality of peppermint (*Mentha x piperita* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. n. 53, p. 4143 – 4148. 2005.

ROMEO, GIOVANNI; GIUFFRE, UGO. Essential oils of *Calaminths nepeta* and of *Mentha pulegium*. **Annali di Chimica Applicata**, v.17, p. 87 – 88. 1927.

SÁ, ISRAEL CÍVICO GIL DE; OLIVEIRA, FERNANDO FAUSTINO DE; DUARTE, LUCIENIR PAINS; KNUPP, VAGNER FERNANDES; OLIVEIRA, ROSILENE APARECIDA DE. Componentes químicos do óleo essencial do poejo. In: XIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E 9ª SEMANA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO DA UESC CIÊNCIAS EXATAS, DA TERRA E ENGENHARIAS. **Anais...** Ilhéus: PROPP/UESC, 2007.

SACRAMENTO, L. V. S.; CAMPOS, M. J. B. Cultivo de hortelã: produção de matéria seca e marcha de absorção de cálcio. **Horticultura Brasileira**, v.20, n.2, Suplemento 2. 2002.

SALGADO, A. P. S. P. **Efeito de luz na planta e no óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*)**. 2005. Dissertação (Doutorado em Fitotecnia) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SALGADO, S. M. L.; CAMPOS, V. P. Eclosão e mortalidade de *Meloidogyne exigua* em extratos e em produtos naturais. **Fitopatologia Brasileira**. v.28, p.166-170. 2003.

SANGWAN, N. S.; FAROOQI, A. H. A.; SHABIH, F.; SANGWAN, R. S. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, n.34, p. 3 – 21. 2001.

SANTIAGO, D. C.; KRZYZANOWSKI, A. A.; HOMECHIN M. Behavior of *Ilex paraguariensis* St. Hilaire, 1822 to *Meloidogyne incognita* and *M. paranaensis* and their influence on development of plantlets. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, PR, v.43, n.2, p. 139 – 142. 2000.

SANTOS FILHO, H. P.; SANTOS, C. C. F. Doenças causadas por fungos. In: SANTOS FILHO, H. P.; JUNQUEIRA, N. T. V. **Maracujá: fitossanidade**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p.12-21. (Embrapa Informação Tecnológica. Série Frutas do Brasil, 32).

SASSER, J. N.; FRECKMAN D. N. A word perspective on nematology: the role of the society. In: VEECH, J. A.; DICKSON **Vistas on Nematology**. Society of Nematologists, Hyattsville (EUA), 1987. p. 6 - 14.

- SCHERER, A.; MÔNACO, A. P. A.; LIMA, A. C. C.; NAKAMURA, K. C.; MORITZ, M. P.; CARNEIRO, R. G. Reação de cultivares de trigo às raças 1 e 3 de *Meloidogyne incognita*, a *Meloidogyne paranaensis* e a *Meloidogyne javanica*. In: XXIX CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 2006, Botucatu, SP. **Anais...** Botucatu, Summa Phytopathologica: Grupo Paulista da Fitopatologia, 2006. p. S61.
- SCHWEITZER, A. R. Mentas. In: DELAVEAU, P., LORRAIN, M., MORTIER, F., RIVOLIER, C., RIVOLIER, J., RIVOLIER, C., SCHWEITZER, A. R. **Segredos e Virtudes das Plantas Mediciniais**. 2. ed. Lisboa: Ed. Resopal – Mem Martins, 1986. p. 212 - 213.
- SEIGLER, D. S. **Plant secondary metabolism**. Boston: Kluwer Academic, 1998. 759 p.
- SILVA, F. DE; CASALI, V. W. D. **Plantas Mediciniais e Aromáticas: Pós colheita e óleos essenciais**. Viçosa: MG, 2000. 135p.
- SILVA, R. V.; OLIVEIRA R. D. L.; ZAMBOLIM L. Primeiro relato da ocorrência de *Meloidogyne paranaensis* em cafeeiro no estado de Goiás. **Nematologia Brasileira**, v. 33, n. 2, p.187 - 190, 2009.
- SIMÕES C. M. O.; SPITZER V. Óleos voláteis. In: SIMÕES C. M. O.; SCHENKEL E. P.; GOSMANN G.; MELLO J. C. P. de; MENTZ L. A.; PETROVICK P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. rev. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS, 2001. cap. 18, p. 397 - 425.
- SIMON, J.E. New crop introduction: exploration, research and commercialization of aromatic plants in the new world. **Acta Horticulturae**, n. 331, p. 209 - 221, 1993.
- SOUZA J. T., CAMPO, V. P., MAXIMINIANO, C. Ocorrência e distribuição de nematoides associados a hortaliças e plantas medicinais. **Summa Phytopathologica**, v. 24, n. 3/4, p. 283 - 291, 1998.
- SOUZA, R. M.; MATTOS, J. K. A.; KARL, A. C. Avaliação preliminar da reação de plantas medicinais a *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*. **Horticultura Brasileira**. v. 13, n. 2, p. 209 - 211, 1995.
- STANGARLIN, J. R.; FRANZENER, G.; PASCHOLATI, S. F. Doenças da Ervilha. In: KIMATI H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.) **Manual de Fitopatologia: doenças da plantas cultivadas**. v. 2, 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005, p. 311-317.
- STOYANOVA, A.; GEORGIEV, E.; KULA, J.; MAJDA, T. Chemical composition of the essential oil of *Mentha pulegium* L. from Bulgaria. **Journal of Essential Oil Research**. Department of Essential Oils, University of Food Technologies, Plovdiv, Bulg, v. 17, n. 5, p. 475 - 476, 2005.
- TAYLOR, A. L. e SASSER, J. N. **Biology, Identification and control of the root-knot nematodes (Meloidogyne species)**. Raleigh, USA, 1978. 111p.
- TESKE, M.; TRENTINI, M. M. **Herbarium compêndio de fitoterapia**. 3. ed. Curitiba: Herbarium, 1997. 182 - 184 p.

THOMASON, I. J. Challenges facing nematology: Enviromental risks with nematocides and the need for new approaches. In: VEECH, J. A & DICKSON, D. W. (Eds.). **Vistas on Nematology**, Hyattsville: Society of Nematologists, 1987. p. 469 - 476.

TIHOHOD, DIMITRY. **Nematologia Agrícola Aplicada**. 2. ed. rev. amp. Jaboticabal, 2000. 473p.

TURNER, G. W.; GERSHENZON, J.; CROTEAU, R. B. Distribution of peltate glandular trichomes on developing leaves of peppermint. **Plant Physiology**, Rockville, v.124, n.2, p. 655 – 663. 2000.

UMNEY, JOHN C.; BENNETT, C. T. Report over Sicilian ethereal oils. [machine translation]. **Pharmaceutical Journal**, Edinburgh, v.21, n.4, p. 860 – 861. 1905.

VERLET, N. Essential oils: supply, demand and price determination. **Acta Horticulturae**, n.344, p.9 – 16. 1993.

VERLET, N. The world herbs and essential oils economy – analysis of the medium term development. **Acta Horticulturae**, n.306, p.474 – 481. 1992.

ZWAVING, J. H.; SMITH, D. Composition of the essential oil of Austrian *Mentha pulegium*. Lab. Pharmacognosy, State Univ., Groningen, Neth. **Phytochemistry** (Elsevier), v.10, n.8, p. 1951 – 1953.1971.

ANEXOS

ANEXO A Normas Revista Nematologia Brasileira

Normas para Publicação na Nematologia Brasileira

A revista **Nematologia Brasileira (NB)** é a publicação oficial da Sociedade Brasileira de Nematologia (SBN). Destina-se à publicação de artigos técnico-científicos que descrevam pesquisas originais em Nematologia e distribuída gratuitamente aos sócios. A submissão do manuscrito implica que os autores são responsáveis por seu conteúdo e aceitam as normas da revista, ficando implícito que não o estão submetendo para publicação em outro periódico. Está também implícito que, no desenvolvimento do trabalho, os aspectos éticos, respeito à legislação vigente do 'copyright' e as normas de segurança em relação ao consumidor foram também observadas. Para que os manuscritos submetidos possam ser publicados com a maior brevidade possível, os autores deverão prepará-las segundo as instruções seguintes:

- 1) A revista aceitará manuscritos em português e inglês.
- 2) Não há taxa de submissão, mas pelo menos o primeiro autor deve ser sócio da SBN e estar em dia com as anuidades; se existir entre os coautores do manuscrito algum sócio da SBN, este deve estar em dia com as anuidades.
- 3) Os manuscritos deverão ser digitados preferencialmente no programa Word e com a seguinte configuração: papel A4 ou Carta, margens de 3 cm, espaço duplo, fonte Times New Roman, tamanho 12 e com numeração de página e linha (contínua).
- 4) Quatro tipos de manuscritos serão considerados: a) **revisão**, com tamanho ideal de 20 a 30 páginas (incluindo Tabelas e Figuras), elaborada por especialista de notório saber convidado(a) pelo editor da NB; b) **ponto de vista**, com tamanho ideal de 4 ou 5 páginas (incluindo Tabelas e Figuras), com a exposição das opiniões pessoais do(s) autor(es) sobre um tema relevante relacionado à Nematologia; c) **artigo**, com tamanho ideal de 15 a 25 páginas (incluindo Tabelas e Figuras) e relatando resultados conclusivos, com base em grande quantidade de dados; d) **comunicação**, com tamanho ideal de 8 a 12 páginas (incluindo Tabelas e Figuras) e relatando resultados que, embora conclusivos, tenham por base pequena quantidade de dados.

5) O título do trabalho deve figurar com a letra inicial de cada palavra, exceto preposições, artigos e conjunções, em maiúscula; na linha abaixo, os nomes dos autores devem aparecer com prenome - abreviatura dos nomes intermediários – sobrenome. Logo abaixo, deverão figurar a instituição, local e e-mail do autor para correspondência.

6) A revisão deverá conter os seguintes tópicos: Resumo (incluindo Palavras-chaves); Summary (incluindo Key words); Introdução; Desenvolvimento; Conclusões (ou Conclusão); Agradecimentos (opcional); e Literatura Citada. Tais tópicos deverão aparecer com inicial maiúscula e alinhados com a margem esquerda. Havendo subtítulos, serão escritos com a primeira inicial em letra maiúscula.

7) Manuscrito na forma de **ponto de vista** deverá conter os seguintes tópicos: Summary (incluindo Key words); Conteúdo; Agradecimento (opcional); e Literatura Citada (opcional).

8) Manuscrito na forma de **artigo** deverá conter os seguintes tópicos: Resumo (incluindo Palavras-chaves); Summary (incluindo Key words); Introdução; Material e Métodos; Resultados e Discussão (o autor pode optar por apresentar os resultados em tópico separado das discussões); Agradecimentos (opcional); e Literatura Citada. Tais tópicos deverão aparecer com inicial maiúscula e alinhados com a margem esquerda. Havendo subtítulos, serão escritos com a primeira inicial em letra maiúscula.

9) Manuscrito na forma de comunicação deverá conter os tópicos: Resumo (incluindo Palavras-chaves); Summary (incluindo Key words); Conteúdo; Agradecimentos (opcional); e Literatura Citada.

10) O Resumo e o Summary são relatos concisos da essência do trabalho, contendo os objetivos propostos e os resultados alcançados. Ambos terão no início o nome dos autores (sobrenome, abreviatura dos nomes anteriores), o ano de publicação e o título do trabalho.

11) Mesmo nas revisões, somente as citações efetivamente pertinentes ao tema estudado deverão ser incluídas. No texto, serão feitas por meio do sobrenome dos autores, com a inicial maiúscula, seguidas do ano de publicação entre parênteses. **Exemplo 1:** Siddiqi (1973). **Exemplo 2:** Ponte & Lemos (1976). Se existirem três ou mais autores, apenas o primeiro nome será citado, seguido de *et al.* (em **itálico**; observe que o ponto final não deve ser em itálico). Exemplo: Zem *et al.* (1982). Sempre que várias referências forem mencionadas entre parênteses, deverá ser adotada a ordem cronológica e não alfabética.

Exemplo: (Luc & Raski, 1980; Doucet *et al.*, 1982; Luc, 1986). A revista não adota o sistema de referências numeradas.

12) Por ocasião da primeira citação no texto, os seguintes procedimentos deverão ser adotados: **a)** deve-se preferir, quando houver, o nome vulgar da planta ou animal, seguido do nome científico, entre parênteses, contendo nome genérico, designação específica e autor, utilizando obrigatoriamente **itálico** para nome genérico e designação específica. Os autores devem seguir as normas constantes dos códigos internacionais de nomenclaturas (zoológica, botânica), em suas edições mais recentes. Não havendo nome vulgar, utilizar somente o nome científico. Sendo possível, incluir o genótipo da planta (cultivar ou híbrido), podendo vir os nomes de cultivares entre apóstrofes. **Exemplo:** figo 'Roxo de Valinhos'. **b)** os nomes de produtos químicos devem ser apresentados pelo nome comum com inicial em minúscula ou, na sua ausência, do nome químico aportuguesado; evitar o uso de nomes comerciais. **Exemplos:** aldicarb (ou aldicarbe), carbofuran (ou carbofurano), oxamil etc. **c)** sugere-se que os valores de medidas sejam apresentados por meio de palavras quando inferiores a dez ou quando não se pretenda atribuir maior exatidão à citação. **Exemplo 1:** realizaram-se cinco ensaios. **Exemplo 2:** coletaram-se aproximadamente oitenta amostras. Contudo, quando o número for seguido de unidade padronizada, algarismos devem ser empregados. **Exemplo 1:** 5,0 m. **Exemplo 2:** 3,5 ml. A revista adota o sistema métrico decimal.

13) Em Material e Métodos, não se deve detalhar técnicas rotineiras e já consagradas nos trabalhos nematológicos, salvo quando os artigos tratarem de modificações ou comparação entre tais procedimentos. O crédito aos proponentes do método será suficiente nesses casos. **Exemplo 1:** índice de galhas segundo Taylor & Sasser (1978). **Exemplo 2:** método de centrifugação segundo Jenkins (1964).

14) Em Resultados e Discussões recomenda-se: a) **Tabelas e Figuras (gráficos, fotografias, imagens)**, sempre que citadas no texto, deverão ter a inicial maiúscula e seguidas de numeral arábico; b) **Tabelas e Figuras** devem conter somente elementos relevantes à compreensão do trabalho, evitando-se informações recorrentes ou encontradas no próprio texto; c) **gráficos** gerados eletronicamente devem ser os originais elaborados nos programas Excel ou Word; d) evite o uso de cores, três dimensões, número excessivo de linhas, barras e símbolos nos gráficos coloridos; d) **fotografias e outras imagens** devem ser ter pelo menos 300 dpi;

15) Na Literatura Citada deverão ser listados, por ordem alfabética, todos os trabalhos mencionados no texto, segundo as especificações e exemplos dados a seguir.

a) Artigos publicados em periódicos: KOENNING, S.R., S.A. WALTERS & K.R. BARKER. 1996. Impact of soil texture and damage potentials of *Rotylenchulus reniformis* and *Meloidogyne incognita* in cotton. *Journal of Nematology*, 28 (4): 527-536.

Observação: no caso de periódicos que, embora editados em países diferentes, possuem o mesmo nome, recomenda-se incluir o local de publicação: *Revista de Agricultura*, Piracicaba, 53 (2): 18.

b) Livros: FERRAZ, S. & L.A.C. VALLE. 2001. Controle de Fitonematóides por Plantas Antagônicas. Editora UFV, Viçosa, 73 p.

c) Capítulos em livros: HOOPER, D.J. 1986. Handling, fixing, staining and mounting nematodes. In: SOUTHEY, J.F. (ed). *Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes*. Her Majesty's Stationery Office, London. p. 59-80.

d) Artigos ou resumos em eventos científicos: LORDELLO, R.R.A, A.L.L. LORDELLO & L.C.E. PEREIRA. 1987. Recuperação de cafeeiros parasitados por *Meloidogyne incognita* raça 1. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, XI, Viçosa. Resumos, p. 21.

e) Teses e Dissertações: CAMPOS, A.S. 2002. Distribuição de *Tylenchulus semipenetrans* e *Pratylenchus jaehni* em citros, no estado de São Paulo, e estudo morfométrico comparativo de populações anfigmáticas de *Pratylenchus* spp. (Dissertação de Mestrado). Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 65 p.

f) Citação de citação: MALEK, K. 1986. Control of *Globodera rostochiensis* by growing resistant varieties of potato. *Ochroa Roslin*, Bonino 30 (5): 5-7. Apud: *Helminthological Abstracts*, 55 (4): 133 (Resumo).

g) Referências eletrônicas: SEAB – Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Paraná. 2006. Paraná é maior produtor de grãos do Brasil. <<http://www.seab.pr.gov.br/modules/noticias/article.php?storyid=2858>>acesso em 5 de agosto de 2007.

16) Os autores terão a opção de submeter os manuscritos de duas diferentes formas: a) **formato eletrônico** enviado por e-mail ao editor e acompanhado de carta de encaminhamento contendo termo de compromisso do autor principal, responsabilizando-se pela ciência aos demais autores; b) **forma impressa** (original e duas cópias) enviada pelo correio, acompanhada de disquete (contendo o arquivo do manuscrito) e carta de encaminhamento com termo de compromisso do autor principal, responsabilizando-se pela ciência aos demais autores.

Endereço para submissão por e-mail

mminomot@esalq.usp.br

Endereço para submissão pelo correio

Nematologia Brasileira

(a/c Mário Inomoto – setor de Zoologia)

ESALQ/USP

13418-900 Piracicaba, SP

Telefone e fax do editor

Fone: 19-3429-4260 ramal 318

Fax: 19-3429-4338

17) Os manuscritos nas formas de **artigo e comunicação** serão enviados a dois revisores *ad hoc* escolhidos dentre os especialistas da área, sócio ou não da SBN, ou ainda a um dos editores associados. Neste caso, o editor associado providenciará o envio aos revisores. A aceitação ou rejeição de um trabalho será decidida pelos revisores *ad hoc*. Em caso de discordância entre os revisores, o parecer definitivo será dado pelo editor ou editor associado, ou será feita consulta a membro da Comissão Editorial.

18) Somente uma revisão será publicada a cada ano. O convite feio ao especialista para a elaboração da revisão pressupõe sua prévia aceitação. Os pontos de vista serão publicados em número máximo de um por fascículo e serão obrigatoriamente avaliados por dois membros da Editoria ou da Comissão Editorial da NB.

19) **Espera-se que os manuscritos submetidos à NB estejam em conformidade com as regras contidas nas presentes normas. Uma das funções dos revisores e dos editores é corrigir eventuais erros formais apresentados pelos manuscritos e orientar os autores, mas a revista reserva-se o direito de recusar manuscritos com muitos erros dessa natureza.**

20) Os artigos serão publicados obedecendo à ordem de aprovação.

21) A revista não fornecerá separatas impressas. Os autores receberão arquivo do artigo em formato pdf.