

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

WALTER MAGRI TEMPORAL

Caracterização parcial do extrato etanólico de *Cymbopogon citratus* e
capacidade de indução de mecanismos de resistência em soja

Maringá

2014

WALTER MAGRI TEMPORAL

Caracterização parcial do extrato etanólico de *Cymbopogon citratus* e
capacidade de indução de mecanismos de resistência em soja

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de doutor.

Área de concentração: Proteção de Plantas.

Orientador: Prof^a. Dra. Kátia Regina Freitas Schwan Estrada.

Maringá

2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

T288c Temporal, Walter Magri
Caracterização parcial do extrato etanólico de
Cymbopogon citratus e capacidade de indução de
mecanismos de resistência em soja / Walter Magri
Temporal. -- Maringá, 2014.
80 f. : il., color., figs., tabs.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Kátia Regina Freitas
Schwan Estrada.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento
de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em
Agronomia, 2014.

1. Plantas medicinais. 2. Indução de resistência.
3. Fitoalexinas. 4. PRPs. 5. Crescimento micelial.
I. Schwan Estrada, Kátia Regina Freitas, orient. II.
Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências
Agrárias. Departamento de Agronomia. Programa de
Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDD 21.ed. 632.4

WALTER MAGRI TEMPORAL

Caracterização parcial do extrato etanólico de *Cymbopogon citratus* e
capacidade de indução de mecanismos de resistência em soja

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de doutor.

Área de concentração: Proteção de Plantas.

APROVADA em 20 de fevereiro de 2014.

Prof. Dr. Disney Dias

Prof^a. Dr^a. Rosane Schwan

Prof^a. Dr^a. Márcia Nozaki

Prof^a. Dr^a. Cristiane Cláudia Meinerz

Prof^a. Dr^a. Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada

DEDICATÓRIA

À

Minha mãe Sônia Maria Magri pelo amor, carinho e paciência sempre dispensados a mim, e pelas oportunidades que, com muito esforço, pôde me proporcionar. Pelas palavras de apoio e incentivo nos momentos em que mais precisei e pelos conselhos que sempre me ajudaram a crescer e a ter forças para continuar prosperando.

Ao

Grande amigo Paulo Beresford, pelas conversas, conselhos e carinho.

Ao

Meu pai, exemplo de cientista e dedicação.

A

Todos meus familiares, em especial minhas irmãs: Raquel Magri Temporal e Fernanda Beresford Rocha, por sempre estarem ao meu lado torcendo por mim, e pela oportunidade de aprender com cada um deles.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Maringá e professores da graduação e pós-graduação, por terem proporcionado condições para o meu desenvolvimento pessoal e intelectual.

À UNIOESTE e à UNINGÁ pelo fornecimento de apoio técnico.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

À professora Dra. Kátia Regina Freitas Schwan Estrada, pelo carinho, respeito, atenção, credibilidade, e por não medir esforços para me ajudar. Obrigado por ter ampliado minha visão do que é ciência e, principalmente, pela paciência em sanar minhas dúvidas.

Aos amigos José Neto, Giseli Valentini, Júnior Severino Araújo, José Bortolo, e Cristiane Meinerz por se disponibilizarem a me auxiliar em qualquer questão no laboratório e nas dúvidas durante o desenvolvimento da tese.

Aos amigos Cássius Santana, Fernando Sarpa Brigante, Taise Bijora, Guilherme Matsushita, Eliel Albino, João Monelli Neto, Tátia Leika, Tainá Pieri, Renata Mesquini, Renata Schiavon e João Vitor Voltarelli pela amizade e incentivo.

Aos meus colegas de Maringá, Palmeiras, alemão e aeroclubes, pelo companheirismo, alegrias e por todos os momentos que compartilhamos.

“A ignorância suplica confiança mais frequentemente do que o conhecimento: são aqueles que sabem pouco, e não os que sabem muito, que afirmam tão positivamente que esse ou aquele problema nunca será resolvido pela ciência.” *Charles Darwin*, 1871.

“Nada é mais digno de nosso patrocínio que o fomento da ciência e da literatura. O conhecimento é, em todo e qualquer país, a base mais segura da felicidade pública.” *George Washington*, discurso no Congresso, 8 de janeiro de 1790.

“Toda a nossa ciência, comparada a nossa realidade, é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.” *Albert Einstein* (1879-1955).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Crescimento micelial de *Colletotrichum truncatum* e *Corynespora cassiicola* após 120 horas em meio BDA com concentrações crescentes de extrato etanólico de *Cymbopogon citratus* em relação à testemunha água.....42

Tabela 2: Peso molecular das frações obtidas da cromatografia de exclusão (kDa), teores de proteínas e de açúcares redutores ($\mu\text{g.mL}^{-1}$), atividade específica de enzimas relacionadas à defesa em cotilédones de soja e acúmulo de gliceolina.....66

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Médias obtidas de temperatura (°C) em linha vermelha e umidade relativa do ar (%), em colunas azuis, referentes ao período de plantio e coleta do capim-limão. Maringá/PR, 2011.....30
- Figura 2:** Precipitação (mm) referente ao período de plantio e coleta do capim-limão. Maringá/PR, 2011.....30
- Figura 3:** Temperatura média (°C) em linha vermelha e umidade relativa do ar (%) em colunas azuis, referente ao período de plantio e coleta das folhas de soja em vasos. Santa Cruz das Palmeiras, SP, 2011-2012.....33
- Figura 4:** Acúmulo de gliceolina em cotilédones de soja após aplicação de diferentes concentrações (50, 100, 200 e 400 mg.L⁻¹) de extrato bruto etanólico (EBE) de *Cymbopogon citratus* colhido em duas estações do ano: verão e inverno. Dose utilizada para a testemunha ASM (acibenzolar-S-metil): 100 mg i.a L⁻¹. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância pelo teste F. C.V.: 8,76 %.....45
- Figura 5:** Atividade de β-1,3-glucanase em cotilédones de soja após aplicação de diferentes concentrações (50, 100, 200 e 400 mg.L⁻¹) de extrato bruto etanólico (EBE) de *Cymbopogon citratus* colhido em duas estações do ano (verão e inverno). Teste de média a 5% de significância pelo teste F. ASM a 100 mg i.a L⁻¹. C.V. (%): 18,66.....47
- Figura 6:** Atividade de β-1,3-glucanase em folhas tratadas e não tratadas de soja em diferentes períodos de coleta (0, 12, 24, 48 e 72 horas), após a aplicação do extrato bruto etanólico de capim-limão (EBE) colhido em duas estações do ano (verão e inverno), nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 mg.L⁻¹. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. T1= EBE a 50 mg; T2= EBE a 100 mg; T3= EBE a 200 mg; T=4 EBE a 400 mg. C.V.: 27,63%.....49

Figura 7: Atividade peroxidase em cotilédones de soja após aplicação de diferentes concentrações (50, 100, 200 e 400 mg.L⁻¹) de extrato bruto etanólico (EBE) de *Cymbopogon citratus* colhido em duas estações do ano (verão e inverno). Teste de média a 5% de significância pelo teste F. ASM a 100 mg i.a L⁻¹. C.V. (%): 12,53.....51

Figura 8: Atividade de peroxidase em folhas tratadas e não tratadas de soja em diferentes períodos de coleta (0, 12, 24, 48 e 72 horas), após a aplicação do extrato bruto etanólico de capim-limão (EBE) colhido em duas estações do ano (verão e inverno), nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 mg.L⁻¹. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. T1= EBE a 50 mg; T2= EBE a 100 mg; T3= EBE a 200 mg;T=4 EBE a 400 mg. C.V.: 18,85%.....53

Figura 9: Atividade de fenilalanina amonialiase em cotilédones de soja após aplicação de diferentes concentrações (50, 100, 200 e 400 mg.L⁻¹) de extrato bruto etanólico (EBE) de *Cymbopogon citratus* colhido em duas estações do ano: verão e inverno. Teste de média a 5% de significância pelo teste F. ASM a 100 mg i.a L⁻¹. C.V. (%): 46,53.....55

Figura 10: Atividade de fenilalanina amônia liase em folhas tratadas e não tratadas de soja em diferentes períodos de coleta (0, 12, 24, 48 e 72 horas), após a aplicação do extrato bruto etanólico de capim-limão (EBE) colhido em duas estações do ano: verão e inverno, nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 mg.L⁻¹. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. T1= EBE a 50 mg; T2= EBE a 100 mg; T3= EBE a 200 mg;T=4 EBE a 400 mg. C.V.: 25,37%.....56

Figura 11: Atividade de quitinase em cotilédones de soja após aplicação de diferentes concentrações (50, 100, 200 e 400 mg.L⁻¹) de extrato bruto etanólico (EBE) de *Cymbopogon citratus* colhido em duas estações do ano: verão e inverno. Teste de média a 5% de significância pelo teste F. ASM a 100 mg i.a L⁻¹. C.V. (%): 3,36.....59

Figura 12: Atividade de polifenoloxidase em folhas tratadas e não tratadas de soja em diferentes períodos de coleta (0, 12, 24, 48 e 72 horas), após a aplicação do extrato bruto etanólico de capim-limão (EBE) colhido em duas estações do ano: verão e inverno, nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 mg.L⁻¹. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. T1= EBE a 50 mg; T2= EBE a 100 mg; T3= EBE a 200 mg; T4= EBE a 400 mg. C.V.: 16,84%.....61

Figura 13: Cromatografia de troca iônica extrato bruto etanólico de *Cymbopogon citratus*. Uma amostra de 3 ml foi aplicada em resina DEAE Celulose, equilibrada em tampão Tris – HCl, 10 mM, pH 8,0. O material adsorvido foi eluído por concentração de NaCl em “step wise” (0M, 0,125M, 0,25M, 0,5M e 1M). Frações de 5 ml foram coletadas. (♦) Leitura de proteínas a 285 nm. (○) Leitura de carboidratos a 410 nm pelo método de Lever. Concentrações de NaCl medidas indiretamente por condutividade (●). 1, 2, 3, 4, 5 e 6 indicam os picos proteicos; 7 indica picos glicídicos reunidos.....64

Figura 14: Perfil proteico (lido indiretamente a 280 nm de absorbância) e glicídico (lido indiretamente a 410 nm de absorbância) obtido por cromatografia de exclusão a partir da fração 1 da cromatografia de troca iônica. 1G = pico proteico. 2G = pico glicídico (coincidente com pico proteico).....64

Figura 15: Perfil proteico (lido indiretamente a 280 nm de absorbância) e glicídico (lido indiretamente a 410 nm de absorbância) obtido por cromatografia de exclusão a partir da fração 2 da cromatografia de troca iônica. 3G = pico glicoproteico. 4G = pico glicídico.....65

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. A cultura da soja e sua importância econômica.....	3
2.2. Doenças da soja	5
2.2.1. Antracnose da soja	6
2.2.2. Mancha-alvo da soja.....	7
2.3. Plantas medicinais no controle de doenças.....	9
2.4. O capim-limão	13
2.5. Mecanismos de resistência em plantas	17
2.5.1. Indução de resistência	17
2.5.2. Fitoalexinas	21
2.5.3 Proteínas relacionadas à patogênese	22
2.5.3.1. β -1,3-glucanases (EC 3.2.1.39).....	23
2.5.3.2. Peroxidases (EC 1.11.1.7).....	23
2.5.3.3. Fenilalanina amônia-liase (EC 4.3.1.5).....	24
2.5.3.4. Polifenoloxidasas (EC 1.14.18.1).....	25
2.5.3.5. Quitinases (EC 3.2.1.14)	26
2.6. Cromatografia de troca iônica e cromatografia de exclusão.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1. Obtenção do extrato bruto vegetal	29
3.2. Bioensaio com fitopatógenos <i>in vitro</i>	30
3.2.1. Obtenção dos fungos fitopatogênicos	30
3.2.2. Bioensaio de crescimento micelial.....	31

3.3. Plantio, manutenção e coleta de plantas de soja para análise bioquímica	31
3.4. Produção de fitoalexinas em cotilédones de soja.....	33
3.5. Determinação de enzimas relacionadas à defesa	34
3.5.1. Obtenção da preparação enzimática	34
3.5.2. Atividade de β -1,3-glucanase	34
3.5.3. Atividade de peroxidases	34
3.5.4. Atividade de fenilalanina amônia-liase	35
3.5.5. Atividade de quitinases	35
3.5.6. Atividade de polifenoloxidasas	35
3.5.7. Determinação de proteínas totais	36
3.6. Separação dos componentes da preparação elicitora bruta através de cromatografia de troca iônica (CTI).....	36
3.7. Separação dos componentes da preparação elicitora bruta através de cromatografia de filtração em gel (CFG) - cromatografia de exclusão	37
3.8. Análise estatística dos dados da atividade enzimática de cotilédones de soja.....	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1. Condições edafoclimáticas de plantio e coleta do material vegetal.....	39
4.1.1. Condições edafoclimáticas do local de colheita do capim limão.....	39
4.2. Bioensaio de crescimento micelial de <i>Colletotrichum truncatum</i> e <i>Corynespora cassicola</i>	40
4.3. Atividade do extrato bruto etanólico de capim-limão na produção de fitoalexinas em cotilédones de soja	43
4.4. Condições edafoclimáticas do local de instalação do experimento em vasos com plantas de soja	45

4.5. Atividade do extrato bruto etanólico de capim-limão na atividade de enzimas relacionadas à patogênese em cotilédones e folhas de soja	46
4.5.1. Atividade de β -1,3-glucanase	46
4.5.2. Atividade de peroxidase	50
4.5.3. Atividade de fenilalanina amônia liase	54
4.5.4. Atividade de quitinase	58
4.5.5. Atividade de polifenoloxidase.....	59
4.6. Cromatografia de troca iônica (CTI)	62
4.7. Produção de gliceolina e atividades enzimáticas induzidas pelas frações da CTI e CE	65
5. CONCLUSÕES	69
6. REFERÊNCIAS	70

Caracterização parcial do extrato etanólico de *Cymbopogon citratus* e capacidade de indução de mecanismos de resistência em soja

RESUMO

Compostos produzidos por plantas medicinais que apresentam capacidade de ativar mecanismos de defesa de plantas vêm sendo estudados como ferramenta ecologicamente viável na agricultura. Entre essas plantas encontra-se o capim-limão (*Cymbopogon citratus*). O presente trabalho teve o objetivo de avaliar aspectos bioquímicos sobre a soja quando tratada com extratos etanólicos de *C. citratus*, obtido de material coletado no verão e no inverno. Foi avaliada a capacidade de indução de gliceolina e de proteínas relacionadas à patogênese (PR-Proteínas), assim como a ação antimicrobiana sobre *Colletotrichum truncatum* e *Corynespora cassiicola*. Cotilédones de soja e folhas de soja foram tratados com os extratos vegetais, além de acibenzolar-S-metil (ASM) (100 mg i.a.L⁻¹) e água destilada. Plantas de soja tratadas tiveram amostras retiradas às 0, 12, 24, 48 e 72 horas após a aplicação do extrato para as análises das enzimas de defesa da planta. Foram determinados: indução de gliceolina, e mudanças das atividades das enzimas peroxidase, polifenoloxidase, fenilalanina amônia-liase, β -1,3-glucanase e quitinase. As avaliações de crescimento micelial foram realizadas pelo período de 120 horas. O parâmetro avaliado foi a inibição de crescimento da colônia em comparação com a testemunha água. De forma geral, os fungos demonstraram respostas diferenciais entre si: a maior concentração do extrato afetou negativamente o *C. truncatum*, enquanto *C. cassiicola* utilizou nutrientes presentes no meio para seu crescimento. As análises bioquímicas revelaram que, em relação à peroxidase em cotilédones de soja, houve redução da atividade enzimática quando comparada as testemunhas, com exceção de tratamentos originados de material colhido no verão. Em folhas, a atividade de peroxidase foi aumentada por todos os tratamentos. A atividade de β -1,3-glucanase em cotilédones foi aumentada principalmente pelo EBE de verão a 200 e 400 mg.L⁻¹. Em folhas, a atividade de β -1,3-glucanases foi aumentada por todos os tratamentos, porém não foi observado efeito da concentração sobre o aumento da atividade. Houve aumento da atividade de polifenoloxidases somente com o uso do EBE de inverno. Não houve diferença significativa para FAL em cotilédones de soja, assim como nas amostras foliares. Médias inferiores a da testemunha negativa, sugere-se que nos extratos pode haver inibidores dessa enzima. A atividade enzimática de quitinases em cotilédones de soja foi aumentada somente com o uso do extrato de material de inverno. O extrato de maior atividade, EBE a 100 mg.L⁻¹ igualou-se a

testemunha ASM. Para todas as enzimas, observou-se aumento da atividade, principalmente a partir das 24 horas após a aplicação dos tratamentos. Esse período de tempo é necessário para o redirecionamento de metabólitos para a defesa da planta. As cromatografias permitiram obter frações com efeito sobre cotilédones. Na cromatografia de troca iônica, observou-se eficiência no fracionamento somente com elicitores de gliceolina, β -1,3-glucanases e FAL, enquanto para a cromatografia de exclusão não foi possível separar elicitores. Foram constatados mecanismos de defesa ativados em soja pela aplicação dos extratos de capim-limão, e que podem variar quando o material vegetal é colhido em diferentes estações do ano. Os resultados podem permitir o desenvolvimento de métodos alternativos para controle de doenças em plantas.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Indução de resistência. Fitoalexinas. PRPs. Crescimento micelial.

Partial characterization of crude ethanolic extract of *Cymbopogon citratus* and its ability to induce resistance in soybean

ABSTRACT

Compounds produced by medicinal plants with capacity to activate defense mechanisms of plants have been studied as an ecologically viable tool in agriculture. Among these plants is lemongrass (*Cymbopogon citratus*). This study aimed to assess biochemical aspects of soybean when treated with ethanolic extracts of *C. citratus*, obtained from material collected in summer and winter. The ability to glyceolin induction and pathogenesis-related proteins (PR - proteins) was assessed, as the antimicrobial action against *Colletotrichum truncatum* and *Corynespora cassiicola*. Cotyledons of soybean and soybean leaves were treated with plant extracts, as well as acibenzolar -S- methyl (ASM) (100 mg a.i. L⁻¹) and distilled water. Soybean plants treated samples were withdrawn at 0, 12, 24, 48 and 72 hours after treatments application for enzymatic analysis. Were determined: glyceolin induction, and changes in the peroxidase activity, polyphenol oxidase, phenylalanine ammonialyase, β -1,3-glucanase and chitinase. The mycelial growth assessments were performed for 120 hours. The parameter evaluated was the inhibition of colony growth compared with water standard. In general, fungi showed differential responses to each other. The highest concentration of the extract negatively affected *C. truncatum*, while *C. cassiicola* used nutrients present in the medium for its growth. Biochemical analyzes revealed that, compared to the peroxidase activity in soybean cotyledons, there was decrease in enzyme activity when compared to standards, with the exception of treatments originated from material collected in the summer. In leaves, the peroxidase activity was increased by all treatments. The β -1,3-glucanase activity in cotyledons was mostly increased by summer extract at 200 and 400 mg.L⁻¹. In leaves, the β -1,3-glucanases activity was increased by all treatments, with no effect of concentration. There was increased activity of polyphenol only using the winter extract. There was no significant difference for FAL in soybean cotyledons as well as in leaf samples. Lower ratings to the negative standard suggested that extracts could contain inhibitors of this enzyme. The enzymatic activity of chitinase in soybean cotyledons was increased only with the use of extract of winter material. For all enzymes, increased activity was observed mainly after 24 hours of treatment application. This period of time is required for metabolites redirection to defense. Chromatographies allowed to obtain fractions with effect on cotyledons. In ion exchange chromatography, fractionation efficiency was observed only with glyceollin

elicitors, β -1,3-glucanases and FAL, while for exclusion chromatography was not possible to separate elicitors. Defense mechanisms activated in soybean by the application extracts of lemon grass were noted, and may vary when plant material is harvested in different seasons. The findings may enable the development of alternative methods to control plant diseases.

Keywords: Medicinal plants. Resistance induction. Phytoalexins. PRPs. Mycelial growth.

1. INTRODUÇÃO

A demanda de gêneros agrícolas, bem como a busca de maior retorno financeiro, por parte dos produtores, têm feito com que os agricultores usem produtos tóxicos de maneira inadequada no controle de doenças e pragas de plantas, independentemente de resíduos serem prejudiciais ao ambiente (BETTIOL; MORANDI, 2009). Essas práticas ignoraram a dinâmica ecológica dos agroecossistemas e mostram seus efeitos contemporâneos de insustentabilidade. Além dos danos causados à conservação e qualidade do meio, o controle químico tradicional, muitas vezes, depara-se com o surgimento de pragas e patógenos resistentes às moléculas sintéticas utilizadas (BETTIOL; MORANDI, 2009).

Entre as alternativas viáveis ao combate a pragas está o uso de produtos baseados em moléculas de origem natural, como metabólitos de plantas medicinais que atuam sobre outros organismos, sem efeitos adversos sobre os recursos naturais e sobre a saúde do homem (SCHWAN-ESTRADA *et al.*, 2012). Metabólitos de plantas medicinais como *Cymbopogon citratus* têm se mostrado promissores no controle de pragas e doenças de plantas de grande importância econômica.

Fitopatógenos importantes que atacam a cultura da soja, como os fungos *Colletotrichum truncatum*, causadores da antracnose, e *Corynespora cassiicola*, que causa a mancha-alvo, podem levar a grandes perdas na produção, exigindo grande investimento de recursos no controle dessas doenças (PICANÇO *et al.*, 2009). Considerando a importância econômica da cultura da soja para o Brasil, que representa movimentação de mais de 17 bilhões de dólares ao ano, e de mais de 4,5 milhões de empregos ligados ao setor, o estudo de medidas de controle sustentável e eficiente contra essas doenças faz-se necessário.

Embora pesquisas atuem no caminho da elucidação das vias metabólicas de plantas e patógenos, pouco se conhece dos compostos biologicamente ativos sobre as plantas para comunicação sistêmica e manutenção de sua defesa (PASCHOLATI; LEITE, 1994). Compostos presentes nos extratos e óleos de plantas medicinais devem ser caracterizados e estudados, a fim de que possam ser esclarecidos os mecanismos de ação, e permitir o uso dessas moléculas no manejo integrado de doenças de plantas de forma prática e sustentável.

Além dos efeitos fungitóxicos diretos, também se buscam moléculas capazes de levar a uma interação planta-patógeno compatível com uma relação não-compatível pela indução de mecanismos de defesa na planta hospedeira, tais como proteínas relacionadas à patogênese e fitoalexinas (SCHWAN-ESTRADA *et al.*, 2008; PASCHOLATI; LEITE, 1994). As enzimas ativadas podem ser peroxidase, polifenoloxidasas, quitinases, β -1,3-glucanase, capazes de

degradar a parede celular de fungos e bactérias patogênicos, e glicoproteínas ricas em hidroxiprolinas, bem como atuar na lignificação de tecidos e produção de compostos tóxicos aos patógenos (PASCHOLATI; LEITE, 1995). As fitoalexinas apresentam natureza química variada, atuando sobre microrganismos com baixa especificidade, e seu modo de ação leva a efeitos tóxicos sobre as células do parasita, culminando na inibição do crescimento ou na morte do patógeno (BRAGA, 2008).

Uma vez ativada, a resistência é capaz de respostas efetivas de defesa nas plantas contra diversos tipos de agentes patogênicos tais como bactérias, vírus, fungos, e também a nematóides e insetos (ROMEIRO, 2008).

Essas moléculas ativadoras de mecanismos de resistência, denominadas de elicitores, podem ter natureza biótica (carboidratos, glicoproteínas, polipeptídeos, lipídeos, patógenos avirulentos ou atenuados, bactérias promotoras de crescimento, leveduras) (STANGARLIN; PASCHOLATI, 1994); ou abiótica, como metais pesados, fosfitos, silicatos, HgCl₂, etefon, e luz ultravioleta (CAVALCANTI *et al.*, 2005), todos capazes de estimular respostas de defesa nas plantas efetivas contra diversos tipos de agentes patogênicos (bactérias, vírus, fungos, e também a nematóides e insetos). Produtos que atuam como indutores estão disponíveis no mercado, entre eles Bion (acibenzolar-S-metil, ASM: ácido benzo (1,2,3) tiadiazol-7-carbotióico), Messenger, e Elexa (SOBRINHO *et al.*, 2005).

A caracterização de possíveis elicitores presentes em extratos vegetais pode levar a otimização no uso dos preparados, além de permitir melhor compreensão dos mecanismos que envolvem a ativação da defesa da planta. Como consequência, haveria a criação de uma alternativa viável e sustentável ao método de controle convencional.

Com o intuito de verificar possíveis mecanismos de ação de plantas de soja utilizando extrato bruto etanólico de *C. citratus*, o presente trabalho teve como objetivos:

- Verificar a ação antimicrobiana direta sobre os fitopatógenos *Colletotrichum truncatum* e *Corynespora cassiicola*;
- Separar frações biologicamente ativas do extrato etanólico;
- Verificar o potencial indutor do extrato etanólico obtido de folhas de capim-limão colhidas no inverno e no verão;
- Avaliar a capacidade do extrato etanólico de capim-limão em induzir fitoalexinas;
- Avaliar o efeito do extrato etanólico de capim-limão e das frações obtidas das cromatografias sobre as atividades de peroxidases, quitinase, fenilalanina amônia-liase, polifenoloxidasas e β -1,3-glucanase, tanto em cotilédones de soja quanto em plantas em estágio V4.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cultura da soja e sua importância econômica

A soja é uma leguminosa herbácea anual de grande interesse econômico devido ao alto teor proteico e de óleo em seus grãos, de aproximadamente 40 e 20%, respectivamente, na relação massa/volume (BERTRAND *et al.*, 1987). Sua fácil adaptação aos diversos tipos de clima e fotoperíodos faz com que seja uma das principais oleaginosas cultivadas. Entre as aplicabilidades da soja, o grão pode fornecer óleo para a alimentação humana, e ser base para a produção de biodiesel, desinfetantes, lubrificantes e sabões (ZANCOPE; NASSER, 2005). O farelo é utilizado na alimentação humana e animal, e também na manufatura de produtos processados ou semiprocessados. Além disso, a própria planta pode ser utilizada como adubo verde, forragem, silagem, feno e pastagem (SEDIYAMA *et al.*, 2009a).

O uso da soja vem recebendo cada vez mais atenção devido as suas propriedades nutricionais, garantindo lugar de destaque nos chamados alimentos funcionais, que contribuem para a manutenção de saúde e no combate de doenças (SEDIYAMA *et al.*, 2009b). A combinação de suas propriedades com as dos cereais, como milho, arroz, cevada e centeio permite a complementação de aminoácidos necessários para uma dieta equilibrada e saudável (TEIXEIRA *et al.*, 2009).

Os nutrientes encontrados na soja variam conforme o teor encontrado nos solos em que a soja é cultivada. Entre os principais nutrientes estão potássio, sódio, magnésio, enxofre e fósforo (TEIXEIRA *et al.*, 2009). Outro benefício advindo do consumo da soja é o de isoflavonas, que ajudam a prevenir doenças coronárias, algumas formas de câncer, osteoporose e diminuem os efeitos da menopausa (SEDIYAMA *et al.*, 2009b).

A origem evolutiva da soja remonta à África, Ásia oriental e Austrália, e os relatos da domesticação do gênero pelo homem datam de quase 1100 anos a.C., na região nordeste da China (SEDIYAMA *et al.*, 2009a). A classificação sistemática a coloca como pertencente a divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Fabales, família Fabaceae (Leguminosae), subfamília Faboideae (Papilionoideae), gênero *Glycine*, espécie *Glycine max* e forma cultivada *Glycine max* (L.) Merrill. A forma cultivada foi introduzida na Coreia, e posteriormente no Japão, por volta de 200 a 300 anos antes da era cristã. Talvez o registro mais antigo seja a descrição no livro do imperador chinês Sheng-Nung por volta de 2838 a.C. (SEDIYAMA *et al.*, 2009a). Além disso, consta entre as cinco espécies de plantas sagradas para diversas culturas (arroz, trigo, cevada, milho e soja).

Em 1740 a soja foi levada para a Europa (Paris – França) e em 1805 foi citada pela primeira vez nos Estados Unidos da América. Todavia, até 1941 o seu principal uso era para alimentação animal (ZANCOPÉ; NASSER, 2005). Já no Brasil, a primeira referência data 1882, na Bahia. No entanto, as cultivares provenientes dos EUA não tiveram boa adaptação (EMBRAPA, 2013). Em 1891 novas cultivares foram introduzidas em Campinas, São Paulo, e no Rio Grande do Sul, com melhor desenvolvimento nos dois Estados do que na Bahia. Todavia, foi com a imigração japonesa, principalmente para São Paulo, em 1908, que ocorreu a introdução de cultivares mais específicas para o consumo humano (SEDIYAMA *et al.*, 2009a). Em Santa Catarina, a introdução da soja ocorreu na década de 30, em Minas Gerais na década de 20, e em Goiás em 1950. Nos demais estados das regiões Central, Norte, e Nordeste a introdução ocorreu a partir da década de 70. No entanto, o cultivo da soja para produção comercial de grãos teve início no Rio Grande do Sul por volta de 1935, cuja principal finalidade era para a alimentação de suínos, e a primeira exportação realizada em 1938 para a Alemanha (ZANCOPÉ; NASSER, 2005; SEDIYAMA *et al.*, 2009a).

As principais causas da expansão da soja foram: a semelhança das condições ambientais da região Sul (em torno de 30 graus) com a do Sul dos EUA, de onde a maioria das cultivares era originada; a “Operação Tatu”, que promoveu a calagem e correção de fertilidade do solo no Rio Grande do Sul; incentivos fiscais nas décadas de 50, 60 e 70; alta do mercado na década de 70 (devido a frustrações nas safras da Rússia e China); substituição de gordura animal por óleos vegetais e margarina; o estabelecimento de parque industrial de processamento de soja em vários pontos do país; modernização de máquinas e insumos agrícolas; facilidade de mecanização para atividades culturais da produção; implantação de cooperativismo eficiente; organização de rede de pesquisas dos setores públicos apoiadas por iniciativas privadas; melhoria do sistema viário; o baixo valor da terra na região central nas décadas de 60, 70 e 80, comparativamente às do Sul; topografia altamente favorável da região dos cerrados; desenvolvimento de tecnologias para produção em baixas latitudes; boas condições físicas do solo; estabelecimento de corredores de exportação; boas condições econômicas dos empresários que migraram do Sul; e o regime pluviométrico favorável ao cultivo na época do verão, coincidindo com o período de entressafra da produção dos EUA (ZANCOPÉ; NASSER, 2005; EMBRAPA, 2005).

A área cultivada, que somava 400 mil hectares no período de 1960/69, passou para cerca de 24,2 milhões de hectares em 2010/11, e a produção de aproximadamente 500 mil toneladas alcançou 75 milhões de toneladas. Nesse período, a produtividade média passou de

1089 kg/hectare para 3106 kg/hectare. Em 2011, foram exportados US\$ 26,1 bilhões pelo Brasil (EMBRAPA, 2013).

No mesmo período, a produção correspondeu a 24,52% da produção mundial. O Mato Grosso produziu 23,5 milhões de toneladas, e o Paraná 15,9. Comparativamente, a produção dos EUA foi de 82,6 milhões de toneladas, correspondendo a quase 31% da produção mundial, que foi estimada em 267,9 milhões de toneladas. Além dos benefícios diretos para a economia, acredita-se que o total de empregos gerados pelo agronegócio da soja ultrapasse 4,5 milhões (EMBRAPA, 2013).

2.2. Doenças da soja

Dos 125 microrganismos patogênicos para a soja já relatados, 40 são capazes de causar doenças de importância econômica. No Brasil, cerca de 25 patógenos são considerados preocupantes, e algumas doenças, que nas décadas de 70 e 80 não eram relatadas ou não causavam danos economicamente significativos, hoje são fatores limitantes para a produção. Alguns dos fatores que influenciaram esse processo foram: cultivo em grandes áreas, mudanças na suscetibilidade durante o melhoramento visando outras propriedades agronômicas, introdução de variedades e inóculo de outros países, mudanças no sistema de cultivo, nutrição das plantas, uso de agrotóxicos e seleção de estirpes mais virulentas do patógeno (PICANÇO *et al.*, 2009).

Entre as principais doenças estão: a ferrugem asiática (causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*), o crestamento foliar de cercospora (*Cercospora kikuchii*), mancha "olho-de-rã" (*Cercospora sojina*), mancha-alvo (*Corynespora cassiicola*), antracnose (*Colletotrichum truncatum*), e oídio (*Microsphaera diffusa*). Os danos anuais de produção por doenças são estimados em 15 a 20%, no entanto algumas podem ocasionar danos de quase 100% (EMBRAPA, 2013).

Com a expansão de áreas irrigadas nos cerrados, há a possibilidade do cultivo da soja no outono/inverno para a produção de sementes. Esse sistema favorece a sobrevivência dos fungos causadores da antracnose, do cancro da haste, da podridão branca da haste, da podridão vermelha da raiz, dos nematóides de galhas e do nematóide do cisto. A maioria dos patógenos é transmitida por sementes e, portanto, o uso de sementes sadias ou o tratamento das sementes é essencial para a prevenção ou a redução das perdas. Os exemplos mais evidentes de doenças que são disseminadas pelas sementes são a antracnose, a seca da haste e vagem (*Phomopsis* spp.), a mancha púrpura da semente e o crestamento foliar de cercospora,

a mancha "olho-de-rã", a mancha parda (*Septoria glycines*) e o cancro da haste (*Diaporthe phaseolorum* f.sp. *meridionalis*) (HENNING, 2010; EMBRAPA, 2013).

2.2.1. Antracnose da soja

Dentre os microrganismos que limitam a obtenção de altos rendimentos em soja, o fungo *Colletotrichum truncatum* sinonímia: *Colletotrichum dematium* f. *truncatum* (Schwein) Arx *Vermicularia truncata* Schwein, causador da antracnose, é capaz de atacar todas as partes da planta durante a fase vegetativa, floração, frutificação e sementes (MYCOBANK, 2013; EMBRAPA, 2013).

O patógeno é introduzido principalmente por sementes infectadas e sobrevive na entressafra nos restos culturais. Este fungo, à semelhança de *Phomopsis* spp. e *Fusarium semitectum*, também perde a viabilidade durante o armazenamento, porém é mais persistente, apesar de sua incidência diminuir quando as sementes são armazenadas em condições ambientes por um período de seis meses (GOULART, 2005).

A antracnose é considerada a principal enfermidade na fase inicial de formação das vagens, que em condições de elevada precipitação e altas temperaturas, frequentes na região dos cerrados, pode causar de 16 a 100% de perdas na produção (GOULART, 2000). É comum causar redução acentuada no número de vagens, retenção foliar e haste verde, além de deterioração da semente, morte de plântulas e infecção sistêmica em plantas adultas. As vagens atacadas (antes ou durante a formação de sementes) produzem grãos pequenos e em pouca quantidade. Sementes infectadas apresentam manchas deprimidas de coloração castanho-escura, sendo comum o aparecimento de sintomas nos cotilédones, caracterizado pela necrose dos mesmos, logo após a emergência da plântula, porém podem não apresentar sintomas. O tombamento pré e pós-emergência podem ocorrer com cancos característicos da doença gradualmente se expandindo e estendendo-se para o hipocótilo e radícula. Em clima favorável há intensa esporulação nas lesões castanho-escuras de formatos irregulares (GOULART, 2000).

Após o período de incubação observam-se os acérvulos (frequentemente com abundante exsudação), nos quais são visualizadas inúmeras setas escuras, medindo 60-300 x 3-8 micra, sendo estas as principais características utilizadas para a identificação do patógeno nas sementes. Os conídios do fungo são hialinos, unicelulares, curvos, medindo 17-31 x 3-4,5 micra, geralmente produzindo tubos germinativos curtos (GOULART, 2000). Na forma sexuada, o gênero *Glomerella*, da família *Glomerellaceae*, produz ascocarpos do tipo peritécio, parcial ou completamente imersos nos tecidos do hospedeiro, sem estroma, com

rostro geralmente curto e tipicamente forrado internamente com perífises. Os ascos são unitunicados, cilíndricos e levemente clavados e os ascósporos unicelulares hialinos, elipsóides, retos ou ligeiramente curvos (MASSOLA JR; KRUGNER, 2011).

A incidência do patógeno em lotes de sementes de soja produzidos no Brasil é baixa, o que pode ser confirmado através de levantamentos sanitários realizados no Rio Grande do Sul, onde ocorre o maior nível de incidência desse fungo nas sementes (GOULART, 2005).

Embora se saiba que o *C. truncatum* sobrevive em restos culturais, e que seus conídios são disseminados por respingos d'água provenientes da irrigação por aspersão e chuvas, a epidemiologia da doença ainda não é totalmente esclarecida. Períodos prolongados de chuva, umidade relativa alta e o adensamento da cultura favorecem muito o desenvolvimento da doença (PICANÇO *et al.*, 2009).

Em termos de controle, atualmente se recomenda o uso de sementes sadias, tratamento de sementes com fungicidas, rotação de culturas com espécies não hospedeiras, manejo de restos culturais, espaçamento adequado e adubação equilibrada (PICANÇO *et al.*, 2009; EMBRAPA, 2013). Apesar dos esforços na obtenção de cultivares resistentes e de cultivo orgânico, a maior parte dos produtores não abre mão da aplicação de fungicidas na parte aérea para o controle das doenças. Experimentalmente foi observada a eficiência de controle com alguns fungicidas do grupo dos benzimidazóis, isoladamente ou em mistura com triazóis (EMBRAPA, 2013). Existem vários produtos registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para controle da antracnose através de aplicações aéreas na soja. A maioria tem como componente ativo carbendazim/benzimidazol, estrobilurina ou tiofanato metílico.

2.2.2. Mancha-alvo da soja

A etiologia do fungo causador de mancha-alvo é *Corynespora cassiicola* (Berk e Curt) Wei 1950. Esse fungo pertence ao filo Ascomycota, subclasse Pleosporomycetidae, ordem Pleosporales, família Corynesporascaceae, gênero *Corynespora* e espécie *C. cassiicola*, também inicialmente classificado como *Cercospora melonis* Cooke, *C. vignicola* Kawamura, *Helminthosporium vignae* Olive, e *H. vignicola* (Kawamura) Olive, entre outros (MYCOBANK, 2013; CABI DATABASE, 2013; SNOW; BERGGREN, 1989).

Esse fungo, no entanto, ocorre mais comumente na sua forma anamórfica (*Cercospora*). Uma característica morfológica frequente da ordem Pleosporales é a formação de ascostroma uniloculado e operculado, e denominado pseudotécio. Os ascos tem forma

cilíndrica ou clavada, são bitunicados, tipicamente fissitunicados, com descarga dos ascósporos do tipo “*Jack-in-the-box*” (MASSOLA JR; KRUGNER, 2011).

O patógeno produz conidióforos eretos, ramificados, com até 20 septos, medindo 4 - 11 x 44 - 135µm. Os conídios emergidos apresentam-se isolados ou em cadeia de dois a seis, dilatados na base, são retos ou ligeiramente curvados para o ápice, subcilíndricos, ligeiramente cônicos para o ápice. Há uma variação na coloração, que vai de hialina a marrom (SNOW; BERGGREN, 1989; MELO, 2009). O micélio é branco e floculento quando em meio de cultura (desenvolve-se vagarosamente em meio de cultura BDA), torna-se mais tarde cinza escuro e constituindo de um emaranhado preto oliváceo.

Existem no mínimo duas raças de *C. cassiicola*: o fungo que infecta o hipocótilo, raízes e haste de soja (causador da podridão radicular) é morfologicamente diferente daquele que infecta folhas, vagens e sementes (causador da mancha-alvo) (SNOW; BERGGREN, 1989).

O patógeno está presente em todas as regiões produtoras de soja do mundo, afetando folhas, pecíolos, hastes, vagens, sementes hipocótilo e raízes, com perdas de até 32% da produção, principalmente devido a redução do estande na podridão radicular, e pela queda prematura de folhas (PICANÇO *et al.*, 2009).

O aspecto da área afetada pode variar. Nas folhas, a mancha-alvo caracteriza-se por lesões redondas e irregulares, que, inicialmente, possuem coloração parda, evoluindo para marrom avermelhada, com tamanhos que variam de pequenos pontos até 10 - 15 mm de diâmetro quando maduras. Estas lesões frequentemente têm halo de verde-fosco a verde-amarelado, geralmente, zoneadas com pontuações escuras no centro e com anéis concêntricos, daí o nome vulgar de mancha-alvo. Em cultivares muito suscetíveis pode haver desenvolvimento das manchas ao longo das nervuras na face adaxial das folhas (HENNING *et al.*, 2010).

Nos pecíolos e hastes, as manchas da doença apresentam coloração marrom-escura e variam em tamanho, que pode ser de um pequeno ponto a alongado. Nas vagens, as manchas geralmente são circulares (com um mm de diâmetro), ligeiramente deprimidas, com centro arroxeado e bordas marrons. Em alguns casos, o patógeno pode penetrar o pericarpo e infectar as sementes. No hipocótilo, raiz principal e raízes laterais principais, há formação de lesões ovais, marrom-escuras ou avermelhadas, que podem estrangular a haste ou raiz. Com a esporulação do fungo, a cor das lesões progride para marrom-roxo escuro; e com o avanço da idade das plantas, as lesões alongam e a raiz inteira pode ficar descolorida. Forma-se uma

massa escura de conidióforos e conídios do fungo na superfície das partes afetadas (PICANÇO *et al.*, 2009).

O fungo sobrevive em sementes, em diversos hospedeiros alternativos, nos restos culturais, sobre raízes e hastes infectadas. A infecção inicial das folhas ocorre quando a umidade relativa do ar é maior que 80% ou quando há umidade livre nas folhas; as chuvas, irrigação e o vento favorecem a transmissão do patógeno no campo. Períodos mais secos apresentam caráter inibidor para o desenvolvimento do fungo nas folhas e raízes. No entanto, temperaturas de 15 a 20°C são ótimas para o ocorrência e progresso da doença. A infecção inicial da haste pode ocorrer no estágio de plântulas. Os sintomas abaixo do solo podem ser visíveis em três a quatro dias após a emergência da contaminação (HENNING *et al.*, 2010; PICANÇO *et al.*, 2009).

As medidas de controle recomendadas são uso de sementes sadias de cultivares resistentes/tolerantes (produzidas em regiões de inverno ameno e seco), rotação de culturas com espécies não hospedeiras (gramíneas), controle químico e manejo de restos culturais. O tratamento químico da forma convencional pode ser realizado de forma preventiva e com os fungicidas recomendados, tanto nas sementes como em pulverizações foliares (EMBRAPA, 2013; ALMEIDA *et al.*, 1997; HENNING *et al.*, 2010). Entre os produtos indicados, os mais utilizados possuem ação sistêmica dos grupos químicos estrobilurina (Piraclostrobina) e triazol (Epoconazol). Todavia, o uso dos métodos convencionais citados tem suas vantagens numa visão imediatista, mas pode causar problemas devido aos resíduos acumulados nos produtos e no ambiente (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2005).

2.3. Plantas medicinais no controle de doenças

A utilização das plantas medicinais é um dos recursos mais antigos empregados no tratamento de enfermidades humanas, e muito já se conhece a seu respeito por parte da sabedoria popular e de forma empírica (SCHWAN ESTRADA *et al.* 2000). Com os avanços científicos, esta prática vem perdendo espaço para os medicamentos sintéticos. Entretanto, o alto custo para muitos destes fármacos e constatação de efeitos colaterais contribuíram para o ressurgimento da fitoterapia (terapia através das plantas). Além disso, várias pesquisas vêm demonstrando a capacidade dessas plantas em outras áreas, como na proteção de plantas, área cosmética e industrial (SCHWAN ESTRADA *et al.* 2000).

Na maior parte dos casos, os compostos buscados pelos pesquisadores são os óleos essenciais. Esses são líquidos oleosos e aromáticos que se evaporam quando expostos ao ar, e que podem ser obtidos de várias partes vegetais, principalmente por hidrodestilação. Esses

compostos estão relacionados a diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, principalmente na comunicação química e na defesa da planta. As plantas que produzem esses metabólitos estão amplamente distribuídas no reino vegetal, especialmente nas famílias Asteraceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Rutaceae e Apiaceae (LAVABRE, 1997).

As substâncias que constituem os óleos essenciais fazem parte de dois grupos principais: derivados de terpenóides e/ou derivados de fenilpropanóides. Os óleos essenciais são constituídos, de forma geral, de uma mistura complexa de hidrocarbonetos, álcoois e compostos aromáticos, concentrados principalmente na casca, caule, flores, folhas, frutos, rizomas e sementes (MORAIS, 2009). Embora todos os órgãos de uma planta possam acumular óleos essenciais, sua composição pode variar conforme sua localização (SIMÕES; SPITZER, 1999). A composição química do óleo essencial também depende da genética da planta, do seu habitat e os tratos culturais nos quais crescem as plantas (LEAL *et al.*, 2001).

A extração de componentes químicos que são insolúveis em água pode ser feita pelo uso de solventes orgânicos, como o álcool. Neste caso, no processo de extração, obtém-se não somente o óleo essencial, mas também ceras, parafinas, gorduras e pigmentos, e o produto acaba tendo uma constituição pastosa (PERES *et al.*, 2009).

Trabalhos podem ser encontrados na literatura sobre a aplicação de óleos essenciais e extratos de plantas no controle de microrganismos, tanto causadores de doenças em animais, quanto para fitopatógenos (PEREIRA *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2008; ITAKO *et al.*, 2009; STANGARLIN *et al.*, 2011). A atividade do óleo essencial de citronela no controle da ferrugem e cercosporiose foi observada na ativação de respostas de defesa em cafeeiro (PEREIRA *et al.*, 2012). O óleo de citronela controlou a ferrugem (47,2%) e a cercosporiose (29,7%), enquanto tebuconazole apresentou controles de 96,5% e 90,5%, respectivamente. O tratamento controle com acibenzolar-S-metil reduziu em 55,9% a cercosporiose e não apresentou controle significativo da ferrugem. Para a atividade enzimática induzida pelos tratamentos, o óleo de citronela aumentou as atividades de peroxidase e quitinase em mudas de cafeeiro, enquanto o acibenzolar-S-metil aumentou as atividades de peroxidase, quitinase e β -1,3-glucanase. Os autores mencionados anteriormente também observaram aumento significativo no teor de lignina em plantas pulverizadas com óleo de citronela, porém não constataram aumento de fenóis totais.

Extrato de casca de café, óleo essencial de tomilho e acibenzolar-S-metil atuaram como indutores de resistência (PEREIRA *et al.*, 2008). Os autores constataram que o extrato de casca de café não afetou a germinação dos esporos de *Cercospora coffeicola*, mas inibiu o crescimento micelial proporcionalmente ao aumento das concentrações. Para os efeitos do uso

do óleo essencial de tomilho observaram que este inibiu a germinação e o crescimento micelial com o aumento das concentrações. O extrato de casca de café e o acibenzolar-S-metil não afetaram a germinação nem o desenvolvimento dos tubos germinativos, diferentemente do óleo essencial de tomilho. Mudanças tratadas com acibenzolar-S-metil, extrato de casca de café e óleo essencial de tomilho, apresentaram picos de atividade da peroxidase em diferentes períodos de tempo após a aplicação dos tratamentos.

Os potenciais antifúngicos de *Ottonia martiana* no controle da pinta-preta em erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e do mofo-cinzento em eucalipto (*Eucalyptus dunnii*) foram avaliados (CUNICO *et al.*, 2012). Extratos etanólicos de raízes, caules, folhas e frutos foram preparados e testados contra os patógenos *Cylindrocladium spathulatum* (pinta-preta) e *Botrytis cinerea* (mofo-cinzento). Bioensaios *in vitro* de germinação de esporos e bioautografia direta mostraram que houve redução do crescimento micelial dos patógenos testados e estímulo da germinação de esporos de *B. cinerea*. Na bioautografia direta foram detectadas zonas de inibição de crescimento micelial dos fungos e que foram relacionadas com a presença de piperovatina.

As atividades biológicas do óleo essencial de laranja, *Saccharomyces cerevisiae* e *S. boulardii* contra *Xanthomonas anoxopodis* pv. *phaseoli* foram estudadas em casa de vegetação e em campo, assim como a capacidade de indução de resistência em feijoeiro suscetível e moderadamente resistente (HOFFMANN *et al.*, 2012). As plantas tratadas com indutores bióticos, bem como as plantas pré-tratadas com ASM, apresentaram maior produtividade, maior massa de grãos e menor severidade de doença. Plantas tratadas com leveduras reduziram a severidade do crescimento bacteriano comum do feijoeiro e aumentaram sua produtividade. Em condições de campo sob estresse hídrico, a aplicação de ASM reduziu a produtividade sem diminuir a severidade da doença. O óleo essencial de laranja não reduziu a severidade nem interferiu nos parâmetros produtivos.

A prospecção fitoquímica de *Achillea millefolium*, bem como no estudo da atividade contra *Colletotrichum musae*, a extração usando solventes de diferentes polaridades revelou a presença de flavonóides, taninos e cumarinas (PERES *et al.*, 2009). A atividade antifúngica foi evidenciada com inibição de cerca 55% no crescimento micelial quando foi utilizado o extrato etanólico.

Alterações no crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*, causador do mofo branco da soja, foram estudadas quando os óleos e extratos vegetais eram incorporados ao meio de cultura BDA e vertido em placa de Petri (GARCIA *et al.*, 2012). Foram utilizados azadiractina, obtida de nim indiano (*Azadirachta indica* A. Juss) em associação com óleo de

karanja (*Pongamia glabra*), além de extratos vegetais de aroeirinha (*Schinus molle* L.), mentrasto (*Ageratum conyzoides* L.), alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.), losna (*Artemisia absinthium* L.), jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels), arruda (*Ruta graveolens* L.), mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), santa Bárbara (*Melia azedarach* L.) e pimenta longa (*Piper aduncum* L.) na concentração de 30%. Verificou-se que a maior inibição do crescimento micelial foi diretamente proporcional ao aumento das concentrações dos óleos de nim indiano e de karanja. A concentração de azadiractina, correspondente a 100 µg de i.a ml⁻¹ com 1/3 de óleo de karanja foi a mais eficiente na redução do crescimento micelial, com 63% de inibição. Em relação aos extratos vegetais, o fruto de pimenta longa foi o mais promissor sobre a redução do crescimento micelial, com 43% de inibição.

Os extratos acéticos e etanólicos de alecrim, cavalinha, gengibre, alho, camomila, louro, manjeriço, menta e eucalipto atuaram sobre o desenvolvimento de *Fusarium* sp. e *Botrytis* sp. isolados de flores de *Gerbera* sp. e *Rosa* sp. (CAMATTI-SARTORI *et al.*, 2011). Observou-se que o extrato etanólico de camomila inibiu em 52% o crescimento micelial de *Fusarium* sp. O fungo *Botrytis* sp. foi inibido com os extratos acéticos de alecrim, eucalipto e menta.

Os efeitos de extratos de biomassa cítrica, casca de café e folhas de café afetadas por ferrugem (causada por *Hemileia vastatrix*) contra *Phoma costarricensis* foram observados (BARGUIL *et al.*, 2005). Em ensaio *in vitro*, extratos aquosos de folhas com ferrugem e de casca de café mais extratos comerciais baseados em biomassa cítrica, Ecolife e Agromil, foram testados em várias diluições sobre a inibição de crescimento micelial de *P. costarricensis*. Somente os extratos de biomassa cítrica tiveram efeitos inibitórios sobre o fungo. *In vivo*, mudas de café mantidas em casa de vegetação aspergidas com esses extratos, Ecolife (5 ml.L⁻¹), Agromil (5 g.L⁻¹) e o extrato aquoso de folhas com ferrugem na diluição de 1:6 reduziram a mancha de phoma. Ambos, Ecolife e o extrato de folhas com ferrugem, foram significativamente mais efetivos em reduzir a área abaixo da curva de progresso da doença quando aplicados em doses mais baixas, indicando um possível efeito de indução de resistência.

Embora seja verificada a eficácia dos produtos naturais, os estudos de indução de resistência de plantas ainda estão em desenvolvimento, e também enfrentam a competição com os métodos convencionais de controle de doenças. No entanto, esses estudos podem nos oferecer um grande potencial para integrar ambas formas de proteção em futuras práticas agronômicas. O fracionamento cromatográfico e a caracterização de frações elicitoras, bem como o estudo da melhor dosagem e do intervalo de aplicação mais eficiente, podem otimizar

a aplicação dos produtos naturais no manejo integrado de diversas doenças que atacam plantas de alto interesse econômico (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

Diferentes solventes também implicam em diferentes moléculas ou classes de compostos extraídos (PERES *et al.*, 2009). Essa diferenciação no perfil espectral de extração mostra as diferentes interações físicoquímicas de cada solvente com as classes de compostos identificadas na prospecção fitoquímica e que podem variar significativamente conforme o solvente utilizado. Esses perfis colaboram para a otimização da extração de acordo com a presença de grupos funcionais específicos. Peres *et al.* (2009) também ressaltam que não se observa um melhor solvente quando se trabalha com extrato bruto. O que se obtém, por meio da análise espectral, é que, de acordo com a necessidade, pode-se usar uma combinação de solventes, pH e temperatura, atrelados à necessidade ou objetivo do estudo. Esta peculiaridade colabora também na seleção de possíveis comprimentos de onda para posteriores estudos envolvendo separações cromatográficas. Ou seja, conhecendo-se o perfil espectral de um extrato torna-se possível otimizar as melhores condições de extração de compostos de interesse.

2.4. O capim-limão

O *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf, conhecido popularmente como capim-limão, capim-cidreira, capim-catinga, capim-de-cheiro, capim-cidrão, capim-cidilho, capim-cidro, capim-santo e erva-cidreira, é uma espécie de gramínea perene, de porte alto, originária da Ásia (GOMES; NEGRELLE, 2003). A planta pertence à família Poaceae (Gramineae), uma das maiores famílias de plantas e que engloba cerca de 500 gêneros e aproximadamente 8.000 espécies essencialmente herbáceas, denominadas genericamente de gramíneas (GOMES; NEGRELLE, 2003).

O gênero *Cymbopogon* inclui cerca de 30 espécies de gramíneas perenes aromáticas, sendo a maioria nativa da região tropical do sudoeste asiático (GOMES; NEGRELLE, 2003). O nome deste gênero, *Cymbopogon*, deriva de *kymbe* (barco) e *pogon* (barba); em referência ao arranjo da sua inflorescência (espiga).

No Brasil, adaptou-se bem em todas as regiões, porém tem melhor desenvolvimento em solos bem drenados, férteis e climas quentes e úmidos, com chuvas bem distribuídas (CORREA JR, 1996). Esta planta consta da relação de plantas medicinais aromáticas indicadas para a região sul do Brasil, em função das condições edafo-climáticas (EMATER, 1996). A sua propagação é assexuada, por divisão de touceiras. É amplamente utilizada pela população para fins medicinais e tem seu uso e aplicação nas indústrias farmacêutica,

alimentícia, de cosméticos e de perfumaria, o que vem atraindo a atenção por diversos setores de pesquisa para o gênero.

O componente mais importante do óleo essencial do *C. citratus* é o citral (47% a 85%), sendo este uma mistura de isômeros, geranial (α -citral) e neral (β -citral), aldeídos monoterpenóides acíclicos (GOMES; NEGRELLE, 2003).

O óleo essencial do capim-limão é amplamente utilizado como agente aromatizante na indústria de perfumaria e cosmética, na preparação de sabonetes, colônias e desodorantes, bem como na indústria química para obtenção do citral, que é utilizado como matéria prima para a síntese de ianonas e vitamina A (GUENTHER, 1992). As ações farmacológicas reconhecidas do óleo essencial são: antihipertensivo, antiespasmódico, antiasmático, antiséptico, antiparasitário, antitérmico, antireumático, miorrelaxante, efeito hipotensor e antiinflamatório da infusão das folhas, repelente para insetos, ação fungicida do óleo essencial obtido das suas folhas, bem como ação antibacteriana (LAVABRE, 1997).

Para a obtenção de óleo essencial, são utilizadas tanto folhas frescas quanto secas, e o rendimento é de 0,28 a 0,50% da massa vegetal usada (NASCIMENTO *et al.*, 2006). A colheita do *C. citratus* é recomendada para ocorrer no horário de 08:00 às 13:00 horas, quando é observada uma maior concentração de citral, pois as altas temperaturas influenciam na qualidade do óleo. O solvente utilizado influi na qualidade final da extração (ASAOLU *et al.*, 2009). O extrato etanólico de capim-limão possui componentes presentes que foram extraídos de forma eficaz por etanol das folhas, enquanto não puderam ser obtido pelo uso de água destilada (ASAOLU *et al.*, 2009).

O conhecimento dos fatores que influenciam a variação dos compostos químicos nas plantas medicinais auxilia na obtenção de matéria-prima de qualidade e, conseqüentemente, na qualidade do produto final (CASTRO *et al.*, 2004). Condições diversas também podem causar variação nas respostas fisiológicas das plantas, com alteração do padrão da expressão gênica e mudanças metabólicas (BRAY *et al.*, 2000). Essas mudanças no metabolismo celular podem variar conforme o estado nutricional e estágio fenológico da planta.

Na agricultura, também há uma constante busca pela redução e pela racionalização da utilização de produtos que podem trazer malefícios ao meio durante o controle de fitopatógenos. Extratos aquosos de capim-limão foram eficientes na redução da severidade de septoriose em tomateiro, diferindo estatisticamente das testemunhas e do controle convencional, apresentando, inclusive, maior ganho econômico (SANTOS NETO, 2012). Produtos de *C. citratus* foram eficientes no controle de *Cladosporium fulvum* em folhas de tomate, com redução do número de lesões em 62,8% (ITAKO *et al.*, 2009). O óleo essencial

do *C. citratus* reduziu em 64% o crescimento micelial do fungo *Fusarium moniliforme* na concentração de 200 ppm; em 48% o crescimento micelial de *Aspergillus flavus*; e, em 77% *A. fumigatus* na concentração de 500 ppm (NGUEFACK *et al.*, 2004). O controle total ocorreu a 300 ppm para *F. moniliforme* e 1200 ppm para *A. flavus* e *A. fumigatus*.

Extratos etanólicos e aquosos possuem capacidade alelopática na inibição de germinação e crescimento inicial de picão-preto (LOUSADA *et al.*, 2012). Todos os extratos secos reduziram a porcentagem de germinação, e também afetaram a germinação de alface. Nenhum extrato teve influência no crescimento inicial. Atestaram que a eficiência dos tratamentos deve-se à presença do álcool, sinergismos, ou à alteração molecular e/ou inativação de compostos químicos durante a preparação dos extratos secos. Oliveira *et al.* (2002) atribuíram a maior capacidade extrativa do etanol, em quantidade ou em especificidade de substâncias bioativas, ao maior poder inibitório do extrato etanólico de *Hymenaea stigonocarpa* sobre a porcentagem de germinação de alface.

Trabalhos de alelopatia com capim-limão demonstraram que o extrato aquoso reduziu a germinação, o comprimento da radícula e a velocidade da germinação das sementes de guanxuma (*Sida rhombifolia* L.) (PICCOLO *et al.*, 2007). Diferentes concentrações do óleo essencial inibiram a germinação de alface *in vitro* indicando a presença de diferentes fitocomplexos ou compostos ativos polares e apolares na espécie (ALVES *et al.*, 2004).

O controle de doenças causadas por nematóides utilizando produtos naturais também é almejado. Os efeitos de dez óleos essenciais de plantas medicinais (*Lavandula angustifolia*, *Cymbopogon citratus*, *Eucalyptus globulus*, *Mentha piperita*, *Rosmarinus officinalis*, *Matricaria chamomilla*, *Ocimum basilicum*, *Achyrocline satureioides*, *Origanum vulgare* e *Foeniculum vulgare*) foram avaliados no controle de *Meloidogyne graminicola* (STEFFEN *et al.*, 2008). Os óleos que apresentaram maiores percentagens de mortalidade (*L. angustifolia* e *C. citratus*) foram posteriormente pulverizados em plantas de arroz irrigado 'BR IRGA-410' ou aplicados ao solo (500 ppm), em experimento conduzido em casa-de-vegetação. Verificou-se que as plantas pulverizadas com os óleos de *L. angustifolia* e *C. citratus* e inoculadas com o nematóide apresentaram menor número de galhas e tiveram redução média de 68 % na reprodução de *M. graminicola*, independentemente do modo de aplicação do óleo. No entanto, observou-se menor atividade enzimática de peroxidase nas plantas inoculadas e pulverizadas com os óleos.

Extratos de plantas medicinais, assim como seus óleos essenciais, têm sido considerados promissores e recomendados como alternativa também para o controle químico em pós-colheita (ROZWALKA *et al.*, 2008; SCHNEIDER *et al.*, 2012; LORENZETTI *et al.*,

2011). Foi observado efeito fungitóxico de extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas, no crescimento micelial de patógenos *in vitro* (ROZWALKA *et al.*, 2008). O óleo essencial de capim-limão inibiu totalmente o crescimento de *C. gloeosporioides*.

Poucos trabalhos com base em *C. citratus* extratos aquosos ou etanólicos são encontrados na literatura. Em um dos trabalhos, a avaliação do efeito do vapor do óleo essencial de *C. citratus* e de seus constituintes majoritários, citral e mirceno, sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Bipolaris* sp. e *Alternaria alternata*, fez com que Guimarães *et al.* (2011) concluíssem que o citral apresentou as menores concentrações para a inibição de 50% do crescimento micelial para todos os fitopatógenos, e que o constituinte mirceno não apresentou atividade sobre a inibição do crescimento.

Segundo Celoto *et al.* (2008), a autoclavagem pode potencializar essas propriedades nos extratos aquosos de bucha, espirradeira, eucalipto, mentrasto e unha-de-vaca e nos extratos hidroetanólicos de capim-limão, mamona e unha-de-vaca, sendo a porcentagem de inibição do crescimento micelial de *C. gloeosporioides* maior para os extratos autoclavados.

O óleo essencial do *C. citratus* reduziu em 64% o desenvolvimento de *Fusarium moniliforme* na concentração de 200 ppm, 48% para *A. flavus*, e 77% em *Aspergillus fumigatus* na concentração de 500 ppm. Inibição total aconteceu na concentração de 300 ppm para *F. moniliforme* e 1200 ppm para *A. flavus* e *A. fumigatus* (NGUEFACK *et al.*, 2004).

O crescimento micelial de *Mycosphaerella fragariae* foi afetado sob diversas concentrações do óleo essencial de capim-limão diluídas em meio batata-dextrose-ágar (BDA) (SCHNEIDER *et al.*, 2012). Verificou-se que todas as concentrações do óleo de *C. citratus* inibiram em 100% o crescimento micelial do fungo, não diferindo do fungicida (oxicloreto de cobre a 0,25%).

Óleos essenciais de capim-limão, palmarosa, citronela, cravo, canela, menta, lavanda, tangerina, eucalipto, melaleuca, alecrim e laranja, todos estes analisados em cromatógrafo a gás acoplado a detector de massas, para identificação dos principais componentes dos óleos (LORENZETTI *et al.*, 2011). Foram avaliados o crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Botrytis cinerea*, causador do mofo cinzento em morangueiro, com a incorporação do óleo no meio de cultura. Realizaram ainda uma avaliação de voláteis e a eficiência de óleos em isolado resistente a fungicida. Para cada teste, diferentes óleos apresentaram eficiência, contudo capim-limão, palmarosa, canela e menta demonstraram os melhores efeitos em todos os testes realizados. Todos os tratamentos à base

de óleos demonstraram efeito semelhante a um fungicida recomendado para a cultura à base de tiofanato metílico. Dois tratamentos mostraram-se efetivos no caso de isolado resistente: óleo de capim-limão e de canela.

2.5. Mecanismos de resistência em plantas

Fisiologicamente, a resistência do hospedeiro a um microrganismo patogênico consiste em atrasar ou evitar a entrada e/ou a atividade do invasor em seus tecidos (PASCHOLATI; LEITE, 1995). O sistema de defesa vegetal depende de vários componentes, que vão de mecanismos estruturais a bioquímicos, podendo ser pré e pós-formados em relação à penetração do patógeno (LEITE; STANGARLIN, 2008). Para serem eficientes, devem atuar de maneira coordenada, no momento e local apropriados, e com a magnitude adequada. As respostas iniciam-se com o reconhecimento pelo hospedeiro de sinais exógenos provenientes do patógeno (ou da atividade deste sobre a própria planta), passando pela ativação de várias moléculas intermediárias, e que levam a mudanças na atividade gênica e fisiológica (BONALDO *et al.*, 2005).

Os mecanismos estruturais constituem-se em barreiras físicas à penetração e colonização do patógeno e os mecanismos bioquímicos são aqueles nos quais as moléculas inibem o desenvolvimento do patógeno, ou geram condições adversas para a sobrevivência deste no hospedeiro. As moléculas formadas devem estar presentes em concentração adequada nas partes invadidas e de forma acessível ao patógeno, de tal maneira que mudanças nas concentrações das substâncias impliquem em mudanças na expressão da doença (LEITE; STANGARLIN, 2008).

Nos mecanismos bioquímicos pré-formados as substâncias estão presentes em altas concentrações nos tecidos sadios antes do contato com o patógeno, ou também podem se converter em produtos tóxicos em decorrência da infecção. Nos mecanismos pós-formados, as substâncias encontram-se ausentes, ou presentes em baixos níveis antes da infecção, sendo ativadas em resposta à presença do patógeno ou produzidas a partir de um precursor (STANGARLIN; LEITE, 2008).

2.5.1. Indução de resistência

Na interação dos microrganismos patogênicos e plantas ocorre compatibilidade (suscetibilidade) ou incompatibilidade (resistência), com participação de um grande número de genes relacionados à patogenicidade (HEIL; BOSTOCK, 2002). Na incompatibilidade ocorre uma série de respostas envolvendo liberação de sinais moleculares e o processo inicia-

se pelo reconhecimento de determinados fatores, transdução do sinal e tradução para a ativação de genes de defesa (BOSTOCK, 2005).

A percepção se dá com receptor geralmente de natureza proteica encontrado na membrana plasmática e/ou no interior da célula, cuja proteção do tecido vegetal pode ser ativada pelo tratamento com agentes bióticos ou abióticos, de natureza inorgânica, orgânica ou sintética, chamadas de moléculas elicitoras, as quais podem induzir resistência local adquirida (RLA), resistência sistêmica induzida (RSI) ou a resistência sistêmica adquirida (RSA) (TERRY; JOYCE, 2004). Embora haja essa divisão, atualmente é mais aceito o conceito de “*crosstalk*”, ou seja, em algum momento as vias relacionadas à resistência se cruzam, permanecendo a divisão habitual para melhor compreensão das diversas rotas (METRAUX *et al.*, 2002).

De forma geral, admite-se como resistência sistêmica adquirida a resposta da planta ao acumular Proteínas Relacionadas à Patogênese (PRPs), salicilato-dependente, que pode resultar em necroses, e geralmente é induzida por patógenos ou ativadores químicos. No caso de RSI não há o acúmulo de PRPs, nem alterações aparentes, e o agente indutor geralmente é um microrganismo não patogênico, com a rota de sinalização mais associada a jasmonato e etileno, e não salicilato-dependente (BONALDO *et al.*, 2004).

A RSA confere à planta proteção a um amplo espectro de microrganismos, e o tempo necessário para estabilização da RSA depende da planta e do tipo de indutor (DURRANT; DONG, 2004). O grau de proteção pode variar frente a diversos fatores: da concentração do indutor, do inóculo utilizado, do intervalo de tempo entre o tratamento inicial com o indutor e o contato com o patógeno, das condições de temperatura e luminosidade, do agente utilizado para a inoculação, e do tamanho da necrose ocorrida em função da inoculação do patógeno (GUZZO, 2004; STICHER *et al.*, 1997).

Um sinalizador deve ser sintetizado pela planta após o ataque de patógeno ou após o tratamento com o indutor, ser móvel pelo floema da planta, induzir a síntese de substâncias de defesa, como as proteínas-RP, peroxidases ou fitoalexinas, e aumentar a resistência a patógenos (BOSTOCK, 1999; MORAES, 1998). No entanto, não há conclusões definitivas sobre as moléculas envolvidas na sinalização na planta. Algumas são consideradas importantes na sinalização, mas nenhum deles pode ser apontado com certeza.

Trabalhos comprovam que a RSA é dependente da ativação e aumento do ácido salicílico (AS), produzido localmente ou sistemicamente na planta (BOSTOCK, 2005; MAUCH-MANI; METRAUX, 1998; METRAUX *et al.*, 2002). O AS atua como molécula

sinal desencadeando respostas locais e sistêmicas de defesa, com papel ativo na inibição da catalase, e na modificação do balanço redox celular (SOBRINHO *et al.*, 2005).

O ácido salicílico é formado a partir do ácido benzóico na via dos fenilpropanóides, na qual a síntese, por meio desta via, há importante participação da FAL. Quando aplicado de forma exógena, é capaz de induzir aumento da síntese do próprio AS, assim como de proteínas-RP e de proteger as plantas contra ataque de patógenos. No pepino, há uma correlação entre o aumento da quantidade de AS e o aumento da atividade da FAL no pecíolo (MAUCH-MANI; METRAUX, 1998). Também pode induzir a produção de um composto volátil, o metil-salicilato (MeSA). O MeSA, por sua vez, pode induzir plantas a sintetizar o AS. Plantas de fumo infectadas por TMV são capazes de produzir o MeSA, que age como um indutor de proteínas- RP e a ativação de genes de resistência (MAUCH-MANI; METRAUX, 1998). O acibenzolar-S-metil (ASM: ácido benzo (1,2,3) tiadiazol-7-carbotióico) é análogo ao ácido salicílico (AS) e age na cascata de sinais, um dos eventos que leva à RSA. Ativa a expressão dos mesmos genes que os acionados pela indução biológica da RSA (HAMMERSCHMIDT *et al.*, 2001; MÉTRAUX, 2001). O Bion (ASM), usado no presente trabalho como testemunha, passou a ser comercializado em 1996 com registro em diversos países, inclusive no Brasil. Na Europa, é comercializado com o nome de Bion e, nos Estados Unidos, como Actigard. Constituiu o primeiro ativador vegetal (*plant activator*) sintético disponível no mercado. Há formulações nas quais o ASM é o único produto ativo ou é combinado a um fungicida conjugado. No caso de formulações em que o ASM é o único princípio ativo, o produto é recomendado em parceria com fungicidas (MOLINA *et al.*, 1998).

As respostas conhecidas da resistência sistêmica adquirida são: reação de hipersensibilidade (RH); alterações estruturais como lignificação, deposição de calose e formações de papilas; acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese; aumento e alterações nas concentrações de fenilpropanóides, produtos do metabolismo como fitoalexinas e compostos fenólicos; e ativação de enzimas chaves como as peroxidases e a fenilalanina amônia-liase (FAL) (CAVALCANTI *et al.*, 2005).

A hipersensibilidade é caracterizada pela morte programada das células em torno da infecção, uma pequena fração do tecido morto do local do ataque de patógenos biotróficos, que isola o agente causador e restringindo o acesso à água e a nutrientes. Está ligada à sinalização por AS, e pode levar à produção de PRPs, peroxidases e fenilalanina amônia-liase (GLAZEBROOK, 2005; GRÜNER *et al.*, 2003; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Dentre os processos já mencionados da defesa das plantas, a lignificação ocorre pela polimerização de precursores produzidos na rota dos fenilpropanóides, tendo a enzima FAL

importante papel no processo, embora não seja a única responsável. A forma de atuação ocorre na parede celular, após a migração e liberação dos fenóis das porções glicosídicas. Os fenóis sofrem oxidação, ligam-se à parede celular ou são polimerizados, sendo que a ação do H₂O₂, catalisada por uma peroxidase sobre os alcoóis 4-coumaril, coniferil e sinapil, leva à geração de monolignóis que são polimerizados formando lignina (SCHWAN-ESTRADA *et al.*, 2008).

Além de barreira mecânica ao avanço e crescimento do patógeno; a lignina modifica a parede celular, tornando-a mais resistente ao ataque de enzimas hidrolíticas, no aumento da resistência das paredes à difusão de toxinas produzidas por patógenos, e impedindo que nutrientes do tecido hospedeiro sejam utilizados pelo invasor (PASCHOLATI; LEITE, 1994). A lignina representa uma defesa também contra os herbívoros, por sua capacidade de ligação com a celulose e proteínas, refletindo na dificuldade de digestão (TAIZ; ZEIGER, 2009). Outras formas de defesa, como a formação de papilas e calose, também são formadas em resposta à RSA.

Embora haja inúmeras pesquisas visando o desenvolvimento de técnicas economicamente viáveis para indução de resistência, várias etapas das cadeias de respostas químicas ainda são desconhecidas. Dentre os trabalhos realizados, muitos se encontram relacionados à indução de resistência com moléculas presentes em produtos naturais, como extratos plantas medicinais e fungos. Para plantas medicinais, entre as mais promissoras estão o eucalipto, capim-limão, alecrim, manjerona, erva cidreira, cânfora, romã, babosa e orégano (SCHWAN-ESTRADA *et al.* 2000; FRANZENER *et al.*, 2003). Muitos dos extratos brutos ou óleos essenciais de plantas medicinais não foram separados e caracterizados quanto à sua fração biológica ativa, nem quanto à determinação do alvo de atuação das moléculas presentes nesses: se sobre, somente na planta, ou se há também interação direta com patógenos.

Produtos comerciais com base em extratos vegetais já estão disponíveis. Entre esses encontram-se o Neemazal – que tem como base extratos foliares de Nim (*Azadirachta indica*) na concentração de 5% no produto comercial -, Milsana (formulações aquosas de *Reynoutria sachalinensis*) e Ecolife 40, constituído de diversos compostos orgânicos obtidos da extração e fermentação de substrato de plantas cítricas (SOBRINHO *et al.*, 2005).

O uso indiscriminado de indutores também pode levar a resultados nem sempre benéficos, pois a ativação da resistência demanda gasto de energia para mudanças no metabolismo de defesa vegetal (SILVA *et al.*, 2003). A ativação de resistência, quando não é necessária, como na ausência de um patógeno, tem um custo metabólico e efeito negativo para o desenvolvimento e produção (HEIL; BOSTOCK, 2002; DIETRICH *et al.*, 2005).

O redirecionamento de toda a maquinária enzimática responsável pelos mecanismos de defesa visa balancear o metabolismo total e equilibrar os custos dentro da planta, maximizando os recursos celulares (SOMSSICH; HAHLBROCK, 1998; LARCHER, 2004). O aumento da atividade enzimática verificado posteriormente – na fase de restituição ou adaptação - deve-se ao predomínio de processos anabólicos e formação de isoformas mais ativas das enzimas formadas naquela determinada condição. O fato estaria ligado não somente a um fator qualitativo, mas também a quantidade de enzimas que são produzidas em resposta ao eliciador. No entanto, se a condição de gastos para sobrevivência perdurar, os processos que demandam energia e metabólitos essenciais para a simples manutenção vegetativa levaria a uma fase de estresse crônico irreversível e morte da planta (LARCHER, 2004).

2.5.2. Fitoalexinas

As fitoalexinas são definidas como compostos antimicrobianos de baixa massa molecular, que são sintetizados pelas plantas e se acumulam nas células vegetais em resposta à infecção microbiana (BRAGA, 2008). Constituem um grupo de metabólitos quimicamente diversos, com mais de trezentos tipos já caracterizados entre diferentes classes de compostos químicos, como cumarinas, diterpenos e flavonóides, e presentes em mais de vinte famílias de vegetais superiores (TAIZ; ZEIGER, 2009; CAVALCANTI *et al.*, 2005).

Fitoalexinas são consideradas compostos biocidas prejudiciais a bactérias, fungos, nematóides, plantas e animais. De forma geral, o modo de ação das fitoalexinas sobre os fungos inclui granulação citoplasmática, desorganização dos conteúdos celulares, ruptura da membrana plasmática e inibição de enzimas (CAVALCANTI *et al.*, 2005).

A fitoalexina gliceolina da soja, um pterocarpênóide, mostra-se importante na interação dessa leguminosa com fitopatógenos, em resposta à infecção, e também pelo tratamento com agentes bióticos e abióticos. A síntese de fitoalexinas pode ser induzida por compostos denominados elicitores, os quais podem ser de origem microbiana (elicitor exógeno) ou da própria planta (elicitor endógeno) (BRAGA, 2008).

A biossíntese de fitoalexinas somente ocorre após os metabólitos precursores primários serem submetidos a uma nova rota de processamento secundária. Por exemplo, o substrato fenilalanina é dividido para a síntese de diversas fitoalexinas flavonóides pela síntese *de novo* da fenilalanina amônia liase (FAL), uma enzima de papel fundamental na rota dos fenilpropanóides. No entanto, a síntese da maioria das fitoalexinas requer a atividade de diversas enzimas biossintéticas e necessita de diversos sinais transducionais altamente regulados (HAMMOND- KOSACK; JONES, 2000).

Um dos caminhos para essa alta especialização e coordenação é através do uso de um elemento sequência “*cis-acting*” de DNA comum com um promotor de cada gene que codifica uma enzima requerida para a síntese da fitoalexina. Por exemplo, a FAL multigene ou a originada de uma única sequência são reguladas nos níveis de mRNA e no nível proteico para atuarem estritamente, nesse caso, na rota de biossíntese das fitoalexinas de flavonóides (HAMMOND- KOSACK; JONES, 2000).

Trabalhando com extratos de *Ocimum gratissimum* em soja, Colpas *et al.* (2009) verificaram que os tratamentos induziram a produção de fitoalexinas quando comparados à testemunha. Foi observado que a indução de fitoalexinas em soja foi quase seis vezes maior que a testemunha quando a concentração de 25% dos extratos de *O. gratissimum* era usada. Pouca produção foi observada em concentrações mais baixas.

Motoyama *et al.* (2003), com o objetivo de estudar o potencial de extratos cítricos (produto comercial Ecolife40) na indução de fitoalexinas em soja e sorgo, verificaram que houve produção de gliceolina em todas as concentrações testadas. Em 10 ppm, houve um acúmulo menor em relação a 1 ppm, mas, nas demais concentrações o acúmulo foi maior, acompanhando o aumento das concentrações do extrato cítrico. O acúmulo de gliceolina foi maior na concentração de 5.000 ppm de extrato cítrico, enquanto que para o sorgo, houve um pico de produção de fitoalexinas na concentração de 100 ppm.

Mazaro *et al.* (2008) verificaram que os preparados de pitangueira induziram gliceolina em cotilédones de soja, respondendo ao aumento das concentrações dos preparados. Stangarlin *et al* (2010), utilizando cotilédones de soja para análise dos efeitos da levedura *Saccharomyces boulardii* na forma do produto comercial Floratil (Merck), massa de células e de filtrado do meio do crescimento das leveduras, verificaram que os tratamentos apresentaram efeito dose-dependente na indução de fitoalexinas. Em sorgo apenas o filtrado e Floratil tiveram efeito dose-dependente.

2.5.3 Proteínas relacionadas à patogênese

Proteínas relacionadas à patogênese – PRPs (ou proteínas relacionadas à defesa vegetal) são macromoléculas envolvidas na resistência induzida de várias plantas, também expressas em condições de estresse biótico e abiótico, e que foram primeiramente descritas em plantas de fumo (ROMEIRO, 2008). Encontram-se na literatura referências às PRPs com o nome de SAR-proteínas, produtos dos SAR-genes, por estarem relacionadas com o fenômeno SAR/ISR (RSA/RSI). Estão distribuídas em onze famílias, nas quais se encontram

as β -1,3-glucanases (PR-1, PR-2) e as quitinases (PR-3) (CAVALCANTI *et al.*, 2005; ROMEIRO, 2008).

O método de ação dessas enzimas pode variar conforme o patossistema e o indutor. Podem acumular-se tanto nos espaços intercelulares (atuando diretamente sobre o patógeno), como nos vacúolos, agindo após a descompartimentalização ocasionada pela ação patogênica. Essas enzimas podem atuar como promotoras da liberação de indutores de fitoalexinas e de compostos fenólicos (ROMEIRO, 2008).

2.5.3.1. β -1,3-glucanases (EC 3.2.1.39)

As β -1,3-glucanases são enzimas presentes em bactérias, fungos e plantas, classificadas em exo e endo- β -1,3-glucanases, e que possuem a função de hidrolisar β -1,3-glucanas, principal componente da parede celular dos fungos. Assim, são muito importantes na proteção de plantas durante a invasão fúngica (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999).

Junto com as quitinases atuam, sinergisticamente, para inibir o crescimento do patógeno. β -1,3-glucanases ainda podem liberar fragmentos glicosídicos da parede celular do patógeno e da própria da planta, que, por sua vez, atuam como elicitores de defesas do hospedeiro (ROMEIRO, 2008).

Essas enzimas são monômeros com massa molecular entre 25 e 35 kDa e produzem oligômeros com duas a seis unidades de glicose a partir do substrato laminarina, uma β -1,3-glucana. Existem diferentes isoformas dessa enzima e grande variação entre elas quanto à atividade catalítica sobre o substrato laminarina. Ocorrem em formas básicas, normalmente intracelularmente (nos vacúolos), e formas ácidas, extracelularmente, que possuem ação direta contra patógenos (MARTINS, 2008).

2.5.3.2. Peroxidases (EC 1.11.1.7)

As peroxidases (POXs) de plantas são enzimas responsáveis pelo metabolismo de parede celular e por catalisar a oxidação entre peróxido de hidrogênio e vários redutores na síntese de lignina. Também estão presentes em certas células animais e em microrganismos. Em vegetais, para formação da lignina, ocorre a conversão e a oxidação dos hidroxicinamil álcoois e seus derivados em radicais fenoxi, seguidas da união destes em polímeros, que se associam de forma não-enzimática. De forma semelhante, o ácido hidroxicinâmico, contendo grupos funcionais alifáticos, é convertido em suberina (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999; TAIZ, ZEIGER, 2009). No entanto, atualmente, acredita-se que a união de monolignóis pode

não ocorrer por acaso, devido ao fato que a proporção de tipos de união *in vivo* seja diferente das uniões que ocorrem *in vitro* (CROTEAU *et al.*, 2000).

O processo de lignificação pode interferir com o crescimento de patógenos através de modificações químicas nas paredes celulares. Além disso, peroxidases têm sido relacionadas a uma variedade de processos envolvidos na defesa, incluindo respostas de hipersensibilidade, suberização e produção de fitoalexinas (KAO, 2003).

As peroxidases são classificadas como proteínas relacionadas à patogênese (PRPs) pertencentes à família PR-9 (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999). São específicas para o aceptor de hidrogênio, sendo ativos somente metil, etil e peróxidos, mas inespecíficas para os doadores de hidrogênio, que podem ser fenóis, aminofenóis, diaminas, indofenóis, ascorbatos e muitos aminoácidos. As peroxidases são glicoproteínas com massa molecular em torno de 40 kDa, capazes de gerar o H₂O₂ que lhes servirá de substrato (CAVALCANTI *et al.*, 2005).

O funcionamento básico das POXs consiste em reagir com compostos contendo grupos hidroxila anexado a um anel aromático. Uma reação bem conhecida e muito estudada é a oxidação desidrogenativa do guaiacol (*o*-metoxi-fenol), que resulta na formação de radicais fenoxi, com subsequente ligação de radicais instáveis e polimerização não enzimática dos monômeros (HIRAGA *et al.*, 2001).

Além da resposta por ferimentos, a expressão das POXs também está relacionada com a ocorrência de infecção por patógenos (HEISER; OßWALD, 2008). O papel destas no processo de defesa é reforçar a parede celular a partir da formação de lignina, suberina, polissacarídeos ferulicolados e glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, e o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs, por sua vez, com a explosão oxidativa, apresentam ação antimicrobiana, induzem a formação de fitoalexina, a resposta de hipersensibilidade, participam da peroxidação de lipídios, atuam na sinalização, e induzem o acúmulo de AS (HEISER; OßWALD, 2008).

2.5.3.3. Fenilalanina amônia-liase (EC 4.3.1.5)

A fenilalanina amônia-liase (FAL) é uma enzima que catalisa uma etapa reguladora importante na formação de muitos compostos fenólicos, com a desaminação da fenilalanina, formando o ácido *trans*-cinâmico e amônia (TAIZ; ZEIGER, 2009). O ácido *trans*-cinâmico pode ser incorporado em diferentes compostos fenólicos (ácido 4-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico, e ácido sinápico), os quais estão presentes na formação de ésteres, cumarinas, flavonóides e lignina (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2005).

Pelo fato de plantas aquáticas não apresentarem lignina e a enzima FAL (e a enzima TAL), acredita-se que esse tenha sido um fato importante na escala evolutiva das plantas para a conquista do ambiente terrestre (CROTEAU *et al.*, 2000). Em algumas plantas há evidências de que a enzima é codificada por um único gene, enquanto, em outras, há indícios de que ocorre participação de multigenes para sua formação. Assim, os monômeros podem ter múltiplas combinações entre si, e estariam em função do estímulo indutor. Também não há necessidade de um cofator para a atividade da enzima. O grupo amônio liberado da atividade enzimática também é reaproveitado pela GS-GOGAT (glutamina sintase - glutamina oxoglutarato aminotransferase) e pode entrar novamente no ciclo de formação de aminoácidos aromáticos, como a própria fenilalanina e a tirosina (CROTEAU *et al.*, 2000).

A FAL é uma das enzimas mais estudadas, principalmente pela importância na rota dos fenilpropanóides (TAIZ; ZEIGER, 2009). Não é encontrada somente em plantas superiores, mas também em fungos e bactérias. Na planta, está localizada principalmente dispersa no citoplasma, embora possa estar associada a organelas membranosas. A FAL difere das POX e polifenoloxidasas ao atuar somente sobre um substrato específico, a fenilalanina (KUHN, 2007).

O ácido *trans*-cinâmico é precursor de inúmeros compostos fenilpropanóides que realizam várias funções essenciais na planta (TAIZ; ZEIGER, 2009). Dentre estas, destacam-se o suporte mecânico da planta proporcionado pela lignina; a produção de substâncias que atuam contra estresses abióticos, como os antioxidantes e compostos que absorvem radiação UV; e proteção contra estresses bióticos, pela síntese de fitoanticipinas, síntese de fitoalexinas e de compostos fenólicos como fatores tóxicos ou antinutritivos. O ácido *trans*-cinâmico também é precursor de pigmentos, como antocianinas e de moléculas sinalizadoras, como os flavonóides, que são fatores de nodulação em leguminosas. A FAL, além de ser importante no desenvolvimento normal da planta, mantendo de forma constitutiva estas características, é também uma enzima chave indicadora de estresses (KUHN, 2007).

2.5.3.4. Polifenoloxidasas (EC 1.14.18.1)

Polifenoloxidasas (PFOs) são enzimas responsáveis pela catálise da reação de oxidação de polifenóis (*o*-difenois), transformando-os em quinonas (*o*-quinonas), constituindo uma atividade de difenolase. Em algumas plantas, essas enzimas podem catalisar a *o*-hidroxilação de monofenóis (monofenolase). Também são denominadas, na literatura, como fenol oxidases, catecolases, fenolases, catecol oxidases ou tirosinases (OKOT-KOTBER *et*

al., 2002). Este tipo de enzima é encontrado entre espécies de plantas, bactérias, fungos e algas.

A polifenoloxidase, geralmente, é abundante em tecidos infectados e tem grande importância para as plantas, com envolvimento nos mecanismos de defesa ou na senescência (AGRIOS, 1997). Essa enzima está diretamente envolvida no processo de escurecimento em alimentos (síntese de quinonas), principalmente em frutas e vegetais durante o processamento e armazenamento (CARNEIRO *et al.*, 2003).

As PFOs permanecem intracelularmente, a maioria em estado inativado, compartimentalizadas dentro dos tilacóides nos cloroplastos, separadas dos compostos fenólicos, que estão compartimentalizados nos vacúolos. No entanto, pequena parte pode estar extracelularmente na parede celular. Também podem participar do processo de lignificação durante a invasão pelo patógeno. Assim, as PFOs e peroxidases atuam na degradação oxidativa de compostos fenólicos próximos ao local da descompartimentalização celular provocada por patógenos (CAMPOS *et al.*, 2004).

No processo de defesa celular, a principal ação das quinonas é como fator antinutritivo na alimentação de insetos, nos quais taninos, na forma fenólica, são oxidados a quinonas e apresentam alta reatividade com as proteínas da dieta do inseto, o que impede que este possa digerir-las (TAIZ; ZEIGER, 2009).

2.5.3.5. Quitinases (EC 3.2.1.14)

As quitinases são enzimas líticas que hidrolisam a quitina (um polímero de *N*-acetilglucosamina, um dos principais constituintes da parede celular fúngica), mas também podem hidrolisar outros polímeros relacionados à parede celular dos patógenos, como polissacarídeos contendo ácido *N*-acetilmurâmico. Essas hidrolases ocorrem constitutivamente nas plantas. A atuação das quitinases está, principalmente, na quebra das ligações β -1,4 dos polímeros de *N*-acetilglucosamina por clivagem aleatória e interna do polímero, reduzindo seu tamanho a vários fragmentos menores. Também podem atuar sobre as ligações β -1,4 entre *N*-acetilglucosamina e ácido *N*-acetilmurâmico, presentes na constituição das paredes celulares de bactérias (KUHN, 2007).

A atividade dessas enzimas também pode ser elevada nos tecidos vegetais em resposta a infecção e a tratamentos hormonais e químicos, e o tipo de quitinase produzido durante a indução de resistência está intimamente relacionado ao estímulo (indutor) ao qual a planta é submetida. Assim como as β -1,3-glucanases, as quitinases exibem formas ácidas e básicas (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

As proteínas relacionadas à patogênese com atividade na hidrólise de quitina são classificadas nas famílias PR-3, PR-4, PR-8 e PR-11, todas endoquitinases. Várias quitinases têm mostrado propriedades antifúngicas, porém restrita a determinados fungos (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999).

2.6. Cromatografia de troca iônica e cromatografia de exclusão

Dentre os métodos de separação, quantificação e identificação de moléculas, a cromatografia ocupa um lugar central, juntamente com a espectrofotometria. A técnica de cromatografia consiste em separar componentes de uma mistura, envolvendo duas fases, sendo uma estacionária e a outra móvel (COLLINS, 2006). A fase estacionária é responsável pela retenção de moléculas, resultando em migrações diferenciadas das moléculas carregadas pela fase móvel. Existem diversas formas de cromatografia, envolvendo diferenças físicas e químicas das diferentes fases, porém o princípio é o mesmo, e as variações vão depender dos objetivos buscados e do caráter dos componentes da mistura em estudo (COLLINS, 2006).

A cromatografia de troca iônica consiste no uso de uma fase estacionária chamada de suporte, também conhecida como matriz, nas quais são adicionados grupos funcionais ionizáveis (SPADARO, 2006). Esses grupos servirão de trocadores aniônicos, que contém sítios carregados positivamente, retendo ânions, e os trocadores catiônicos, carregados negativamente e que retêm cátions.

A fase móvel geralmente é uma solução iônica compatível com o tipo de matriz utilizada, e com propriedades tamponantes. Dessa maneira, se a fase em uso for de carga negativa, a fase móvel deve conter cátions capazes de substituir as moléculas retidas por deslocamento (SPADARO, 2006).

A cromatografia por exclusão (CE), por sua vez, baseia-se na separação mecânica de compostos químicos (ROTHSCHILD, 2006). A fase estacionária consiste de uma matriz inerte, ao contrário da cromatografia de troca iônica. A matriz, no caso da CE, possui partículas de forma, tamanho e porosidade definidas e o uso da matriz adequada dependerá do material a ser estudado. As moléculas menores são separadas porque penetram em todos os poros da fase estacionária, equilibrando-se com a fase móvel presente nos interstícios, enquanto as maiores são excluídas de todos os poros. Assim, as maiores moléculas, passando entre os grânulos da matriz e acompanhando a fase móvel, migram com velocidade superior às das moléculas menores, que devem percorrer um caminho maior entre a rede da fase estacionária, até saírem da coluna de aplicação das amostras. Essa diferença de saída permite a separação em ordem relacionada ao seu tamanho efetivo (ROTHSCHILD, 2006).

As técnicas descritas possuem alta importância na detecção de moléculas com atividade biológica sobre determinados organismos. Para a agricultura, por exemplo, pode-se identificar os componentes de um composto complexo, caracterizá-los, e otimizar sua aplicação no combate de doenças. Trabalhos de identificação de elicitores demonstraram a capacidade de separação de elicitores pelo uso da cromatografia de troca iônica e cromatografia por exclusão (WULFF, 1997; DI PIERO, 2003; MOREIRA *et al.*, 2008). Dessa forma, a utilização da cromatografia tem se mostrado uma importante ferramenta nesse setor científico.

Trabalhando com cromatografia de troca iônica para possíveis elicitores extraídos de levedura, Wulff (1997) verificou que, além da presença de um elicitor de síntese de fitoalexinas em sorgo, havia também uma fração capaz de suprimir completamente a síntese de fitoalexinas.

Di Piero (2003) verificou moléculas elicitoras de fitoalexinas em sorgo obtidas a partir da autoclavagem de *Saccharomyces cerevisiae* (provavelmente glicoproteínas, termoestáveis, solúveis em etanol 50%, apresentando massa molecular de 18,4 a 25 kDa e afinidade por DEAE-Celulose). As frações fortemente ligadas ao trocador aniônico apresentaram maior atividade em relação às mais fracamente ligadas, enquanto que algumas frações sem afinidade por DEAE-Celulose atuaram como supressoras. A atividade biológica foi reduzida após o tratamento com proteinase, mostrando a importância da porção proteica nas moléculas elicitoras.

Com o objetivo de verificar o efeito de frações obtidas da citronela (*Cymbopogon nardus*), a partir dos extratos brutos metanólico (EME) e etanólico (EET) dessa planta, Moreira *et al.* (2008) submeteram os extratos à CFG, obtendo três frações a partir do extrato metanólico (FMI, FMII e FMIII) e duas frações para o extrato etanólico (FEI e FEII). O acúmulo de fitoalexinas em cotilédones de soja não foi significativo nas frações FMI, FMII, FMIII, FEI e FEII, mas observou-se efeito significativo das frações obtidas na CFG, sobre a produção de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo, nos quais os maiores acúmulos destas fitoalexinas foram promovidas pelas frações FMI e FMIII, diferindo significativamente do tratamento testemunha.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Controle Alternativo e de Indução de Resistência, da Universidade Estadual de Maringá, Paraná. Neste trabalho foram utilizados extratos etanólicos (EBE) de capim-limão em ensaios para indução de fitoalexinas em cotilédones e folhas de soja, para ativação de enzimas de defesa em plantas e efeito dos tratamentos no crescimento micelial de fitopatógenos. O EBE foi submetido a cromatografias de troca iônica e de filtração em gel para a separação de possíveis elicitores.

3.1. Obtenção do extrato bruto vegetal

As plantas de *Cymbopogon citratus* (capim-limão) foram obtidas na fazenda experimental de Iguatemi, pertencente à Universidade Estadual de Maringá, localizada no município de Iguatemi, Paraná; e propagadas vegetativamente por miniestaquia (4-6 cm de comprimento) em casa de vegetação no mês de janeiro de 2011. Após 30 dias, foram transferidas para a Fazenda experimental de Iguatemi. A fazenda experimental está a 545 metros de altitude, latitude 23° 25' sul e longitude 51° 25' oeste, clima classificado como subtropical úmido mesotérmico (Cfa) e solo como Latossolo Vermelho distrófico.

Foram realizadas duas coletas para obtenção dos extratos, com intervalo de seis meses entre elas (15 de julho de 2011 e 5 de dezembro de 2011), entre 8 e 10 horas da manhã. Cada coleta consistiu um fator para análise de diferença sazonal. A primeira coleta, portanto, refere-se ao material de inverno, e a segunda coleta corresponde ao material de verão.

O extrato bruto etanólico a 25% foi obtido conforme Bonaldo *et al.* (2004). Folhas frescas foram coletadas e trituradas em liquidificador com álcool comercial hidratado 96°, na proporção de 250 g de material vegetal em 1000 mL de álcool. A mistura foi triturada por 30 minutos em rotação máxima no liquidificador industrial Skymsem de alta rotação e corpo de inox com capacidade para dois litros. As folhas permaneceram em maceração por 24 horas em ambiente protegido de luz e temperatura ambiente (25°C). Após o processo de maceração, o produto foi filtrado em gaze, e o solvente foi removido, utilizando-se evaporador rotativo a 45°C sob pressão negativa, a 60 rpm e pelo período de 24 horas. O produto resultante da evaporação do extrato etanólico foi armazenado a 4°C em recipientes plásticos escuros, vedados e protegidos de luz, sob a forma de pasta bruta e na forma seca, obtida pela liofilização da pasta bruta. Para a liofilização, foi utilizado o liofilizador Christ Alpha 1-2 a baixa pressão. O procedimento foi adotado após cada coleta de capim-limão.

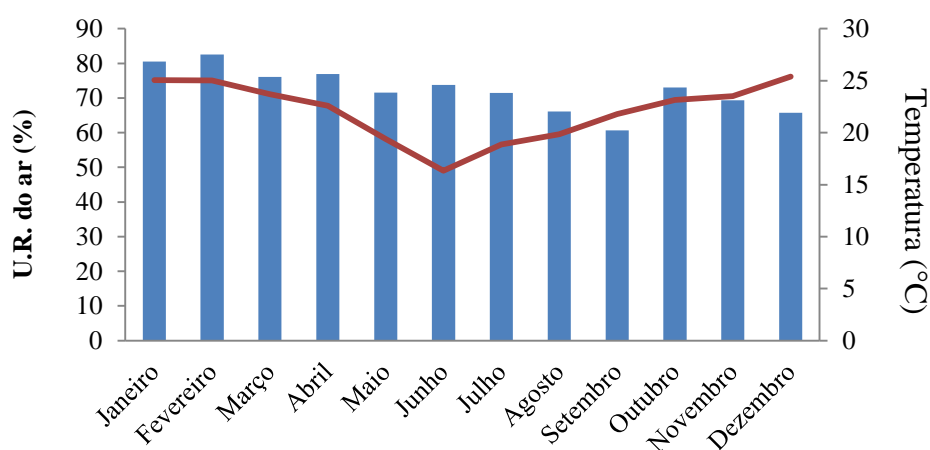


Figura 1: Médias obtidas de temperatura (°C) em linha vermelha, e umidade relativa do ar (%), em colunas azuis, referentes ao período de plantio e coleta do capim-limão. Maringá/PR, 2011.

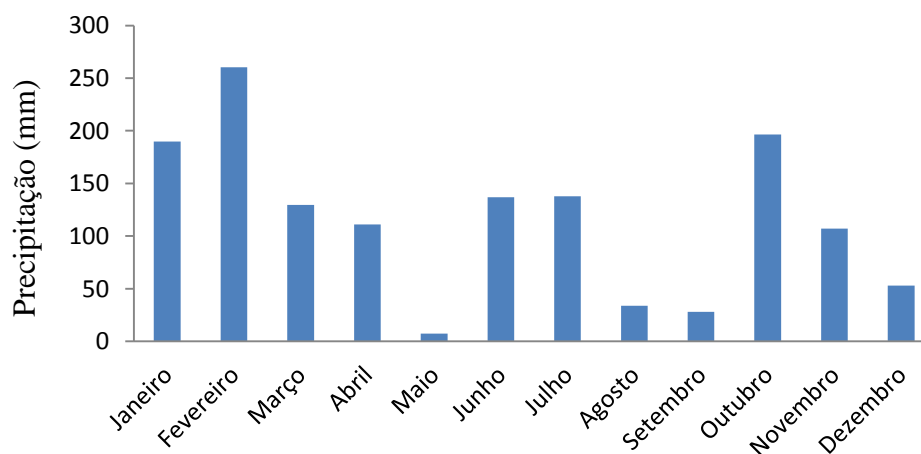


Figura 2: Precipitação (mm) referente ao período de plantio e coleta do capim-limão. Maringá/PR, 2011.

3.2. Bioensaio com fitopatógenos *in vitro*

3.2.1. Obtenção dos fungos fitopatogênicos

Os isolados fúngicos de *Corynespora cassiicola* e *Colletotrichum truncatum* foram obtidos da coleção de fungos do laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de

Maringá, PR. O material original foi mantido em tubo de ensaio em meio BDA (batata-dextrose-ágar) e armazenado em freezer a -40°C até o momento de repicagem. No momento do experimento de crescimento micelial, o material fúngico foi repicado e cultivado em meio BDA, mantido a 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Foram utilizadas placas com 15 dias após a repicagem (PULZ, 2007).

3.2.2. Bioensaio de crescimento micelial

A avaliação da influência do EBE de capim-limão sobre o crescimento micelial de *C. truncatum* e *C. cassicola*, foi feita em meio de cultivo BDA autoclavado e vertido em placas de Petri. Ao meio de cultivo fundente foi incorporado EBE sob a forma de pasta bruta e liofilizado obtido de folhas frescas de verão de *C. citratus*. Soluções do EBE em água destilada foram filtradas em membrana milipore e ajustadas para a concentração final com meio de cultura nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 mg.L⁻¹. Como testemunha utilizou-se ASM (100 mg i.a L⁻¹) e BDA (PULZ, 2007; SANTOS-NETO, 2012).

Após a solidificação do meio, um disco de micélio (sete mm de diâmetro) de cada isolado fúngico, com 15 dias de repicagem, foi transferido para o centro de cada placa de Petri contendo meio de cultura com os tratamentos. Estas placas foram vedadas com filme plástico e incubadas a 25°C e fotoperíodo de 12 horas num regime claro/escuro (PULZ, 2007). O ensaio foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento.

A avaliação de inibição do crescimento micelial foi realizada através de medições diárias do diâmetro das colônias com auxílio de paquímetro digital (precisão de 0,01mm), obtidas pela média de duas medidas diametralmente opostas, iniciando-se na instalação do experimento e perdurando até o momento em que alguma das colônias fúngicas cobrissem a superfície do meio de cultura.

Para o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento (PIC) micelial, foi utilizada a fórmula adaptada de Bastos (1997): $PIC = \{(cresc.test - cresc.trat)/(cresc.test)\} \times 100$, em que: cresc.test = crescimento micelial da testemunha (mm); cresc.trat = crescimento micelial do tratamento (mm).

3.3. Plantio, manutenção e coleta de plantas de soja para análise bioquímica

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no período de dezembro de 2011 a fevereiro de 2012. Sementes de soja da cultivar BMX Potência RR foram semeadas em vasos de cinco litros contendo mistura de solo solarizado da região, substrato e adubo

orgânico, na proporção de 3:1:1 (v:v:v). O ensaio foi feito em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento. Os tratamentos foram: EBE (extrato bruto etanólico) de material de inverno, EBE de inverno liofilizado, EBE de material de verão, e EBE de verão liofilizado, utilizados nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 mg.L⁻¹, feitos pela diluição em água e Tween 20; testemunha negativa - água + Tween 20; e testemunha positiva - ASM (0,1 g i.a.L⁻¹). Os tratamentos foram realizados quando as plantas estavam no estágio de quatro trifólios completamente expandidos. Eles foram pulverizados no 3º trifólio formado, até o ponto de escorrimento. As amostras foram retiradas dos trifólios tratados para análise de efeito local dos extratos imediatamente após os tratamentos, bem como do 4º trifólio (não tratado) para análise de efeito sistêmico. As demais coletas foram feitas após 12, 24, 48 e 72 horas após a aplicação.

Cada amostra consistiu de dois discos foliares de 2,5 cm de diâmetro, cortadas com auxílio de perfurador cilíndrico de metal, e guardadas em envelopes de papel alumínio e colocadas em isopor contendo gelo, sendo posteriormente armazenadas em freezer à -10°C até o momento de extração enzimática.

O local de condução do experimento, a fazenda Santa Escolástica, do município de Santa Cruz das Palmeiras, São Paulo, localiza-se na latitude 21°49'37" sul e longitude 47°14'55" oeste, estando a uma altitude média de 635 metros. De clima subtropical, e solo tipo profundos: latossolos de textura média a argilosa, com predomínio de arenitos e siltitos. Localizada na Depressão Periférica Paulista, essa unidade geossistêmica tem relevo com declividades relativamente baixas a médias (entre 6 e 12%), e pouca variação altimétrica, entre 600 e 700 metros de altitude. (IBGE, 2013).

Os dados edafoclimáticos dizem respeito às informações do meio físico de topografia, solo, e geologia, e às informações referentes ao clima, como temperatura, precipitação, e umidade relativa. Os dados de todas as fases do experimento foram plotados em duas fases: do local de plantio do material vegetal de capim-limão, que deu origem aos tratamentos, e do local de instalação do experimento com plantas de soja. A obtenção dos dados edafoclimáticos do local de plantio do capim-limão foi feita pela consulta de estações meteorológicas da Fazenda Experimental de Iguatemi. Os dados edafoclimáticos do local de plantio de plantas de soja foram fornecidos pela estação climatológica da empresa Monsanto, de Santa Cruz das Palmeiras, São Paulo.

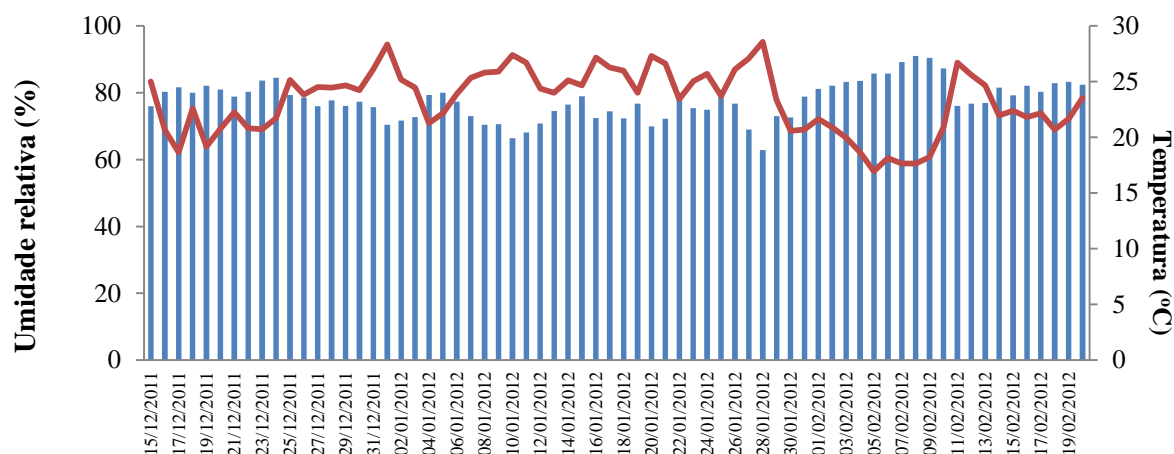


Figura 3: Temperatura média (°C) em linha vermelha, e umidade relativa do ar (%) em colunas azuis, referente ao período de plantio e coleta das folhas de soja em vasos. Santa Cruz das Palmeiras, SP, 2011-2012.

3.4. Produção de fitoalexinas em cotilédones de soja

Sementes de soja da cultivar BMX Potência RR foram semeadas em bandejas de isopor de 124 células com areia esterilizada, e mantidas em casa de vegetação sob temperatura de 25°C. Após um período de doze dias os cotilédones foram destacados das plântulas, lavados em água destilada, enxutos em papel absorvente e seccionados na superfície inferior, com aproximadamente um mm de espessura por seis mm de diâmetro com auxílio de lâmina descartável de aço inox. Cada repetição consistiu de quatro cotilédones colocados em placa de Petri sobre papel de filtro úmido com água destilada estéril, em um total de quatro repetições por tratamento. Sobre o fermento dos cotilédones foi aplicada alíquota de 50 µL de cada tratamento. As testemunhas foram ASM (acibenzolar-S-metil a 100 mg i.a L⁻¹) e água destilada. Os tratamentos foram EBE (extrato bruto etanólico) de material de inverno, EBE de inverno liofilizado, EBE de material de verão, e EBE de verão liofilizado. O EBE foi utilizado nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 mg.L⁻¹. As placas de Petri foram mantidas a 25°C no escuro por 20 horas. Em seguida, os cotilédones foram transferidos para tubos de ensaio contendo 15 mL de água destilada esterilizada e permaneceram em agitação por uma hora para extração da fitoalexina formada. A absorbância foi determinada a 285 nm (AYERS *et al.*, 1976; ZIEGLER; PONTZEN, 1982). Os cotilédones utilizados no experimento para detecção de gliceolina foram armazenados em envelopes de papel alumínio a -10°C para análises bioquímicas.

3.5. Determinação de enzimas relacionadas à defesa

3.5.1. Obtenção da preparação enzimática

Os cotilédones tratados provenientes da determinação de fitoalexinas, assim como as amostras de discos foliares, dentro dos respectivos experimentos, foram homogeneizados em 4 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) com 0,05g de PVP (polivinil pirrolidona) em almofariz de porcelana. O homogeneizado foi centrifugado a 15000 g durante 20 minutos e o sobrenadante obtido, considerado como a preparação enzimática, contendo as enzimas/proteínas solúveis, foi armazenado a 4°C para posteriores análises bioquímicas (LUSSO; PASCHOLATI, 1999).

3.5.2. Atividade de β -1,3-glucanase

A atividade de β -1,3-glucanases foi determinada pela quantificação colorimétrica de açúcares redutores liberados a partir da laminarina (VOGELSANG; BARZ, 1993). A reação envolveu 100 μ L da preparação enzimática, 50 μ L de tampão fosfato de sódio 0,01M (pH 6,0) e 150 μ L de laminarina (2 mg mL⁻¹), a 40°C durante 1 h. O controle passou pelo mesmo processo, porém a adição de laminarina foi feita somente após a incubação. Os açúcares formados foram quantificados pelo método de Lever (1972), que consiste em extrair uma alíquota de 30 μ L da solução anterior e acrescentar a esta 1,5 mL da solução de hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzoico 0,5% (HAPH) (0,5 g de hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzoico diluída em 20 mL de HCl 0,5 M e acrescida de 80 mL de NaOH 0,5 M). A mistura foi mantida a 100°C durante 10 minutos, em gelo e determinada a absorvância a 410 nm. A atividade de β -1,3-glucanases consistiu da diferença entre a absorvância da mistura contendo amostra e do controle e plotada em curva padrão para glicose ($y = 0,002x + 0,0046$, onde y é a absorvância a 410 nm e x a concentração de açúcares redutores (μ g)) e expressa em equivalente mg de glicose.hora⁻¹.mg de proteína⁻¹.

3.5.3. Atividade de peroxidases

A atividade de peroxidases foi determinada a 30°C, através do método espectrofotométrico direto (HAMMERSCHMIDT *et al.*, 1982). A mistura da reação consistiu de 2,8 mL do substrato para enzima (306 μ L de peróxido de hidrogênio P.A., 12,5 mL de guaiacol 2% e 87,5 mL de tampão fosfato 0,01M (pH 6,0) e 0,2 mL da preparação enzimática. A reação foi seguida em espectrofotômetro a 470 nm pelo período de 2 min, na qual foi observada a conversão do guaiacol em tetraguaiacoquinona. A atividade foi determinada pela

variação ocorrida entre os valores extremos situados na faixa de incremento linear, e expressa em Δ de abs. $\text{min}^{-1} \text{mg prote\u00edna}^{-1}$.

3.5.4. Atividade de fenilalanina am\u00f4nia-liase

A atividade de fenilalanina am\u00f4nia-liase foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Umesha (2006), na qual 100 μL da prepara\u00e7\u00e3o enzim\u00e1tica foram acrescidos de 400 μL de tamp\u00e3o Tris-HCl 0,025 M (pH 8,8) e 500 μL de uma solu\u00e7\u00e3o de *L*-fenilalanina 0,05 M (825,9 mg dilu\u00eddo em 100 mL de tamp\u00e3o Tris-HCl 0,025 M (pH 8,8)). Essa mistura foi incubada a 40\u00b0C durante 2 h. Ao final desse per\u00edodo foi adicionado 60 μL de HCl 5 M para cessar a rea\u00e7\u00e3o, seguindo-se de leitura em espectrofot\u00f4metro a 290 nm, cujo objetivo \u00e9 quantificar a produ\u00e7\u00e3o de \u00e1cido *trans*-cin\u00e2mico a partir de *L*-fenilalanina. A atividade de fenilalanina am\u00f4nia-liase consistiu da diferen\u00e7a entre a absorb\u00e2ncia da mistura contendo amostra e do controle (100 μL de extrato proteico e 900 μL de tamp\u00e3o Tris-HCl 0,025 M (pH8,8)), a qual foi plotada em curva padr\u00e3o para \u00e1cido *trans*-cin\u00e2mico ($y = 0,0095x + 0,0255$, onde y \u00e9 a absorb\u00e2ncia a 290 nm e x a concentra\u00e7\u00e3o de \u00e1c. *trans*-cin\u00e2mico (μg) e expressa em mg de \u00e1cido *trans*-cin\u00e2mico. $\text{h}^{-1} \text{mg prote\u00edna}^{-1}$.

3.5.5. Atividade de quitinases

A atividade de quitinases foi determinada pela adi\u00e7\u00e3o de 200 μL de CM-Chitin-RBV, sob agita\u00e7\u00e3o \u00e0 solu\u00e7\u00e3o com 50 μL da prepara\u00e7\u00e3o enzim\u00e1tica e 750 μL de tamp\u00e3o acetato de s\u00f3dio 0,1 M (pH 5). A mistura foi incubada por 20 min a 40\u00b0C, ap\u00f3s esse per\u00edodo as amostras foram acidificadas com 200 μL de HCl 1 M, resfriadas por 10 min em gelo e centrifugadas a 9500 g por 6 min. A leitura foi realizada em espectrofot\u00f4metro a 550 nm, com o objetivo de quantificar os fragmentos sol\u00faveis liberados pela quebra do substrato. O controle consistiu de 800 μL de tamp\u00e3o acetato de s\u00f3dio 0,1 M (pH 5) e 200 μL de CM-Chitin-RBV (WIRTH; WOLF, 1990). A atividade de quitinase foi determinada pela diferen\u00e7a entre a absorb\u00e2ncia da mistura contendo amostra e a do controle, assumindo-se o valor de uma unidade de enzima para cada unidade de incremento na absorb\u00e2ncia, sendo expressa em unidades de enzima $\text{min}^{-1} \text{mg prote\u00edna}^{-1}$.

3.5.6. Atividade de polifenoloxidasas

A atividade de polifenoloxidasas foi determinada pela metodologia descrita por Duangmal e Apenten (1999). O substrato para enzima consistiu de 110,1 mg de catecol dilu\u00eddo em 50 mL de tamp\u00e3o fosfato de s\u00f3dio 0,1 M (pH 6,0), formado uma solu\u00e7\u00e3o de

catecol 0,02 M. A reação ocorreu a 30 °C, pela adição de 20 µL da fonte enzimática em 980 µL do substrato para enzima e posterior acompanhamento em espectrofotômetro a 420 nm, pelo método direto, durante 2 min, a qual consiste em quantificar a oxidação do catecol convertido em quinona. A atividade foi determinada pela variação ocorrida entre os valores extremos situados na faixa de incremento linear, e expressa em Δ de abs. $\text{min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$.

3.5.7. Determinação de proteínas totais

O teor de proteínas totais foi determinado pelo método de Bradford (1976), consistindo de 600 µL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0), 200 µL de preparação enzimática e 200 µL de reagente de Bradford (250 mg de corante Coomassie Brilliant Blue G-250, 125 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4), 125 mL de etanol e 250 mL de água destilada). Após adicionar o reagente sob agitação e incubar as amostras por 5 min, foi efetuada leitura em espectrofotômetro a 595 nm. Cada amostra foi formada por triplicatas. A cubeta de referência consistiu de 800 µL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) e 200 µL de reagente. A absorbância foi plotada em curva padrão para proteína com base em albumina de soro bovino ($y = 0,0299x + 0,0596$, onde y é a absorbância a 595 nm e x a concentração de proteína (μg)).

3.6. Separação dos componentes da preparação elicitora bruta através de cromatografia de troca iônica (CTI)

A cromatografia de troca iônica foi realizada utilizando-se tampão Tris-HCl para eluição do material do interior da coluna. A amostra aplicada de EBE foi ressuspensa no mesmo tampão de equilíbrio da coluna, na concentração de $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, previamente filtrada em membrana tipo Millipore (0,45 µm), sendo a coluna regenerada após cada aplicação de amostra (FRANZENER, 2011).

A cromatografia de troca iônica foi realizada em coluna de vidro (25 x 5 cm) preenchida com seis cm de dietilaminoetil-celulose (DEAE celulose - Sigma), equilibrada com tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8,0. Uma amostra de três mL da preparação bruta foi aplicada e eluída com o tampão de equilíbrio, com fluxo de $2,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Após a saída do material não adsorvido, o material retido foi deslocado pelo uso de soluções de NaCl, no tampão de equilíbrio, nas concentrações subsequentes de 0,125 M, 0,25 M, 0,50 M e 1 M. Frações de 5 mL foram coletadas e a presença de proteínas foi detectada em espectrofotômetro a 280 nm; e a de carboidratos de acordo com o método de Lever (1972). As frações foram reunidas de acordo com o perfil de distribuição de proteínas e de carboidratos. Para eliminação do NaCl, as frações foram dialisadas em membrana com corte para 12-14

kDa em água destilada a 4°C, com seis horas de intervalo entre as trocas de água (FRANZENER, 2011).

Alíquotas das frações obtidas foram avaliadas quanto à capacidade de induzir a produção de gliceolina e aumentar a atividade de enzimas relacionadas à defesa vegetal em cotilédones de soja, conforme os itens 3.4 e 3.5.

3.7. Separação dos componentes da preparação elicitora bruta através de cromatografia de filtração em gel (CFG) - cromatografia de exclusão

Para a cromatografia de filtração em gel, uma coluna de vidro (1 cm de diâmetro x 30 cm de comprimento) foi preenchida com Sephacryl S-100-HR (Sigma), formando um gel sedimentado de 45,6 cm³. Aplicou-se 1 mL das principais frações obtidas da CTI sobre o leito da coluna, e eluiu-se com tampão Tris - HCl 0,01 M (pH 8,0), sendo coletadas frações de 2 mL, num fluxo de 1,5 mL min⁻¹. Picos de frações obtidos foram reunidos e testados para os ensaios de fitoalexinas e PRPs em cotilédones, conforme itens 3.4 e 3.5 (FRANZENER, 2011). A massa molecular relativa de cada fração foi estimada utilizando-se uma curva de calibração. Para proteína a curva foi construída plotando-se em um gráfico o log₁₀(x) das massas moleculares das proteínas padrão albumina de soro bovino (66 KDa); anidrase carbônica (29 KDa) e bacitracina (1,45 KDa) e o quociente do volume de eluição destas proteínas, pelo “void volume” (Ve/Vo) ($y = 1368,4e^{-3,122x}$).

Efetou-se o monitoramento da presença de proteínas das frações obtidas em espectrofotômetro a 280 nm, e os açúcares foram quantificados pelo método de Lever (1972), que consiste em extrair uma alíquota de 30 µL da solução anterior e acrescentar a esta 1,5 mL da solução de hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico 0,5% (PAHBAH) (0,5 g de hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico diluída em 20 mL de HCl 0,5 M e acrescida de 80 mL de NaOH 0,5 M). A mistura foi mantida a 100°C durante 10 minutos, em gelo e determinada a absorvância a 410 nm. Os dados foram plotados em curva padrão para glicose ($y = 0,002x + 0,0046$, onde y é a absorvância a 410 nm e x a concentração de açúcares redutores (µg) em mg de glicose).

3.8. Análise estatística dos dados da atividade enzimática de cotilédones de soja

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística para determinar a ocorrência de diferenças entre os tratamentos. Determinou-se a homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene, e a distribuição dos dados e dos erros pelo método de Shapiro-Wilk com o auxílio do programa SAS, versão 9.2 para Windows. A transformação de dados foi utilizada quando necessária. Posteriormente aplicou-se à análise de variância (ANOVA) a 5% de

probabilidade pelo teste F. As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa SISVAR (Sistema de Análise Estatística), versão 4.1 (FERREIRA, 2000).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Condições edafoclimáticas de plantio e coleta do material vegetal

4.1.1. Condições edafoclimáticas do local de colheita do capim limão

A redução de temperatura em junho e julho (inverno) pode ser observada na Figura 1. Em relação à umidade relativa do ar pode observar-se que os menores índices são referentes aos meses de agosto e setembro. A coleta de inverno, comparativamente, foi feita em plantas crescendo em ambiente mais úmido e mais frio, em relação à coleta de verão, na qual as plantas estavam em condições de maiores temperaturas e menor umidade.

A precipitação acumulada nos meses de inverno foi inferior aos meses de verão durante o período de condução do experimento (Figura 2), o que contribuiu para o desenvolvimento vegetativo diferencial das plantas e, conseqüentemente, a variações fisiológicas e metabólicas nas plantas de capim-limão (TAIZ; ZEIGER, 2009).

As diferenças fisiológicas foram determinantes para os dados obtidos no experimento, e podem ser observadas em material vegetal coletado em diferentes estações do ano. Isso porque a síntese de compostos inerentes da genética da planta e a composição dos óleos essenciais em diversas plantas aromáticas são influenciadas pelo genótipo, o estágio de desenvolvimento da planta, condições nutricionais e as condições ambientais, inclusive ciclo circadiano (MAROTTI *et al.*, 1994; GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Dentro dos parâmetros climáticos, temperatura, umidade relativa e precipitação têm sido apontadas como fatores que influenciam a composição e conteúdo de metabólitos em várias espécies aromáticas (MORAIS, 2009). Compostos elicitores de enzimas relacionadas à defesa que são inerentes da constituição genética de capim-limão podem, também, variar quando a planta é colhida em diferentes horários do dia ou épocas do ano.

Diferenças relacionadas ao período de coleta foram observadas em *Hyptis marruboides*, nas quais foram obtidos o maior teor de óleo essencial no verão, período em que as plantas se encontravam em pleno florescimento e com os ramos cheios de folhas (BOTREL *et al.* 2010). O fator responsável apontado pelos autores foi o maior comprimento dos dias, com melhores condições para o desenvolvimento vegetativo das plantas. Outro estudo, com resultados semelhantes para coletas em diferentes horários e épocas de colheita, em folhas de citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt), concluiu-se que a época seca reduziu o conteúdo de limoneno, citronelol, geraniol, e farnesol, e aumentou o conteúdo de citronelal e o neral (BLANK *et al.* 2007). Para esta espécie, a sazonalidade afetou

significativamente a qualidade do óleo essencial. A redução dos teores de óleo, assim como alteração bioquímica da planta, principalmente no inverno e outono, pode ser explicada pelo acionamento do mecanismo natural de fonte-dreno, que degrada metabólitos e direciona seus compostos químicos para a manutenção do metabolismo primário (TAIZ; ZEIGER, 2009).

As plantas de capim-limão estiveram sob condições de campo e seus metabólitos variaram em resposta aos diferentes estresses e intempéries característicos de cada estação do ano. Em condições de estresse, como temperaturas elevadas e baixa precipitação pluviométrica, as plantas utilizam seus recursos metabólicos na produção de metabólitos secundários para se defenderem de insetos herbívoros, micro-organismos patogênicos e mesmo contra agentes físicos (CARNEIRO; FERNANDES, 1996, LARCHER, 2004). Metabólitos como os óleos essenciais podem ter sua produção aumentada em situações de estresse (LAVABRE, 1997; MARTINS *et al.*, 2000). Em condições de temperaturas elevadas ou períodos longos de estiagem, plantas colhidas no outono e no verão podem produzir maior teor de óleo essencial. Isto pode ser explicado pelo fato de ocorrer nestas estações climáticas, condições de estresse hídrico e temperaturas elevadas, respectivamente, ocasionando maiores teores de óleo essencial ou outras moléculas correlatas nestas épocas do ano. Já no inverno, a taxa de crescimento das plantas é reduzida e a produção dos metabólitos secundários é alterada.

4.2. Bioensaio de crescimento micelial de *Colletotrichum truncatum* e *Corynespora cassiicola*

Os efeitos dos subprodutos de capim-limão incorporados ao meio de cultura sobre os crescimentos miceliais dos fitopatógenos podem ser visualizados na Tabela 1. O crescimento micelial de *C. truncatum* foi aumentado por todas as concentrações até 200 mg.L⁻¹ (aumento de 16% na concentração de 50 mg.L⁻¹, de 32% a 100 mg.L⁻¹ e 17 % a 200 mg.L⁻¹). No entanto, na dose de 400 mg.L⁻¹ os efeitos dos tratamentos não liofilizados foram estatisticamente iguais aos da testemunha água.

O tratamento liofilizado na dose de 50 mg.L⁻¹ e de 400 mg.L⁻¹ também apresentaram efeito semelhante ao da testemunha água. No entanto, o tratamento a 200 mg.L⁻¹ mostrou um efeito negativo no crescimento do fungo (redução de 10%) (Tabela 2). As testemunhas diferiram estatisticamente umas das outras, uma vez que o ASM aumentou o crescimento do fungo, e a testemunha água apresentou o menor valor estatístico observado.

A liofilização pode ter concentrado componentes tóxicos ao fungo, pois o material liofilizado fez com que o crescimento micelial fosse menor quando comparado ao tratamento que não passou pelo processo (Tabela 1).

Verificou-se que os tratamentos na forma bruta, nas concentrações de 50 e 200 mg.L⁻¹ aumentaram o crescimento micelial de *C. asiicola*, assim como todos os tratamentos de material liofilizado (Tabela 1). Nas demais concentrações dos tratamentos não liofilizados não houve diferença estatística em relação à testemunha água. Para o crescimento desse fungo, fisiologicamente, demonstra outras necessidades nutricionais ou metabólicas em relação ao *C. truncatum*, pois a liofilização concentrou componentes que o fungo utilizou para seu crescimento. Essa afirmação está baseada no fato de que o material liofilizado fez com que o crescimento micelial fosse maior quando comparado ao tratamento que não passou pelo processo da liofilização.

Somente nas concentrações de 200 e 400 mg.L⁻¹ os EBEs apresentaram efeito sobre o crescimento micelial, possivelmente devido a um aumento da concentração de compostos tóxicos. Em concentrações mais baixas, o fungo pode ser capaz de detoxificar o componente prejudicial, ou utilizar os nutrientes presentes no extrato para seu crescimento. O controle acibenzolar-S-metil (ASM) não diferiu estatisticamente da testemunha água, demonstrando nenhuma atividade direta sobre os microrganismos estudados. Assim, como os dados obtidos no presente trabalho, o ASM não apresentou atividade antibiótica sobre o fitopatógeno *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (TOILLIER *et al.*, 2010).

Tabela 1: Crescimento micelial de *Colletotrichum truncatum* e *Corynespora cassiicola* após 120 horas em meio BDA com concentrações crescentes de extrato etanólico de *Cymbopogon citratus* em relação à testemunha água

Tratamento	<i>C. truncatum</i>		<i>C. cassiicola</i>	
	Média de crescimento micelial (mm)	I.C.M (%)	Média de crescimento micelial (mm)	I.C.M (%)
Água destilada	49,53 c	-	54,01 c	-
ASM a 100 mg i.a L ⁻¹	62,84 a	27 ⁺	63,22 a	17 ⁺
T1 EBE a 50 mg L ⁻¹	57,30 b	16 ⁺	64,88 a	20 ⁺
T2 EBEL a 50 mg L ⁻¹	52,63 c	6 ⁺	56,35 b	4 ⁺
T3 EBE a 100 mg L ⁻¹	65,40 a	32 ⁺	51,54 c	5 ⁻
T4 EBEL a 100 mg L ⁻¹	59,90 b	21 ⁺	58,33 b	8 ⁺
T5 EBE a 200 mg L ⁻¹	58,20 b	17 ⁺	56,80 b	5 ⁺
T6 EBEL a 200 mg L ⁻¹	44,72 d	10 ⁻	58,70 b	9 ⁺
T7 EBE a 400 mg L ⁻¹	52,48 c	6 ⁺	53,06 c	2 ⁻
T8 EBEL a 400 mg L ⁻¹	50,04 c	1 ⁺	55,87 b	3 ⁺
C.V.:	9%		11%	

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Médias seguidas de (+) indicam estímulo pelos tratamentos em % para o crescimento do fungo em relação à testemunha água. Médias seguidas de (-) indicam inibição do crescimento em % relação à testemunha água. I.C.M.: porcentagem de inibição de crescimento micelial em relação à testemunha água. EBE: extrato bruto etanólico. EBEL: extrato bruto etanólico liofilizado.

Resultados encontrados na literatura apresentaram diferenças em relação aos obtidos no presente trabalho. Concentrações de 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 50% (p/v) do extrato aquoso de *C. citratus* mostraram relação dose-dependente, porém com estímulo do extrato no crescimento micelial e à esporulação de *Colletotrichum gloeosporioides* (CARVALHO *et al.*, 2008). Itako *et al.* (2009) testaram o extrato aquoso de *C. citratus* a 10 e 20% no controle de *Cladosporium fulvum* em folhas de tomate e constaram que em menor concentração reduziu o número de lesões em 62,8%, enquanto que a maior concentração não diferiu significativamente da testemunha.

Os efeitos dos extratos de alho e alecrim sobre *Colletotrichum lindemuthianum*, estudados por Brand *et al.* (2010), foram semelhantes aos resultados obtidos no presente trabalho. Os autores observaram crescimento linear quando utilizaram extratos de alho e alecrim autoclavados, e crescimento exponencial no extrato de alho não autoclavado,

indicando que apenas neste houve um período de adaptação do patógeno ao extrato. O extrato de alho autoclavado afetou o crescimento do fungo especialmente nas maiores concentrações, sugerindo que a alta temperatura da autoclavagem pode ter liberado alguns metabólitos tóxicos ao fungo, uma vez que o extrato de alecrim não autoclavado não influenciou o crescimento fúngico.

As diferenças fisiológicas dos patógenos poderiam explicar o comportamento diferencial de crescimento, quando foram adicionados os extratos ao meio de cultura. As necessidades nutricionais podem variar de espécie para espécie, fazendo com que as respostas perante determinados compostos sejam diversas entre si. Da mesma forma, a liofilização, que contribui para a concentração do material submetido ao processo, pode oferecer uma maior quantidade de nutrientes, ou de moléculas tóxicas.

4.3. Atividade do extrato bruto etanólico de capim-limão na produção de fitoalexinas em cotilédones de soja

Todos os tratamentos baseados em *C. citratus*, independentemente de liofilização e da estação de coleta, aumentaram a produção de fitoalexinas em cotilédones de soja (Figura 4). Os maiores efeitos observados foram para os extratos nas concentrações de 200 e 400 mg L⁻¹. Os dados sugerem efeito dose-dependente, demonstrando que os tratamentos possuem metabólitos elicitores de fitoalexinas e estes estão relacionados com a maior concentração dessas substâncias. A análise estatística revelou que houve pouca diferença entre o material coletado no inverno e no verão: o EBE de inverno, na maior dose, destacou-se estatisticamente. O tratamento foi 3,15 vezes maior que a testemunha água e 13,72 vezes maior que a testemunha ASM. Esse dado sugere que os compostos elicitores, nesses extratos, permaneceram constantes durante os períodos de coleta. Embora o efeito de liofilização seja o de concentrar os elicitores, esse efeito não foi observado para as doses utilizadas quando utilizadas na mesma proporção massa/massa de material não liofilizado.

A produção de gliceolina proporcional à dose do tratamento utilizada aponta que é necessária uma quantidade mínima de células em contato com o indutor para haver uma resposta fisiológica significativa (VAN LOON *et al.*, 1994). No entanto, pela definição clássica da indução de resistência, não deveria haver relação entre a magnitude de resposta e a concentração da molécula elicitora, como acontece com os produtos e defensivos comerciais (ROMEIRO, 2008).

Em relação às testemunhas, os tratamentos foram estatisticamente superiores ao ASM nas concentrações acima de 200 mg.L⁻¹; na concentração de 50 e 100 mg.L⁻¹ os

tratamentos foram iguais a 5% de significância. No controle, no qual foi aplicada água destilada, ocorreu indução da produção de fitoalexinas, possivelmente, devido à lesão mecânica realizada nos cotilédones (Figura 4). O controle ASM também não foi capaz de aumentar a produção da fitoalexina.

Resultados semelhantes foram verificados em experimentos com extratos de *Ocimum gratissimum* em soja (COLPAS *et al.*, 2009). Os autores verificaram que todos os tratamentos induziram a produção de fitoalexinas em soja, e que esta foi quase seis vezes maior que a testemunha quando a concentração de 25% dos extratos de *O. gratissimum* era usada. Pouca produção foi observada em concentrações mais baixas.

O uso de extratos cítricos (produto comercial Ecolife40) também apresentou resultados semelhantes na indução de fitoalexinas em soja (MOTOYAMA *et al.*, 2003). Os resultados apontaram que a produção de gliceolina acompanhou o aumento das concentrações do extrato cítrico. O acúmulo de gliceolina foi maior na concentração de 5.000 ppm de extrato cítrico, dose máxima utilizada.

Mazaro *et al.* (2008) também verificaram que os preparados de pitangueira possuem potencial para induzir as fitoalexinas gliceolinas em cotilédones de soja, respondendo ao aumento das concentrações dos preparados.

Gliceolina

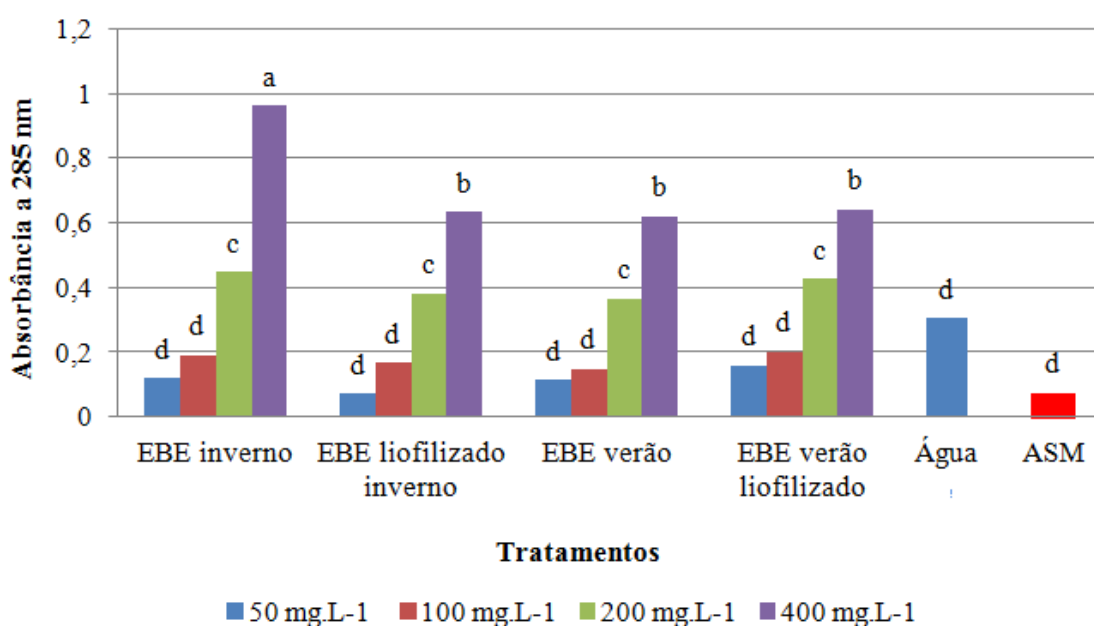


Figura 4: Acúmulo de gliceolina em cotilédones de soja após aplicação de diferentes concentrações (50, 100, 200 e 400 mg.L⁻¹) de extrato bruto etanólico (EBE) de *Cymbopogon citratus* colhido em duas estações do ano (verão e inverno). Dose utilizada para a testemunha ASM (acibenzolar-S-metil): 100 mg i.a L⁻¹. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância pelo teste F. C.V.: 8,76 %.

4.4. Condições edafoclimáticas do local de instalação do experimento em vasos com plantas de soja

O período de coleta do material vegetal de folhas de soja ocorreu com temperatura média de 20°C, e umidade relativa superior a 75%, conforme observado na figura 4. Diferentes condições de temperatura e umidade alteraram a atividade de certos genes no grupo de células de resposta, levando a novos padrões de produção de proteínas e, conseqüentemente, a constituição bioquímica (PASCHOLATI & LEITE, 1994).

Diferenças fisiológicas podem ser observadas em material vegetal coletado em diferentes períodos do dia, acompanhando a síntese de compostos inerentes da genética da planta. Mudanças na expressão genética da planta são influenciadas pelo genótipo, o estágio de desenvolvimento da planta, condições nutricionais e as condições ambientais, inclusive ciclo circadiano (TAIZ; ZEIGER, 2009). Da mesma maneira, para pode ocorrer expressão da resposta de defesa da soja após a aplicação dos tratamentos, foi necessária a observação de

alterações na atividade enzimática em períodos de tempo (e do acompanhamento das condições climáticas no momento da coleta).

4.5. Atividade do extrato bruto etanólico de capim-limão na atividade de enzimas relacionadas à patogênese em cotilédones e folhas de soja

4.5.1. Atividade de β -1,3-glucoanase

A atividade de β -1,3-glucoanase em cotilédones de soja foi influenciada pelos tratamentos em cotilédones de soja. Embora tenha ocorrido diferença significativa entre os tratamentos, os EBE de verão a 200 e 400 mg.L⁻¹ foram os que mais aumentaram a atividade da enzima, usados na maior concentração do extrato (Figura 5). O EBE de verão a 200 mg.L⁻¹ aumentou em 1,8 e 1,56 vezes a atividade da enzima em relação a água e ao ASM, respectivamente. O EBE de verão a 400 mg.L⁻¹ aumentou em 1,74 e 1,51 vezes a atividade da enzima em relação a água e ao ASM, respectivamente. Para essa enzima, no entanto, a concentração pela liofilização de elicitores e outras moléculas do extrato afetou negativamente o EBE, como pôde ser observado pela comparação com o tratamento que não passou pelo processo de liofilização. A comparação com a testemunha ASM mostrou que somente os tratamentos de verão, quando utilizados na dose de 200 e 400 mg.L⁻¹, apresentaram efeito estatístico superior a essa testemunhas (Figura 5). A testemunha água não diferiu estatisticamente da testemunha ASM.

Possivelmente o fator que influenciou as atividades dessas enzimas esteja relacionado ao período de coleta para composição dos extratos. As diferenças encontradas nos efeitos induzidos pelos extratos de capim-limão de material podem ser explicadas pela condição fisiológica das plantas que compuseram os extratos no período da coleta.

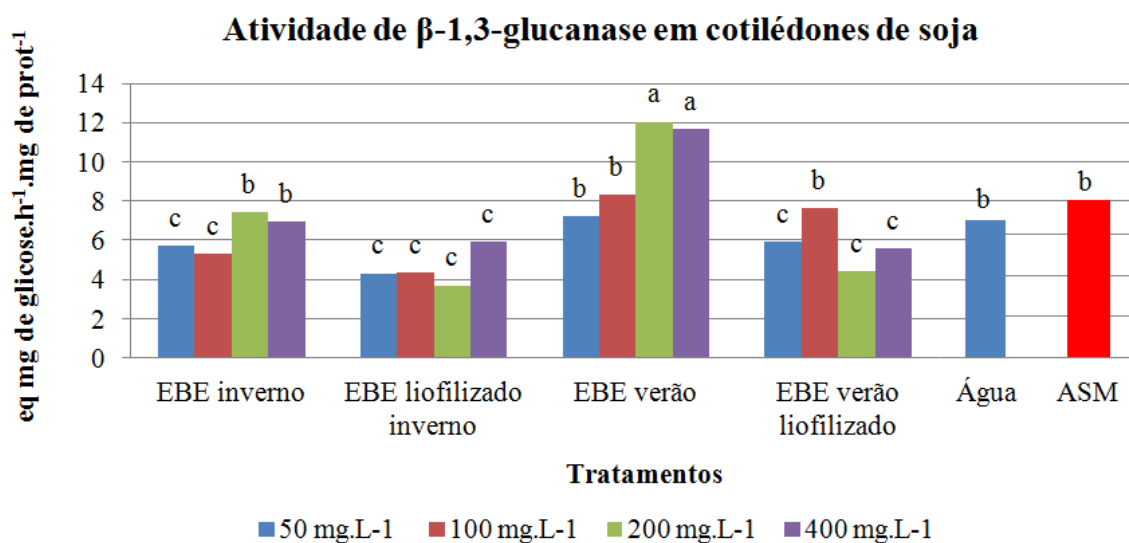


Figura 5: Atividade de β -1,3-glicanase em cotilédones de soja após aplicação de diferentes concentrações (50, 100, 200 e 400 mg.L⁻¹) de extrato bruto etanólico (EBE) de *Cymbopogon citratus* colhido em duas estações do ano (verão e inverno). Teste de média a 5% de significância pelo teste F. ASM a 100 mg i.a L⁻¹. C.V. (%): 18,66.

A atividade de β -1,3-glicanases em folhas de soja foi aumentada por todos os tratamentos, porém não foi observado efeito da concentração sobre o aumento da atividade. Pode ser observado que o período de maior atividade ocorreu entre 0 e 12 horas após a aplicação dos tratamentos, seguido de decréscimo da atividade. A atividade da glicanase variou em função do tempo, o que representa alterações dependentes desse fator após estímulo do elicitor, devido ao redirecionamento de metabólitos para outros processos fisiológicos, como para a defesa (LARCHER, 2004). O aumento da atividade enzimática verificado deve-se ao predomínio de processos anabólicos e formação de isoformas mais ativas das enzimas.

Kuhn (2007) verificou que a atividade de β -1,3-glicanases em folhas de tomateiro apresentou comportamento muito semelhante, sendo que a atividade aumentava quando recebiam aplicação dos indutores (*B. cereus* e ASM) na ausência do patógeno. Porém, decorridos 14 dias, o nível de atividade retornava a valores próximos à testemunha, mas quando as plantas recebiam nova aplicação voltava a aumentar. Observou o fenômeno no tratamento com duas aplicações, cujo intervalo entre elas foi de 28 dias, tempo suficiente para que estes mecanismos não estivessem mais ativos. Já nos tratamentos com três e quatro

aplicações, o intervalo entre elas foi de 14 dias, fazendo com que os mecanismos permanecessem ativos no período de tempo em que estavam sendo efetuadas.

Os melhores tratamentos observados nos experimentos em folhas de soja foram originados de material de inverno, tanto para os efeitos locais quanto sistêmicos, na forma de pasta bruta e da pasta liofilizada (Figura 6). Os extratos colhidos no verão muitas vezes não apresentaram efeito equivalente aos extratos de inverno, sugerindo que o balanço fisiológico da planta, diferente em cada estação, seja diferente, e que isso influencie na produção de elicitores. Na avaliação de efeito local e sistêmico, nesses casos, observou-se atividade sistêmica geralmente inferior ao efeito local. Esses resultados podem ser devido ao tempo da amostragem. Sendo a última coleta realizada 72 horas após a aplicação dos tratamentos, talvez maior atividade observável requeira um tempo maior para expressar-se, em decorrência do redirecionamento fisiológico para a sinalização.

O aumento da concentração de elicitores pelo processo de liofilização não apresentou efeito detectável pelo modelo estatístico. As testemunhas ASM e água não foram diferentes entre si, tanto no efeito local, quanto sistêmico dentro do intervalo de tempo comparado (Figura 6).

Semelhanças com os dados apresentados foram observados em experimentos com plantas de tomateiro pulverizadas com MCp (derivados de quitosana da parede de *Crinipellis perniciosa*) e Ecolife, sem inoculação do patógeno *Xanthomonas vesicatoria* (CAVALCANTI *et al.* 2006). Os resultados mostraram aumento na atividade de β -1,3-glucanases em folhas logo na primeira hora após a pulverização, em relação a plantas pulverizadas com água e sem inoculação. Plantas pulverizadas com ASM e VLA (eliciadores heterogêneos, a partir da fragmentação do caule de *Solanum lycocarpum* infectado por *C. perniciosa*) apresentaram aumentos somente a partir de quatro horas após a aplicação dos tratamentos (hap). Apenas plantas pulverizadas com ASM manifestaram tendência de aumento de atividade de β -1,3-glucanases entre três e 12 dias após a aplicação, por vezes não-significativas, como ocorreu seis dias após a aplicação.

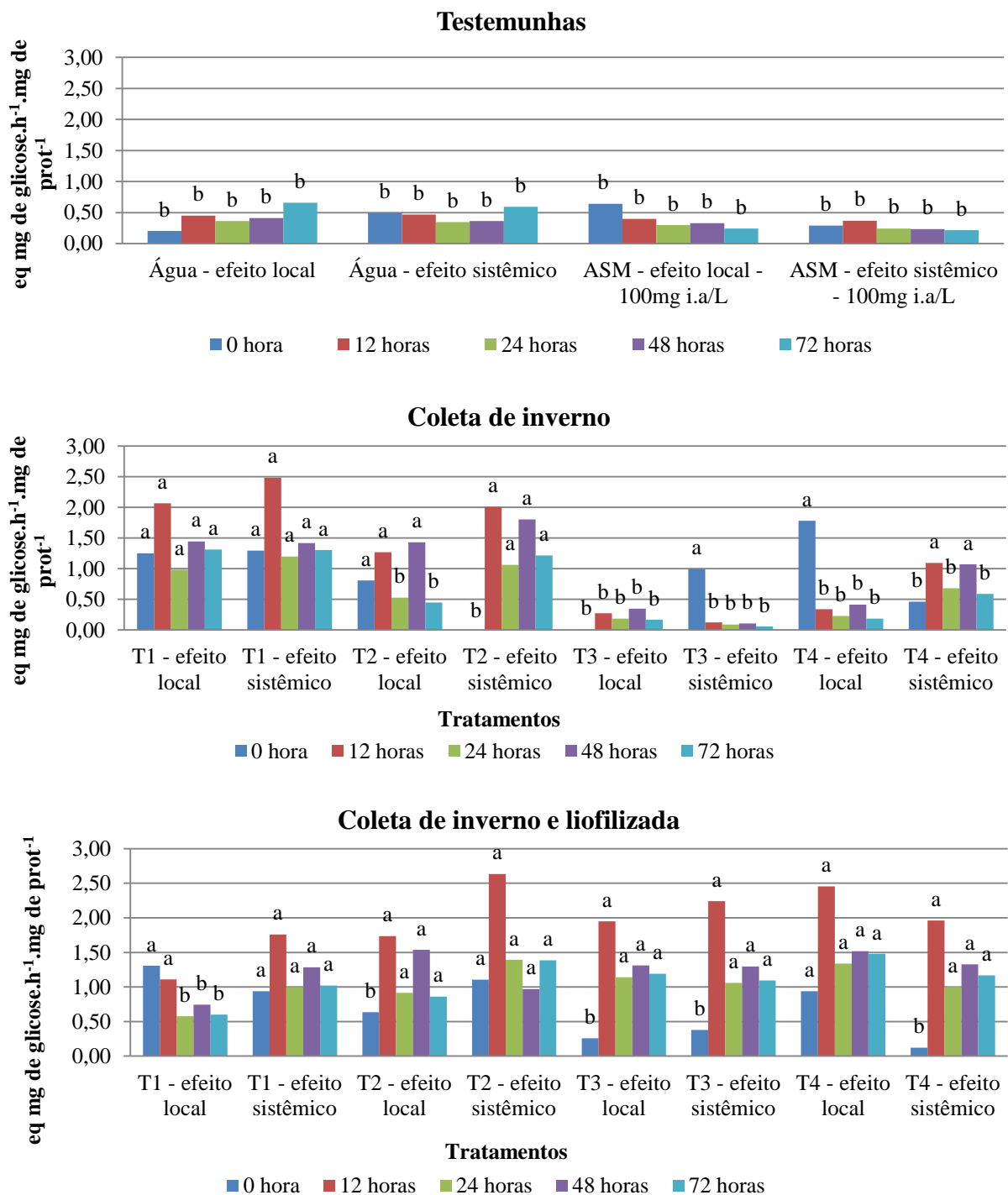
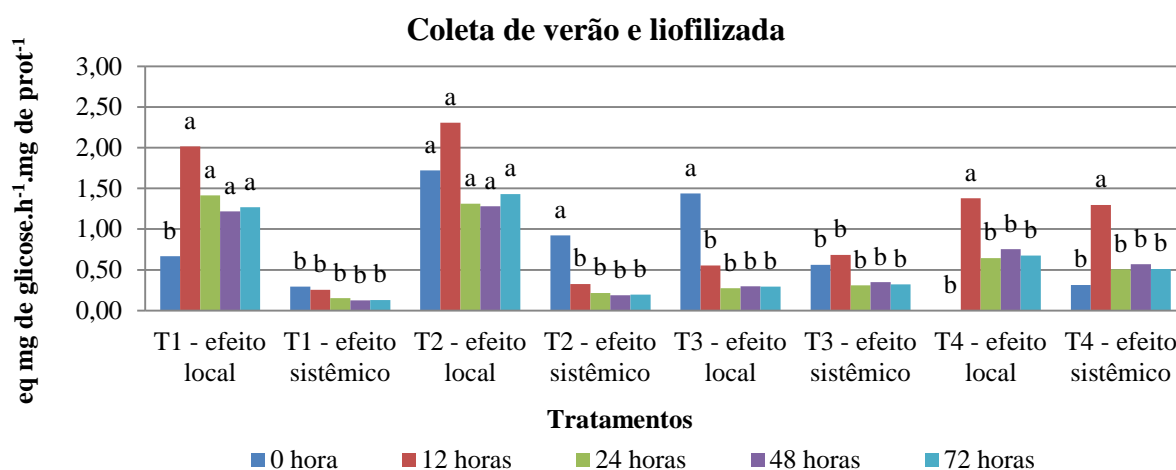
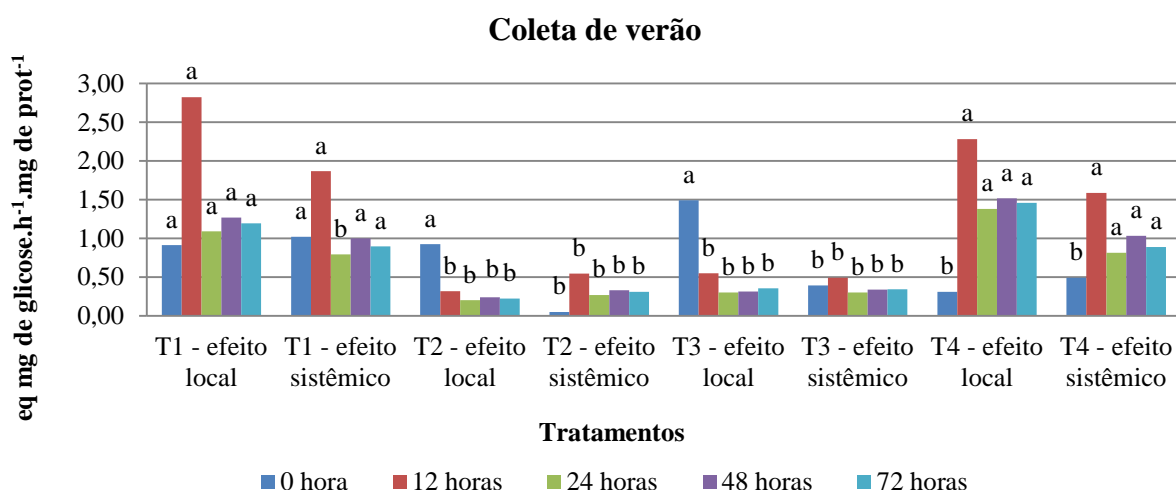


Figura 6: Atividade de β -1,3-glucanase em folhas tratadas e não tratadas de soja em diferentes períodos de coleta (0, 12, 24, 48 e 72 horas), após a aplicação do extrato bruto etanólico de capim-limão (EBE) colhido em duas estações do ano (verão e inverno), nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 mg.L⁻¹. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. T1= EBE a 50 mg; T2= EBE a 100 mg; T3= EBE a 200 mg; T4= EBE a 400 mg. C.V.: 27,63%.



Continuação figura 6: Atividade de β -1,3-glucanase em folhas tratadas e não tratadas de soja em diferentes períodos de coleta (0, 12, 24, 48 e 72 horas), após a aplicação do extrato bruto etanólico de capim-limão (EBE) colhido em duas estações do ano (verão e inverno), nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 mg.L⁻¹. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. T1= EBE a 50 mg; T2= EBE a 100 mg; T3= EBE a 200 mg; T=4 EBE a 400 mg. C.V.: 27,63%.

4.5.2. Atividade de peroxidase

Em relação à peroxidase em cotilédones de soja, a análise estatística sugere que houve redução da atividade enzimática, quando comparada as testemunhas água e ASM, com exceção de tratamentos originados de material colhido no verão (Figura 7). A liofilização do extrato de material vegetal de capim-limão de verão apresentou o melhor resultado como indutor da atividade de peroxidase, porém com atividade igual as das testemunhas água e ASM (Figura 7). A liofilização, provavelmente, foi responsável pela concentração de compostos elicitores de peroxidase presentes no extrato de verão.

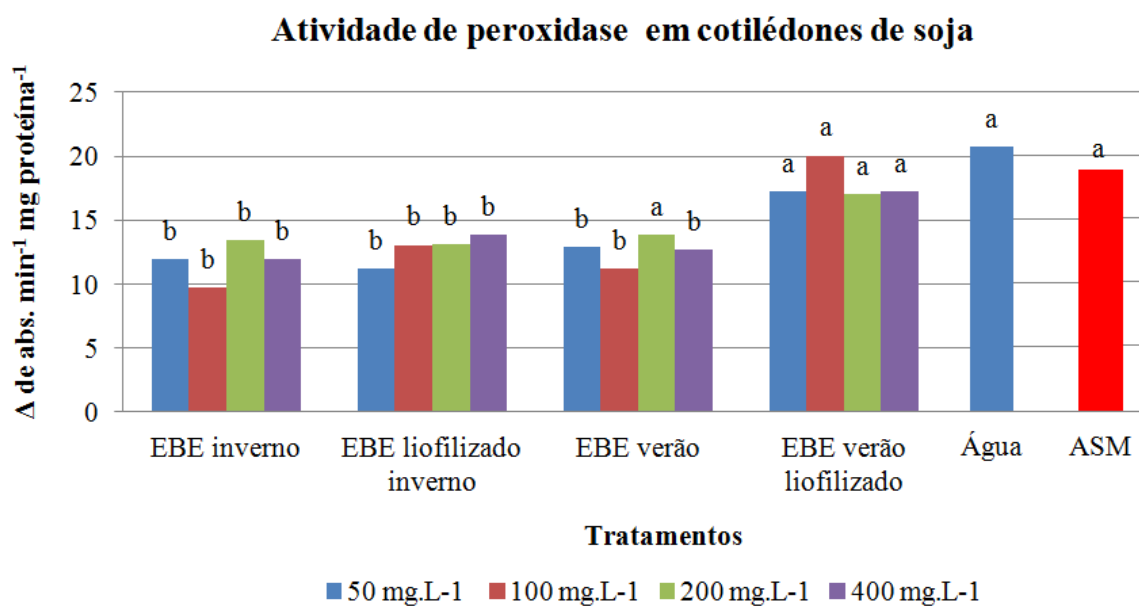


Figura 7: Atividade peroxidase em cotilédones de soja após aplicação de diferentes concentrações (50, 100, 200 e 400 mg.L⁻¹) de extrato bruto etanólico (EBE) de *Cymbopogon citratus* colhido em duas estações do ano (verão e inverno). Teste de média a 5% de significância pelo teste F. ASM a 100 mg i.a L⁻¹. C.V. (%): 12,53.

A baixa atividade de peroxidase observada para os extratos de inverno também pode estar relacionada ao tempo de amostragem utilizado no experimento com cotilédones (20 horas após a aplicação dos tratamentos). Diferentemente ao observado no experimento aqui apresentado, Bonaldo (2005) verificou que o ASM promoveu o acúmulo de peroxidases após três dias do tratamento elicitor em plântulas de pepino, mas maiores alterações foram observadas após a inoculação com o patógeno (seis dias após o tratamento elicitor). No entanto, para este último caso, sugeriu que esta alteração na atividade de peroxidases esteja relacionada ao processo de infecção da planta pelo patógeno e não pela atividade elicitora dos tratamentos. Outro experimento que relacionou uma resposta efetiva dependente do período amostrado foi o de Labanca (2002), que observou alterações na atividade de peroxidases em cotilédones de soja sob tratamento elicitor somente após 48 horas, que perdurou até 96 horas após a aplicação. Di Piero (2003) relatou que o acúmulo local de peroxidases em pepino induzido por extratos de shitake foi observado no terceiro e sexto dia após o tratamento elicitor.

A atividade de peroxidase em folhas de soja foi aumentada por todos os tratamentos quando comparadas com as testemunha água e ASM (Figura 8). Observou-se que o aumento

da atividade foi dependente do tempo de coleta, principalmente a partir das 24 horas após a aplicação dos tratamentos. Esse período de tempo é necessário para o redirecionamento de metabólitos, com predomínio de processos anabólicos e formação de isoformas mais ativas das enzimas formadas naquela determinada condição (LARCHER, 2004).

Levando em consideração a estação do ano para a coleta, não foi observada diferença, uma vez que o extrato de inverno apresentou valores semelhantes aos extratos de verão. No entanto, os dados sugerem que o fator concentração é determinante, uma vez que a análise estatística mostrou que os tratamentos foram mais efetivos somente na dose de 400 mg.L⁻¹, com exceção do material de verão liofilizado. Os dados de efeito sistêmico, para todos os tratamentos, revelam que foram estatisticamente inferiores ao efeito local (Figura 8).

Dados semelhantes foram obtidos em pesquisa realizada por Franzener (2011). O autor citado observou que o extrato aquoso de eucalipto (EA) induziu aumento da atividade de peroxidase em pepino, principalmente, 48 horas após o tratamento. Folhas que não receberam os tratamentos não apresentaram diferença significativa. O EA aumentou significativamente a atividade da enzima 72 e 96 horas após as folhas de feijoeiro terem recebido os tratamentos. Porém, assim como observado em pepino, não foi constatada diferença na atividade enzimática nas folhas de feijão não tratadas. A atividade do EA apenas nas folhas tratadas sugere a ação prioritariamente local do extrato, com ausência ou limitada ação sistêmica nas condições do trabalho. Outra semelhança observada foi em relação à concentração, pois o aumento da atividade de peroxidase mostrou ser dependente da dose utilizada de EA de eucalipto.

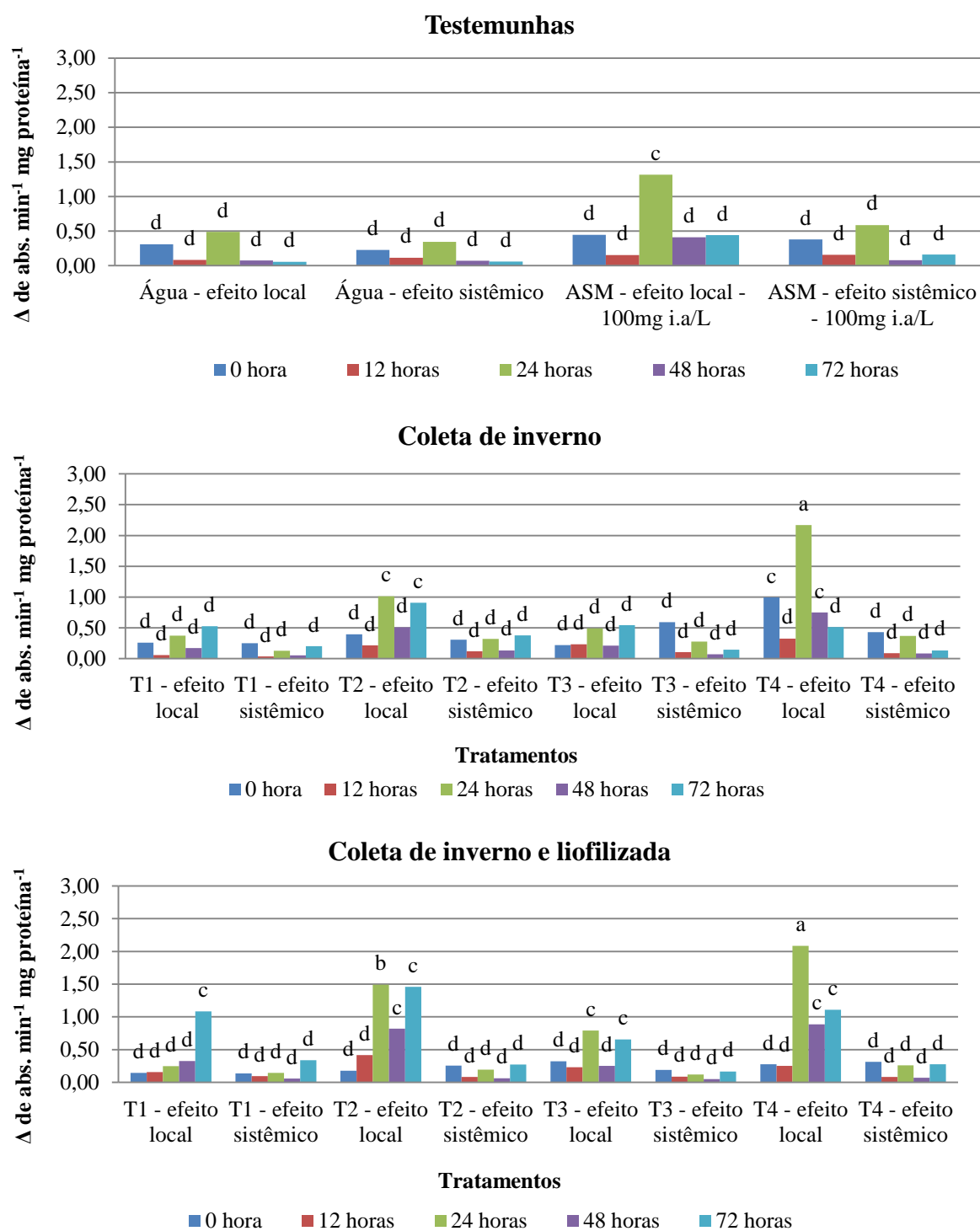
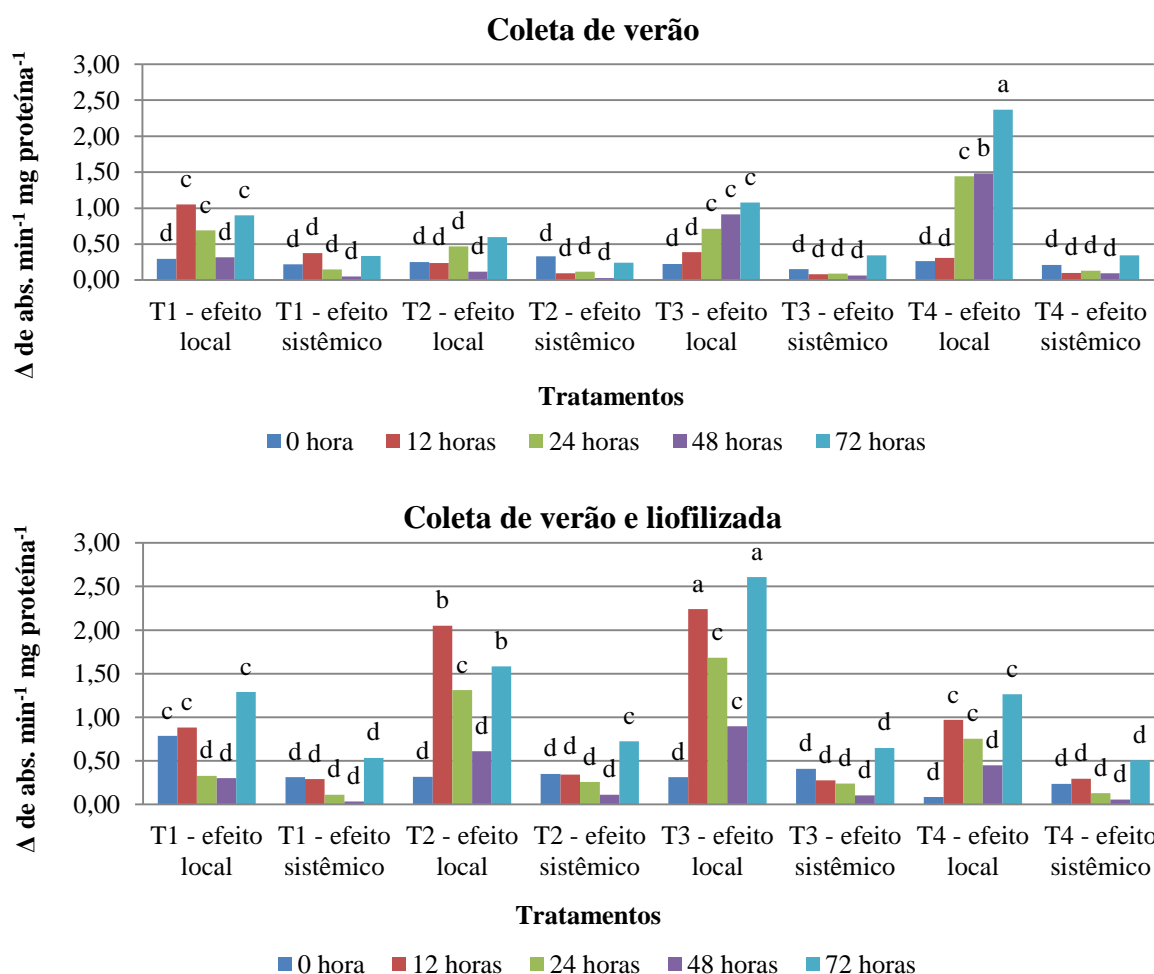


Figura 8: Atividade de peroxidase em folhas tratadas e não tratadas de soja em diferentes períodos de coleta (0, 12, 24, 48 e 72 horas), após a aplicação do extrato bruto etanólico de capim-limão (EBE) colhido em duas estações do ano (verão e inverno), nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 mg.L⁻¹. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. T1= EBE a 50 mg; T2= EBE a 100 mg; T3= EBE a 200 mg; T4= EBE a 400 mg. C.V.: 18,85%.



Continuação figura 8: Atividade de peroxidase em folhas tratadas e não tratadas de soja em diferentes períodos de coleta (0, 12, 24, 48 e 72 horas), após a aplicação do extrato bruto etanólico de capim-limão (EBE) colhido em duas estações do ano (verão e inverno), nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 mg.L⁻¹. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. T1= EBE a 50 mg; T2= EBE a 100 mg; T3= EBE a 200 mg; T4= EBE a 400 mg. C.V.: 18,85%.

4.5.3. Atividade de fenilalanina amônia liase

As análises estatísticas revelaram que não houve diferença significativa para a atividade de FAL (fenilalanina amônia liase) em cotilédones de soja, indicando que não houve diferenças entre os extratos de capim-limão dentro do intervalo de doses estudado (Figura 9).

Embora não tenha ocorrido diferença significativa nos resultados de FAL, possivelmente o tempo requerido para incremento observável da atividade seja maior. A proteção induzida depende do intervalo de tempo após o tratamento, envolvendo mudanças específicas no metabolismo da planta com a síntese e/ou acúmulo de moléculas características do fenômeno de resistência induzida (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

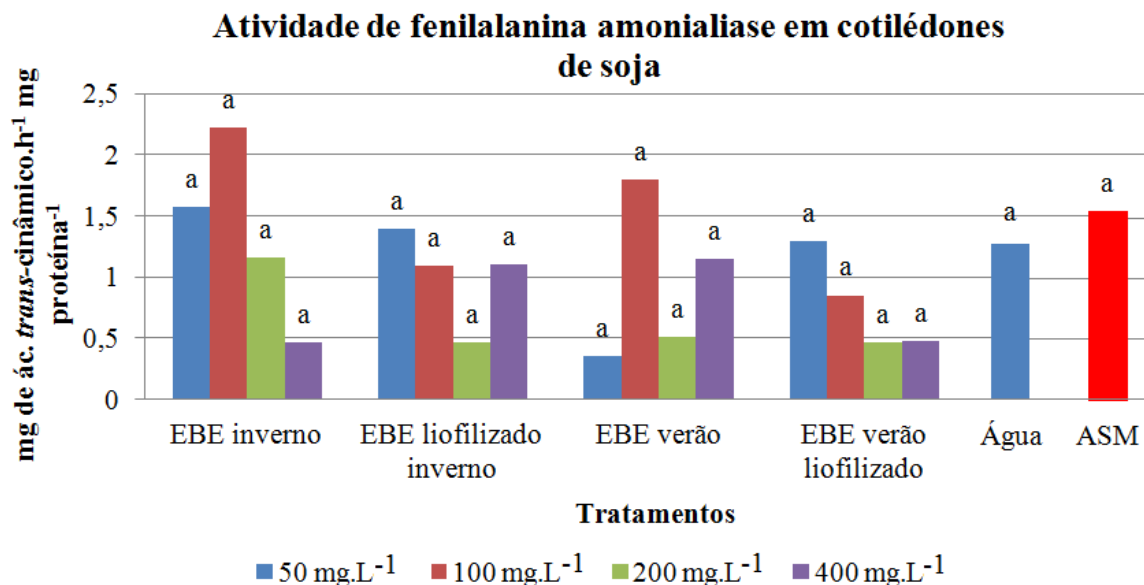


Figura 9: Atividade de fenilalanina amonialiase em cotilédones de soja após aplicação de diferentes concentrações (50, 100, 200 e 400 mg.L⁻¹) de extrato bruto etanólico (EBE) de *Cymbopogon citratus* colhido em duas estações do ano (verão e inverno). Teste de média a 5% de significância pelo teste F. ASM a 100 mg i.a L⁻¹. C.V. (%): 46,53.

Em folhas, nenhum tratamento foi superior às testemunhas água e ASM em relação à atividade de fenilalanina amonialiase (Figura 10). Os dados revelaram médias inferiores a da testemunha negativa, sugerindo que, nos extratos, pode haver inibidores dessa enzima. No entanto, um aumento da atividade de FAL foi observado entre 0 e 12 horas da aplicação dos tratamentos, independente da dose utilizada, seguido de queda de atividade no período da última coleta (72 horas).

A liofilização e aumento da concentração dos extratos não apresentaram diferença estatística observável como pode se comprovar na Figura 10.

O declínio inicial da atividade enzimática, possivelmente devido ao redirecionamento de metabólitos para outros processos fisiológicos, como para a defesa, é denominado de fase de alarme, conforme proposto por Larcher (2004). A queda da atividade enzimática inicial deve-se ao prevaletimento dos processos catabólicos. Nesse sentido, o declínio inicial observado para a atividade das enzimas analisadas pode estar relacionado ao redirecionamento de toda a maquinaria enzimática responsável pelos mecanismos de defesa. Esse mecanismo visa balancear o metabolismo total e equilibrar os custos dentro da planta, maximizando os recursos celulares.

O aumento posterior da atividade não atingiu os valores observados no tempo inicial, sendo o fenômeno considerado como restituição incompleta, de acordo com Larcher (2004). Entretanto, considerando que as vias metabólicas relativas aos compostos fenólicos dependem de vários fatores e envolvem várias enzimas, poucas informações precisas podem ser obtidas nesse sentido.

No patossistema tomate x *A. solani*, o extrato de *Quercus infectoria* a 0,5%, quando aplicado 72 horas antes da inoculação, as enzimas peroxidase e FAL tiveram seu máximo aumento 48 horas após o tratamento. Já os aumentos das atividades de β -1,3 glucanase e quitinase ocorreram a partir de 72 horas após o tratamento (YAMUNARANI *et al.*, 2004).

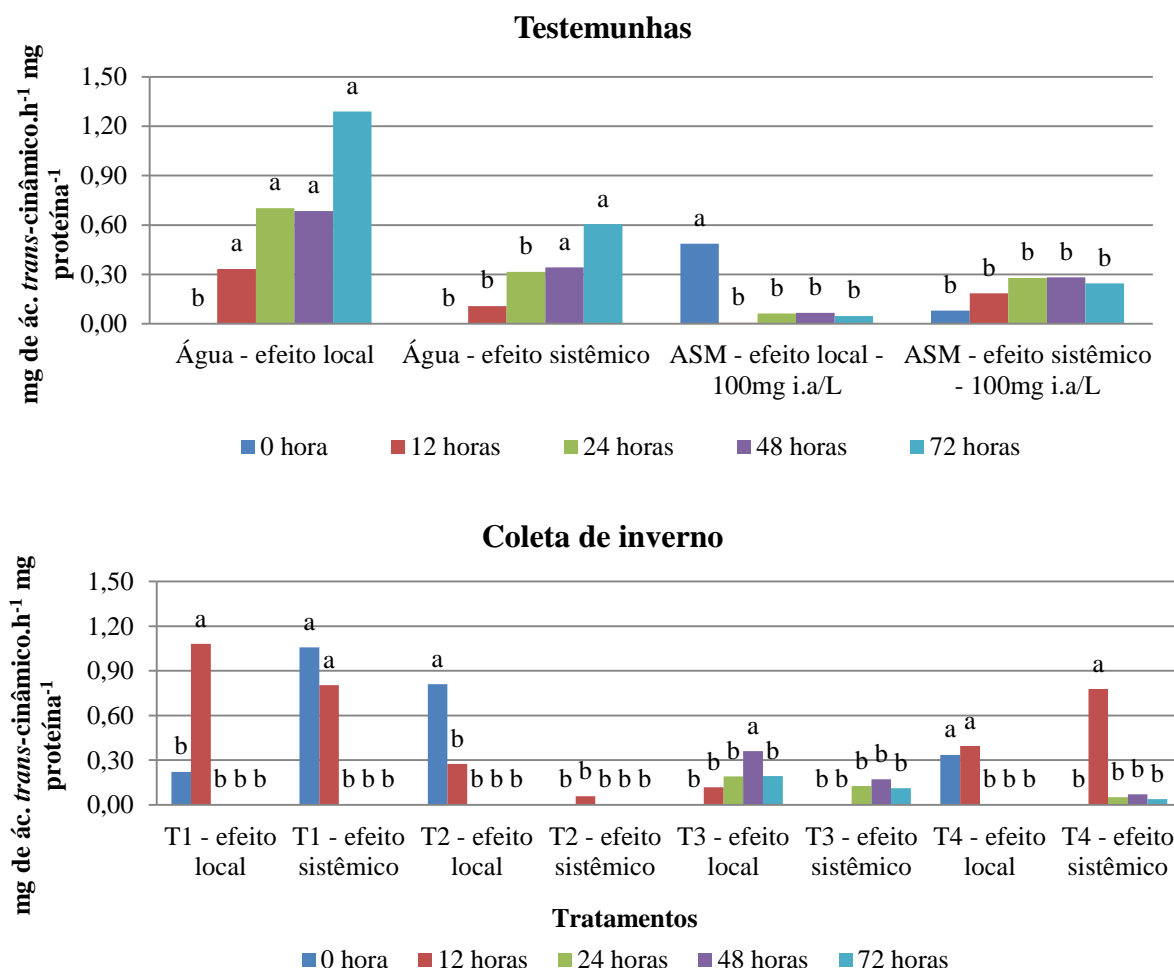
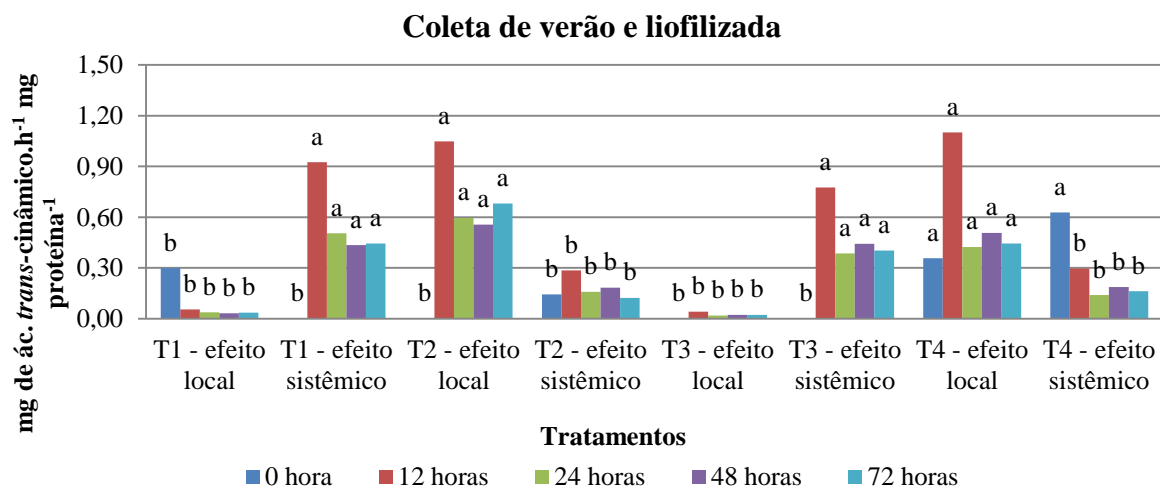
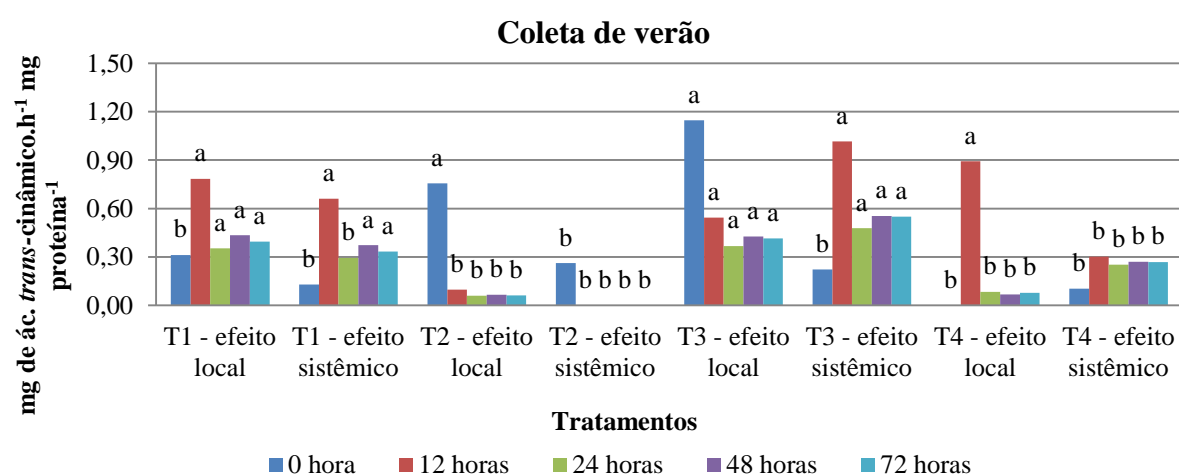
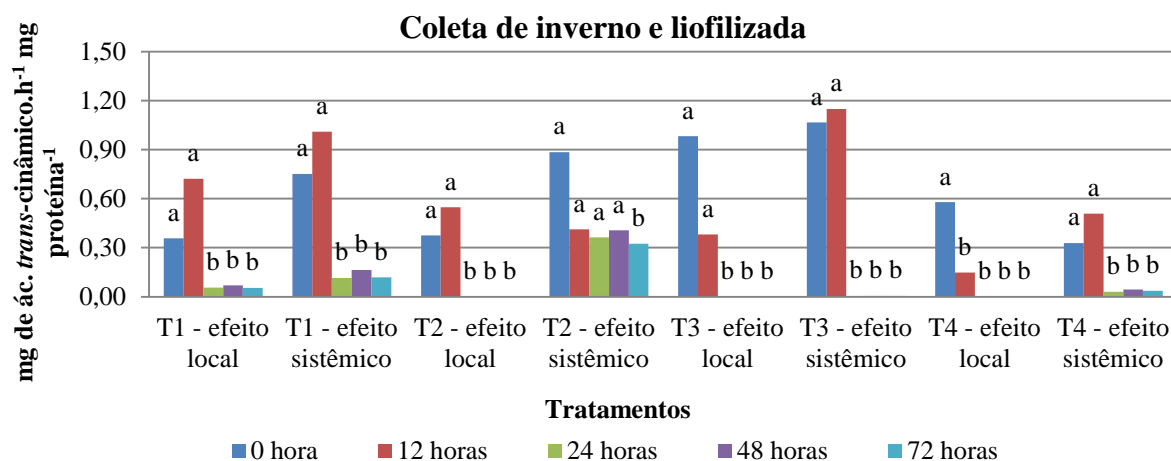


Figura 10: Atividade de fenilalanina amônia liase em folhas tratadas e não tratadas de soja em diferentes períodos de coleta (0, 12, 24, 48 e 72 horas), após a aplicação do extrato bruto etanólico de capim-limão (EBE) colhido em duas estações do ano (verão e inverno), nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 mg.L⁻¹. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. T1= EBE a 50 mg; T2= EBE a 100 mg; T3= EBE a 200 mg; T4= EBE a 400 mg. C.V.: 25,37%.



Continuação figura 10: Atividade de fenilalanina amônia liase em folhas tratadas e não tratadas de soja em diferentes períodos de coleta (0, 12, 24, 48 e 72 horas), após a aplicação do extrato bruto etanólico de capim-limão (EBE) colhido em duas estações do ano (verão e inverno), nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 mg.L⁻¹. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. T1= EBE a 50 mg; T2= EBE a 100 mg; T3= EBE a 200 mg; T=4 EBE a 400 mg. C.V.: 25,37%.

4.5.4. Atividade de quitinase

A atividade enzimática de quitinases em cotilédones de soja foi aumentada somente com o uso do extrato bruto de material de inverno, quando comparada com os efeitos da testemunha água (Figura 11). O extrato de maior atividade, o EBE a 100 mg.L⁻¹ de inverno, igualou-se a testemunha ASM, e foi duas vezes superior à testemunha água. O fator concentração dos tratamentos, nas interações da análise estatística, mostrou pouca influência para a atividade enzimática de quitinases, indicando que a resposta independe da dose utilizada. No entanto, com a liofilização do EBE de inverno, a atividade de quitinase foi afetada negativamente, fazendo com que o EBE se igualasse aos demais tratamentos.

Os dados sugerem que os compostos elicitores de quitinases inerentes à constituição genética de capim-limão variaram conforme a época de colheita. A expressão diferencial de elicitores deve-se à fisiologia constitutiva da planta de capim-limão colhido em diferentes épocas do ano.

O aumento da atividade de quitinase, semelhante ao encontrado no experimento, também foi observado e estudado por Cavalcanti *et al.* (2006) em plantas de tomateiro pulverizadas com MCp (derivados de quitosana da parede de *Crinipellis pernicioso*), Ecolife, ASM e VLA (eliciadores heterogêneos, a partir da fragmentação do caule de *Solanum lycocarpum* infectado por *C. pernicioso*) sem inoculação de patógeno. O aumento significativo na atividade permaneceu constante até 48 horas após aplicação dos tratamentos. Os autores mencionados sugeriram que as atividades incrementadas de quitinases, promovidas pelos eliciadores testados, aconteceram principalmente às primeiras horas após as pulverizações, sustentando-se a partir de três dias após a aplicação.

Extratos de *Ocimum gratissimum* em soja apresentaram efeito semelhante ao extrato de capim-limão utilizado no presente experimento (COLPAS *et al.*, 2009). Resposta sistêmica em pepino contra *C. lagenarium*, uma vez que as segundas folhas verdadeiras tiveram um número menor de lesões, quando as primeiras folhas eram tratadas três dias antes da inoculação. A atividade de quitinase nas segundas folhas foi significativamente afetada pelos tempos de análise após a aplicação e pela concentração do produto aplicado, com máximo de produção com extrato a 25%, um dia antes da inoculação.

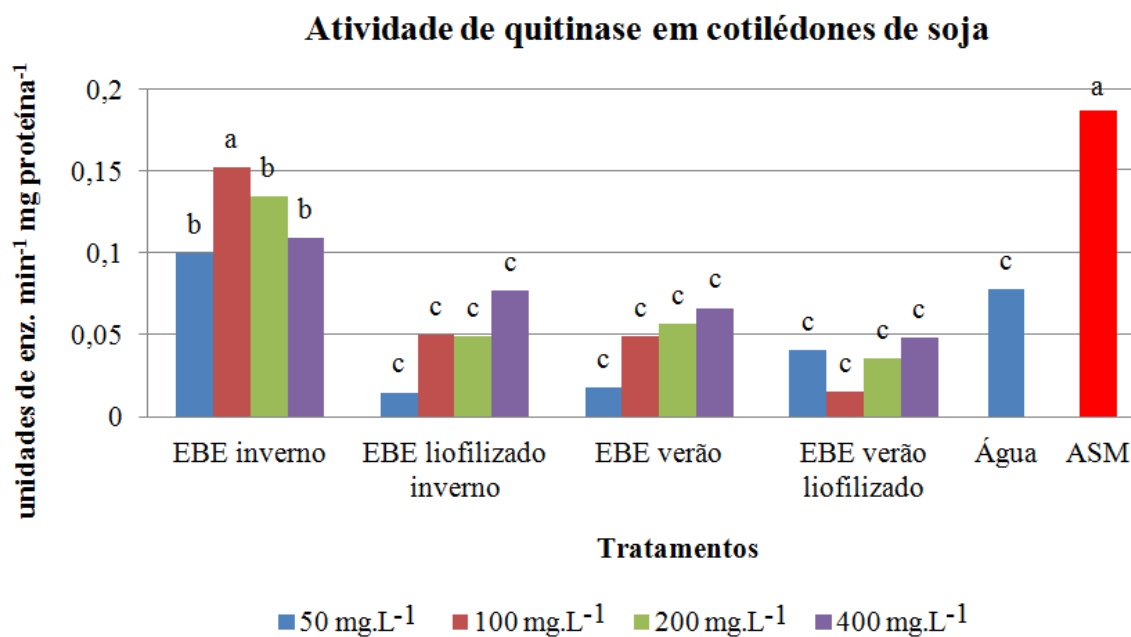


Figura 11: Atividade de quitinase em cotilédones de soja após aplicação de diferentes concentrações (50, 100, 200 e 400 mg.L⁻¹) de extrato bruto etanólico (EBE) de *Cymbopogon citratus* colhido em duas estações do ano (verão e inverno). Teste de média a 5% de significância pelo teste F. ASM a 100 mg i.a L⁻¹. C.V. (%): 3,36.

Resultados diferentes dos encontrados no experimento para quitinase também sugerem que muitas plantas medicinais podem não conter compostos elicitores da enzima. Franzener (2011) verificou os efeitos do extrato aquoso (EA) de eucalipto na atividade da enzima quitinase, e constatou que nenhum dos tratamentos aumentou significativamente a atividade enzimática, tanto em cotilédones de pepino quanto em folhas de feijoeiro.

4.5.5. Atividade de polifenoloxidase

O aumento da atividade de polifenoloxidases somente foi constatado com o uso do EBE de inverno. O maior efeito observado foi sistêmico, diferindo estatisticamente do efeito local e dos demais tratamentos, inclusive das testemunhas (Figura 12). O efeito variou em decorrência do tempo após a aplicação dos tratamentos, cujo aumento foi observado somente após 24 horas e seguido de uma queda após 48 horas da aplicação do extrato. Em relação à liofilização dos EBEs, pode ser observado que não houve influência na eficácia dos extratos, assim como do aumento da concentração.

Semelhanças aos resultados obtidos foram observadas em Vigo *et al.* (2009), que verificaram maior produção de polifenoloxidases para as plantas de feijão vagem quando

tratadas com tinturas de *Lippia alba*, *Lippia sidoides*, *Mikania glomerata*, *Equisetum* sp. e *Hedera helix*. O pico de produção ocorreu somente aos oito dias após a aplicação dos tratamentos.

O perfil de atividade da polifenoloxidase do melhor tratamento variou em função do tempo. A mudança de atividade em resposta ao tempo deve-se ao redirecionamento de metabólitos para outros processos fisiológicos, como para a defesa, e denominado de fase de alarme (LARCHER, 2004). A queda da atividade enzimática, observada posteriormente ao período de maior atividade, ocorre devido ao prevaecimento dos processos catabólicos. O declínio observado está relacionado ao redirecionamento de toda a maquinária enzimática responsável pelos mecanismos de defesa. Esse mecanismo visa balancear o metabolismo total e equilibrar os custos dentro da planta, maximizando os recursos celulares.

O aumento da atividade enzimática verificado deve-se ao predomínio de processos anabólicos e formação de isoformas mais ativas das enzimas formadas naquela determinada condição. O fato estaria ligado não somente a um fator qualitativo, mas também a quantidade de enzimas produzidas em resposta ao eliciador (LARCHER, 2004).

O tempo de acessibilidade para a atividade observável do indutor levou, em média, o equivalente ao proposto por Kunoh (2008). Variações dos períodos de resposta dependem de cada indutor. Contudo, o tempo de reação é superior a 18 horas e que demora 14 horas para que o estado de acessibilidade de uma única célula hospedeira induzida por infecção de patógeno seja transferido para as células adjacentes (KUNOH, 2008). Aproximadamente 25 horas é o período para que a inacessibilidade do ataque de um não patógeno seja compartilhada para células adjacentes.

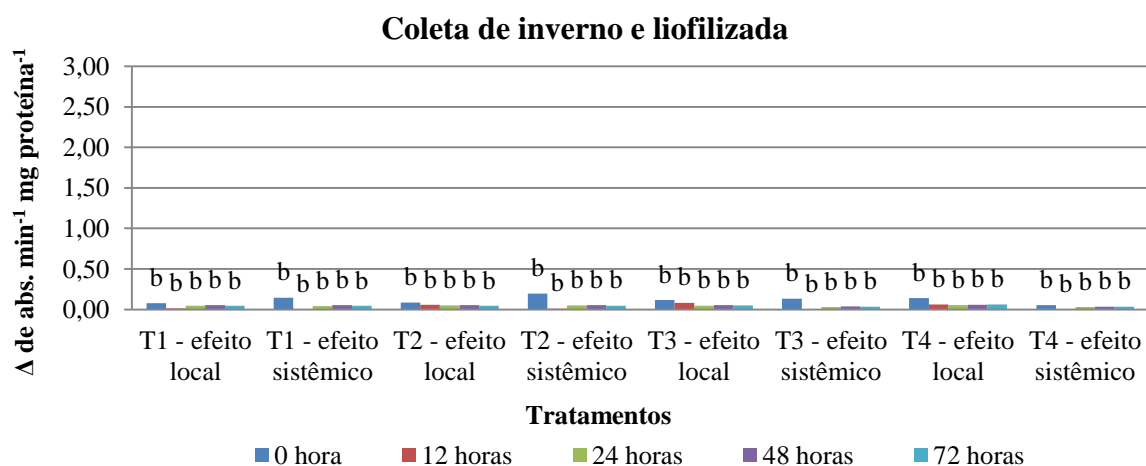
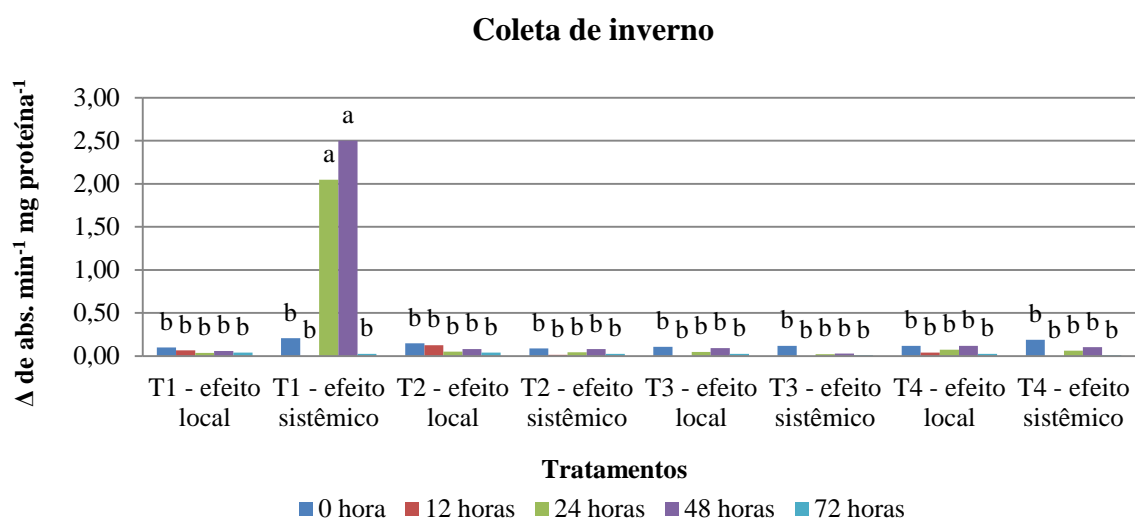
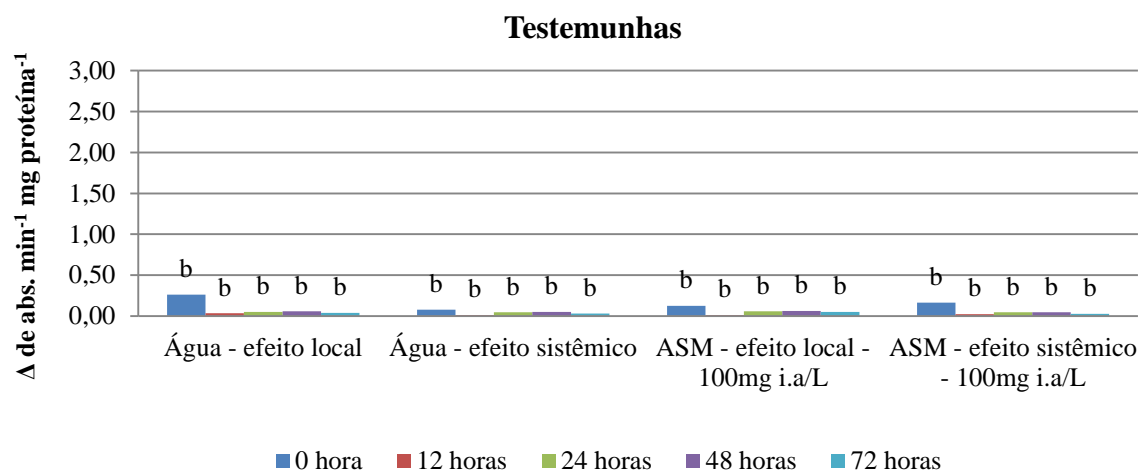
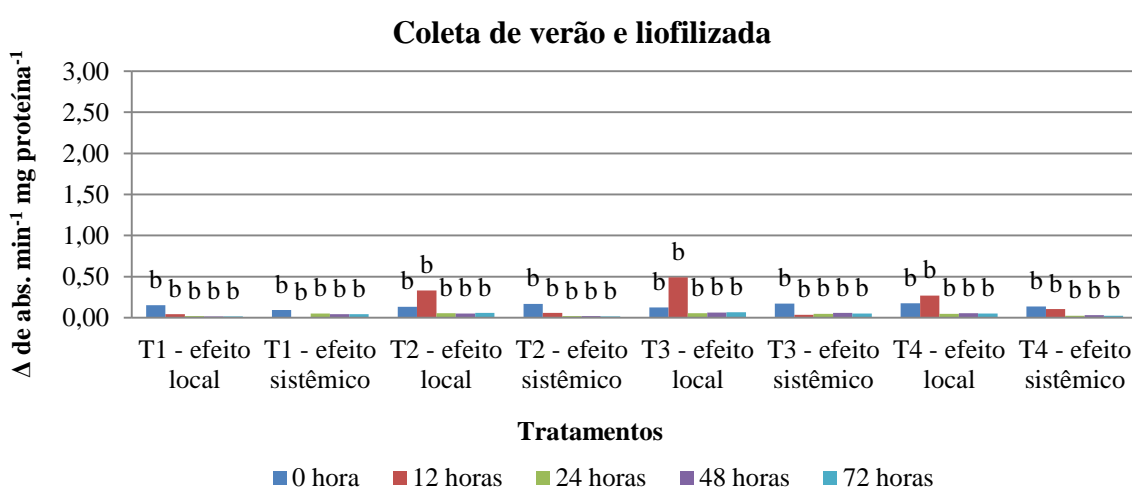
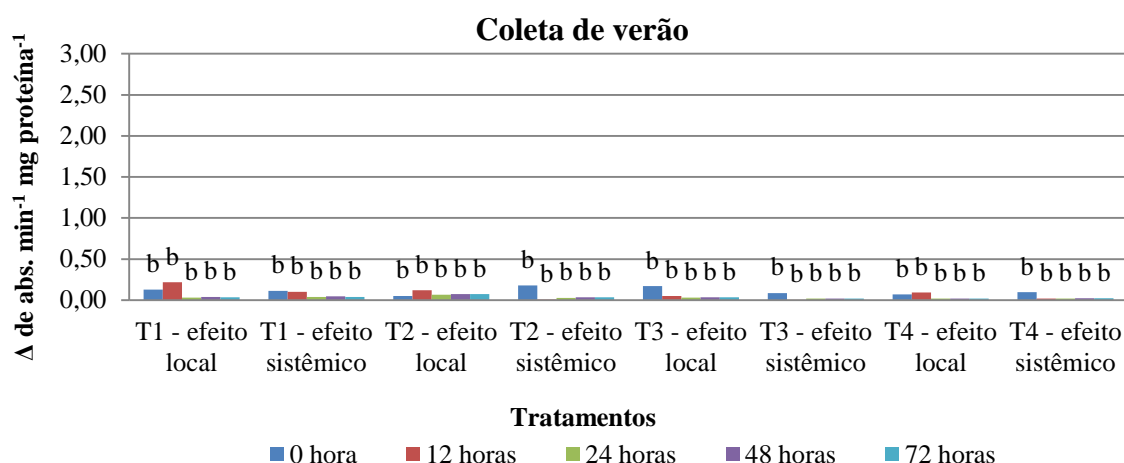


Figura 12: Atividade de polifenoloxidase em folhas tratadas e não tratadas de soja em diferentes períodos de coleta (0, 12, 24, 48 e 72 horas), após a aplicação do extrato bruto etanólico de capim-limão (EBE) colhido em duas estações do ano (verão e inverno), nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 mg.L⁻¹. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. T1= EBE a 50 mg; T2= EBE a 100 mg; T3= EBE a 200 mg; T4= EBE a 400 mg. C.V.: 16,84%.



Continuação figura 12: Atividade de polifenoloxidase em folhas tratadas e não tratadas de soja em diferentes períodos de coleta (0, 12, 24, 48 e 72 horas), após a aplicação do extrato bruto etanólico de capim-limão (EBE) colhido em duas estações do ano (verão e inverno), nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 mg.L⁻¹. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. T1= EBE a 50 mg; T2= EBE a 100 mg; T3= EBE a 200 mg; T4= EBE a 400 mg. C.V.: 16,84%.

4.6. Cromatografia de troca iônica (CTI)

A cromatografia de troca iônica, utilizando o trocador aniônico de DEAE celulose, possibilitou a obtenção de seis picos proteicos e dois glicídicos, quando frações sequenciais com caracteres espectrofotométricos semelhantes foram reunidas (Figura 13). O produto da CTI para carboidratos apresentou vários picos de pequena magnitude. No entanto, o maior pico glicídico coincidiu com o primeiro pico proteico, sendo necessário, portanto, avaliá-los concomitantemente. Os picos proteicos coincidentes com picos de açúcares redutores possivelmente são glicoproteínas. A utilização da cromatografia de filtração em gel (CFG)

não foi eficiente na separação de compostos provenientes das frações da CTI que apresentaram alguma atividade sobre cotilédones de soja.

O primeiro pico proteico correspondeu ao material não adsorvido pela resina. Sendo a DEAE celulose um trocador aniônico, ficam retidas, inicialmente, somente moléculas de carga líquida negativa para as condições do tampão Tris HCl a 10 mM, pH 8,0 e temperatura média de 24°C. O pico I, portanto, é constituído de moléculas de carga líquida positiva ou neutra.

Devido a sobreposições de picos, observou-se que há deformações nas curvas cromatográficas. Isso porque, na amostra, a partir de extrato bruto vegetal, há inúmeras moléculas presentes, de vários grupos químicos e propriedades diversas nas condições da CTI, sendo esse método apenas o ponto inicial para estudo de pontos de interesse.

A fração 2 da CTI, que apresentou atividade biológica nas análises bioquímicas, e a fração 1 (incluída nas análises devido a maior concentração de carboidratos), foram submetidas à cromatografia de exclusão para verificar se algum inibidor estava presente (Figura 14). As demais frações não apresentaram atividade ou os picos foram pouco distintos na CE.

A CE para o pico 1 da CTI, constituído de moléculas de carga líquida positiva ou neutra, apresentou dois outros picos distintos para proteínas, e algumas pequenas variações de baixa magnitude (Figura 14). O segundo pico obtido da CE (2G) coincidiu com o pico glicídico.

A cromatografia de exclusão para o pico 2 da CTI, constituído de moléculas de carga líquida negativa, apresentou um pico para proteínas, com algumas pequenas variações de baixa magnitude (Figura 15). Dois picos de açúcares redutores também foram obtidos, sendo que o primeiro deles coincidiu com o pico proteico 3G. Devido à coincidência de frações iniciais para formar a fração maior, a reunião dessas foi utilizada nos experimentos de indução de mecanismos de resistência em cotilédones (Figura 15).

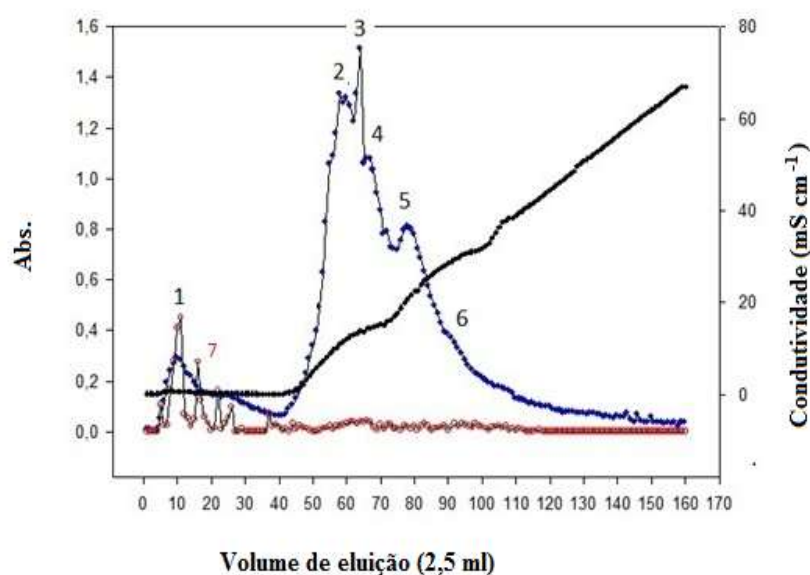


Figura 13: Cromatografia de troca iônica extrato bruto etanólico de *Cymbopogon citratus*. Uma amostra de 3 mL foi aplicada em resina DEAE Celulose, equilibrada em tampão Tris -HCl, 10 mM, pH 8,0. O material adsorvido foi eluído por concentração de NaCl em “step wise” (0M, 0,125M, 0,25M, 0,5M e 1M). Frações de 5 mL foram coletadas. (♦) Leitura de proteínas a 285 nm. (○) Leitura de carboidratos a 410 nm pelo método de Lever. Concentrações de NaCl medidas indiretamente por condutividade (●). 1, 2, 3, 4, 5 e 6 indicam os picos proteicos; 7 indica picos glicídicos reunidos.

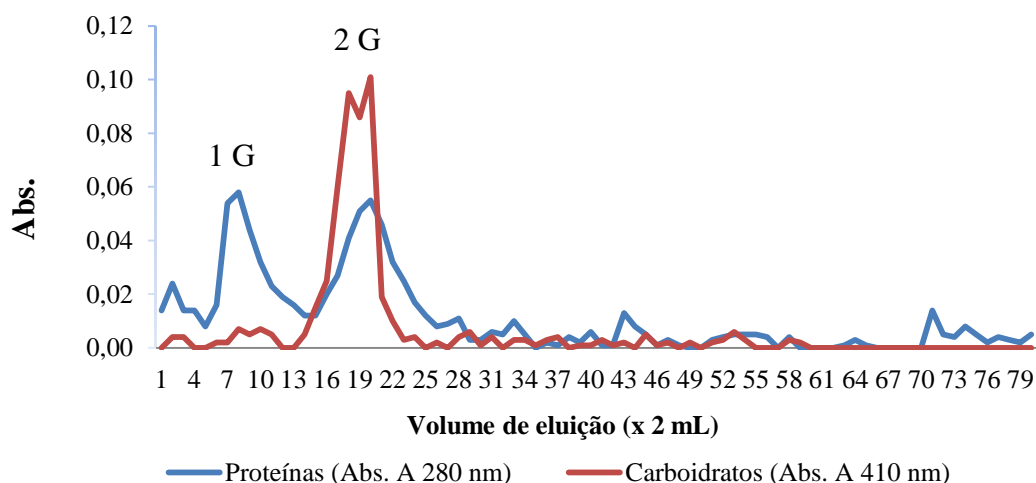


Figura 14: Perfil proteico (lido indiretamente a 280 nm de absorvância) e glicídico (lido indiretamente a 410 nm de absorvância) obtido por cromatografia de exclusão a partir da fração 1 da cromatografia de troca iônica. 1G = pico proteico. 2G = pico glicídico (coincidente com pico proteico).

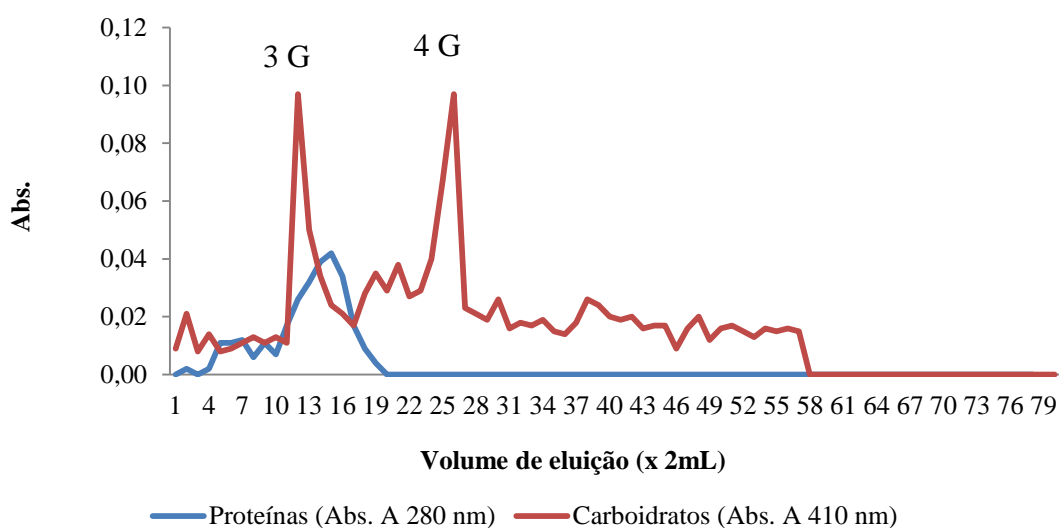


Figura 15: Perfil proteico (lido indiretamente a 280 nm de absorvância) e glicídico (lido indiretamente a 410 nm de absorvância) obtido por cromatografia de exclusão a partir da fração 2 da cromatografia de troca iônica. 3G = pico glicoproteico. 4G = pico glicídico.

4.7. Produção de gliceolina e atividades enzimáticas induzidas pelas frações da CTI e CE

Um estudo prévio comparou o efeito de água destilada e do tampão utilizado na CTI na indução de gliceolina e de enzimas relacionadas à defesa em cotilédones de soja (dados não mostrados). As análises mostraram que não houve diferença estatística significativa entre o tampão e água destilada.

Em relação às atividades de polifenoloxidasas e peroxidase de guaiacol, nenhum dos tratamentos foi capaz de promover uma resposta estatisticamente superior às testemunhas tampão e ASM, para ambas as enzimas (Tabela 2).

Os dados obtidos do experimento, com as frações das cromatografias, sugeriram que elicitores no EBE capazes de induzir respostas importantes de defesa não foram observados após o processo de separação cromatográfica. Resultado semelhante foi encontrado por Bonaldo (2005), que apontou em seu trabalho que, no preparado não purificado de *S. cerevisiae*, respostas como a HR e a explosão oxidativa não foram observadas após a cromatografia, além da ausência da atividade enzimática, não sendo possível o estabelecimento da resistência induzida.

Tabela 2: Peso molecular das frações obtidas da cromatografia de exclusão (kDa), teores de proteínas e de açúcares redutores ($\mu\text{g.mL}^{-1}$), atividade específica de enzimas relacionadas à defesa em cotilédones de soja, e acúmulo de gliceolina

Tratamento	Peso molecular	Proteínas	Açúcares redutores	Gliceolina	Peroxidase	Polifenoloxidase	FAL	β -1,3-glucanase
	kDa	$\mu\text{g.mL}^{-1}$	$\mu\text{g.mL}^{-1}$	Absorbância a 285 nm	Δ de abs. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$	Δ de abs. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$	mg de ácido <i>trans</i> -cinâmico. $\text{h}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$	mg glicose $\text{h}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$
Tampão	-	-	-	0,09 b	6,04 ^{ns}	1,42 ^{ns}	0,11 c	0,17 b
ASM	-	-	-	0,10 b	6,12 ^{ns}	1,40 ^{ns}	1,20 b	0,12 b
EBE a 0,1 g.ml ⁻¹	-	3179,24	3161,7	0,30 a	5,65 ^{ns}	2,03 ^{ns}	2,55 a	0,47 a
Fração 1 da CTI	-	274,36	1030,2	0,10 b	7,02 ^{ns}	1,92 ^{ns}	1,05 b	0,15 b
Fração 2 da CTI	-	484,70	276,7	0,35 a	6,59 ^{ns}	2,07 ^{ns}	2,03 a	0,67 a
Fração 1G da CE	235,73	4,83	16,2	0,11 b	6,77 ^{ns}	2,43 ^{ns}	0,15 c	0,18 b
Fração 2G da CE	16,85	5,53	188,7	0,14 b	6,67 ^{ns}	2,40 ^{ns}	0,57 c	0,14 b
Fração 3G da CE	50,59	4,96	76,7	0,12 b	6,38 ^{ns}	2,12 ^{ns}	0,42 c	0,16 b
Fração 4G da CE	4,504	0,35	111,2	0,12 b	7,80 ^{ns}	2,28 ^{ns}	1,43 b	0,17 b
C.V. (%)				19	11,38	20,44	37,22	28,12

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Scott-Knot a 5% de probabilidade. (Ns) Não significativo pelo teste de Scott-Knot a 5% de probabilidade. EBE: extrato bruto etanólico; Tampão: tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 8,0. CTI: cromatografia de troca iônica. CE: cromatografia de exclusão.

Somente os tratamentos referentes ao extrato bruto de folhas frescas na concentração de 0,1 g.mL⁻¹ e a fração número 2 foram capazes de aumentar a produção de gliceolina, de β-1,3-glucanases e de fenilalanina amônia liase, sendo estatisticamente superiores às testemunhas (Tabela 2). No entanto, para a atividade de FAL, as frações 1, 5 e 6, além da fração 4G da cromatografia de exclusão, mostraram efeito de incremento de atividade enzimática estatisticamente superiores à resposta promovida pelo tampão, mas iguais ao ASM. No entanto, quando submetidas à CFG, não apresentaram picos distintos (Dados não mostrados). A atividade enzimática equivalente a da testemunha negativa foi relacionada à baixa eficiência do fracionamento por CE empregando tampão Tris-HCl. Nenhuma fração da CE teve efeito igual a da fração 2 da CTI, levando a acreditar que fosse necessária a atuação conjunta de moléculas para uma defesa eficiente. Essa afirmação explicaria porquê os fracionamentos das frações da CTI e do extrato não atuem na mesma intensidade.

Franzener (2011) também observou que a cromatografia de filtração em gel (CFG) do extrato aquoso de eucalipto não foi eficiente na separação de compostos provenientes das frações da CTI com atividade sobre feijoeiro. Sugeriu que a atividade da fração de maior resposta da CTI foi resultado da atividade conjunta dos picos obtidos na CFG, que demonstraram atividades individuais praticamente nulas.

Para o presente trabalho, os dados também sugeriram que a diluição, durante a cromatografia de exclusão, ocasionou a perda de eficiência dos tratamentos, embora autores tenham observado que tratamentos muito diluídos ainda apresentaram atividade elicitora de fitoalexinas (BONALDO, 2005). Bonaldo (2005) verificou que preparações de *S. cerevisiae* diluídas 10.000 vezes estimularam o acúmulo de fitoalexinas. HAHN *et al.* (1992) constataram que concentrações de 15 e 100 ng de *S. cerevisiae* foram suficientes para o acúmulo de gliceolina em cotilédones e hipocótilos de soja.

A baixa atividade observada para a indução de algumas frações também pode estar relacionada ao agrupamento de moléculas supressoras de atividade. Trabalhando com cromatografia de troca iônica para elicitores de levedura, Wulff (1997) verificou que, além da presença de um elicitor de síntese de fitoalexinas em sorgo, havia também uma fração capaz de suprimir completamente a síntese de fitoalexinas.

Di Piero (2003) obteve resultados semelhantes quando verificou que moléculas obtidas a partir da autoclavagem de *Saccharomyces cerevisiae* e fortemente ligadas ao trocador aniônico DEAE-Celulose apresentaram maior atividade sobre fitoalexinas em sorgo em relação às mais fracamente ligadas.

Semelhantemente ao que foi observado no presente trabalho, para a atividade da enzima FAL, Iurkiv (2009) verificou que mais de uma fração aumentou a atividade enzimática dessa enzima em β -1,3-glucanases em cotilédones tratados. Observou que o extrato bruto de *Picnopus sanguineus* sob CFG proporcionou efeito superior para o tratamento pico proteico V, não diferindo estatisticamente apenas do pico proteico III. Os demais tratamentos mostraram efeitos semelhantes à testemunha água. No entanto, após separação por sulfato de amônio, não foi observada diferença estatística entre os tratamentos. Comparando as médias e o menor desempenho dessa fração, sugeriu que há indutores e inibidores de β -1,3-glucanases no EB de *P. sanguineus* e que houve eficiência da precipitação com sulfato de amônio na purificação parcial destas frações.

A importância da atuação conjunta de algumas moléculas explicaria o fato de que produtos à base de uma única molécula como princípio ativo, como o ASM, e a separação do extrato em frações, não permitiram a ativação de todas as enzimas. Cada rota ou via pode ser ativada separadamente por elicitores específicos, sendo que cada uma induziria a expressão de um conjunto específico de genes. Considerando a complexidade fisiológica e bioquímica da planta em resposta aos diferentes indutores de defesa, sugeriu-se que foi necessária uma atuação sinérgica dos componentes do extrato para a ativação, supressão ou aumento de atividade de outra enzima no complexo bioquímico da soja.

5. CONCLUSÕES

O capim-limão possui moléculas que podem ser extraídas por trituração em álcool e capazes de ativar diferentes mecanismos de defesa em plantas de soja, porém, esses elicitores variam em função da estação de coleta.

Para a atividade enzimática de cotilédones, extratos obtidos de material de verão foram superiores para a atividade de B-1,3-glucanase e peroxidase, enquanto material de inverno foi mais eficiente para aumentar a atividade de quitinase e a produção de gliceolina. A atividade de FAL foi independente da estação de coleta. A produção de gliceolina induzida em cotilédones pelo extrato etanólico de capim-limão foi dose-dependente.

Para a atividade enzimática de folhas, extratos obtidos de material de inverno foram superiores para a atividade de polifenoloxidase. A atividade das demais enzimas foi indiferente à estação de coleta do capim-limão. O aumento da atividade para todas as enzimas foliares foi dependente do tempo de coleta, principalmente a partir de 24 horas da aplicação dos tratamentos.

O extrato etanólico de capim-limão diminuiu a taxa de crescimento micelial de *Colletotrichum truncatum* e aumentou o crescimento micelial de *Corynespora cassicola*.

Pelo perfil cromatográfico dos extratos de capim-limão infere-se que há elicitores proteicos ou glicoproteicos, obtidos a partir da cromatografia de troca iônica, que são promissores para ativar mecanismos de defesa em soja.

O fracionamento sequencial do elicitor influenciou na produção de fitoalexinas e na atividade enzimática, sugerindo que há a necessidade de um conjunto de moléculas para respostas de defesa.

6. REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. San Diego: Academic Press, 1997, p.635
- ALMEIDA, A. M. R. *et al.* Doenças da soja. In: KIMATI *et al.* (Eds.). **Manual de Fitopatologia**, v.2, 3ª ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997, p.642-664.
- ALVES, M. C. S.; FILHO, S. M.; INNECCO, R. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alfaca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 2004, v.39, n.11, p.1083-1086.
- ASAOLU, M. F.; OYEYEMI, O. A.; OLANLOKUN, J. O. Chemical compositions, phytochemical constituents and in vitro biological activity of various extracts of *Cymbopogon citratus*. **Pakistan journal of nutrition**. 2009, v.8, p.1920-1922.
- AYERS, A. R. *et al.* Hostpathogen interactions. IX. Quantitative assays of elicitor activity and characterization of the elicitor present in the extracellular medium of cultures of *Phytophthora megasperma var. sojae*. **Plant Physiology**, 1976, v.57, p.751-759.
- BARGUIL, B. M. *et al.* Effect of Extracts from Citric Biomass, Rusted Coffee Leaves and Coffee Berry Husks on *Phoma costarricensis* of Coffee Plants. **Fitopatologia brasileira**. 2005, v.30.
- BASTOS, C. N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipelis* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, 1997, v.22, n.3, p.441-443.
- BERTRAND, J. P.; LAURENT, C.; LECLERCQ, V. **O mundo da soja**. São Paulo, Hucitec, Editora da Universidade de São Paulo, 1987.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas**. Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna, São Paulo, Brasil, 2009
- BLANK, A. F. *et al.* Influence of season, harvest time and drying on Java citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) volatile oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 2007, v. 17, n.4, p.557-564.
- BONALDO, S. M.; PASCHOLATI, S. F.; ROMEIRO, R. S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L.S. *et al.* **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos**. 264 p. Piracicaba: FEALQ, 2005, p. 11-28.
- BONALDO, S. M. **Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na síntese de fitoalexinas em sorgo, na germinação e formação de apressórios por fungos fitopatogênicos e na proteção de pepino a *Colletotrichum lagenarium* e sorgo a *Colletotrichum sublineolum***. 150 p. Tese (Doutorado em Agronomia). ESALQ – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2005.
- BONALDO, S. M. *et al.* Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium* pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia brasileira**, 2004, v.29, p.128-134.

BOSTOCK, R. M. Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit. **Annual Review of Phytopathology**. 2005, v.43, p.545-580.

BOSTOCK, R. M. Signal conflicts and synergies in induced resistance to multiple attackers. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. 1999, v.55, p.99-109.

BOTREL, P. R. *et al.* Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marruboides* Epl., Lamiaceae em função da sazonalidade. **Acta Scientiarum Agronomy**. Maringá, 2010, v. 32, n. 3, p. 533-538.

BRADFORD, M. A. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 1976, v.72, p.248-254,.

BRAGA, M. R. Fitoalexinas. *In*: PASCHOLATI, S. F. *et al.* **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e molecular**. 627 p. Piracicaba, FEALQ. P. 305-346, 2008.

BRAND, S. C. *et al.* Extratos de alho e alecrim na indução de faseolina em feijoeiro e fungitoxicidade sobre *Colletotrichum lindemuthianum*. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.40, n.9, p.1881-1887, 2010.

BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. *In*: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & molecular biology of plants**. 1367 p. I. K. International Private Limited, Nova Delhi, Índia, p.1158-1203, 2000.

CABI DATABASE, baseada na 10ª Ed. Dictionary of the Fungi. Disponível em: <http://www.speciesfungorum.org/Names/fundic.asp?RecordID=Corynesporascaceae&Type=F> acesso em 15 de março de 2013.

CAMATTI-SARTORI, V. *et al.* Avaliação *in vitro* de extratos vegetais para o controle de fungos patogênicos de flores. **Revista Brasileira de Agroecologia**. 2011, v.6, p.117-122.

CAMPOS, A. D. *et al.* Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 2004, v.39, n.7, p.637-643.

CARNEIRO, C. E. A.; ROLIM, H. M. V.; FERNANDES, K .F. Estudo das atividades deperoxidase e polifenoloxidase de guariroba (*Syagrus oleracea* Becc) sob a ação dediferentes inibidores. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**. Maringá, 2003, v.25, n.1, p.189-193.

CARNEIRO, M. A. A.; FERNANDES, G.W. Sexo, drogas e herbivoria. As relações conflituosas entre plantas e insetos. **Ciência Hoje**. 1996, v.20, n.118, p. 32-35.

CARVALHO, J. B. *et al.* Fungitoxicidade de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon martinii* a *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de pimentão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, 2008, v.10, n.1, p.88-93.

CASTRO, H. G. *et al.* *Contribuição ao estudo das plantas medicinais-metabólitos secundários*. Visconde de Rio Branco, 2004, 2.ed. , p.113

CAVALCANTI, F. R. *et al.* Atividades de quitinase e beta-1,3-glucanase após eliciação das defesas do tomateiro contra a mancha-bacteriana. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, 2006, v.41, n.12, p.1721-1730, dez.

CAVALCANTI, L. S.; BRUNELLI, K. R.; STANGARLIN, J. R.; Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. *In*: CAVALCANTI, L. S. *et al.* (Ed.) **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos**. 2005, 264 p. Piracicaba, FEALQ. p.81-124.

CELOTO, M. I .B. *et al.* Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Scientiarum Agronomy**, 2008, v.30, n.1, p.1-5.

COLLINS, C. H. Princípios básicos de cromatografia. *In*: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (Org.). **Fundamentos de cromatografia**. Editora da Unicamp, Campinas, SP. p17-43, 2006. 456 p

COLPAS, F. T. *et al.* Indução de mecanismos de defesa em plantas por extrato de *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae). **Summa Phytopathologica**, 2009, v.35, n.3, p.191-195,.

CORREA JUNIOR, C.: Considerações gerais sobre plantas potenciais medicinais aromáticas e condimentares. **Comunicado EMATER**, Curitiba, PR. 1996, 3 p.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). *In*: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & molecular biology of plants**. 1367 p. I. K. International Private Limited, Nova Delhi, Índia. 2000, p1251-1318.

CUNICO, M. M. *et al.* Avaliação do extrato etanólico de *Ottonia martiana* Miq. para o controle de duas doenças florestais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, 2012, v.14, n.3, p.464-469.

DIETRICH, R.; PLOSS, K.; HEIL, H. Growth responses and fitness cost after induction of pathogen resistance depend on environmental condition. **Plant, Cell and Environment**. Oxford, 2000, v. 28, p. 211-222.

DI PIERO, R. M. **Potencial dos cogumelos *Lentinula edodes* (Shiitake) e *Agaricus blazei* (Cogumelo-do-sol) no controle de doenças em plantas de pepino, maracujá e tomate, e a purificação parcial dos compostos biologicamente ativos**. 157 p. Tese (Doutorado em Agronomia). ESALQ – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2003.

DUANGMAL, K.; APENTEN, R. K. O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**. London, 1999, v.64, p.351-359.

DURRANT, W. E.; DONG, X. Systemic Acquired Resistance. **Annual Review of Phytopathology**. 2004, v.42, p.185-209.

EMATER/PR. Empresa Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural do Paraná. **Informativo vida no campo**, Curitiba. Encarte técnico, 1996, ano 1, n.3, p.8.

EMBRAPA: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Disponível em <http://www.cnpso.embrapa.br/>. Acesso em 10 de abril de 2013.

EMBRAPA: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Tecnologias de produção de soja-Região central do Brasil. **Sistema de produção 6**. EMBRAPA, Londrina, 2005.

FERREIRA, D. F. Sistema de análises de variância para dados balanceados. Lavras: UFLA, (SISVAR 4.1 pacote computacional) 2000.

FLORÃO, A.: **Avaliação das atividades biológicas de óleos essenciais de quatro espécies de *Baccharis*, Asteraceae**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil, 2006, p 97.

FRANZENER, G. **Caracterização parcial de indutores de resistência em pepino e feijão a partir do extrato aquoso de *Eucalypto citriodora***. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Maringá. Paraná, 2011, p217.

FRANZENER, G. *et al.* Atividade antifúngica e indução de resistência em trigo a *Bipolaris sorokiniana* por *Artemisia camphorate*. **Acta Scientiarum**, 2003, v.25, p.503-507,.

GARCIA, R. A. *et al.* Atividade antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. **Bioscience Journal**. Uberlândia, 2012, v. 28, n. 1, p. 48-57,.

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**. 2005, v.43, p.205-227,

GOBBO-NETO, L. & LOPES, N. P. Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, 2007, v.30, n.2, p.374-381.

GOMES, E. C.; NEGRELLE, R. R. B. *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf: Aspectos botânicos e ecológicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, 2003, v. 4, n. 2, p. 137-144.

GOULART, A. C. P. **Fungos em sementes de soja: detecção, importância e controle**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2005, p. 72 .

GOULART, A. C. P. Sanidade de sementes de soja produzidas em Mato Grosso do Sul. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, 2000, v.26, n.3, p.346-352.

GRÜNER, R. *et al.* Salicylic acid and the hypersensitive response initiate distinct signal transduction pathways in tobacco that converge on the as-1-like element of the PR-1a promoter. **European Journal of Biochemistry**, 2003, v.270, p.4876-4886.

GUENTHER, E. **The essential oils: individual essential oils of the plant families**. Malabar: Krieger Publication. 1992, p.3894.

GUIMARÃES, L. G. L. *et al.* Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, 2011, v.42, n.2, p.464-472.

GUZZO, S. D. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix*. 236 p. Tese de doutorado. Centro de energia nuclear na agricultura, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2004.

HAHN, M. G. *et al.* Oligossacarídeos elicitores: estrutura e reconhecimento. In: International conference of european foundation for plant pathology. **Proceedings**. Strasbourg, Dordrecht: Kluwer Academic, 1993. p.99-116. 1992.

HAMMERSCHMIDT, R.; MÉTRAUX, J.P.; VAN LOON, L.C. Inducing resistance: a summary of papers presented at the First International Symposium on Induced Resistance to Plant Diseases, Corfu, May 2000. **European Journal of Plant Pathology**, 2001, v.107, n.1, p.1-6.

HAMMERSCHMIDT, T. R.; NUCLES, E. M.; KUC, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, 1982, v.20, p.73-82.

HAMMOND-KOSACK, K.; JONES, J. D. G. Responses to plant pathogens. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & molecular biology of plants**. 1367 p. I. K. International Private Limited, Nova Delhi, Índia. p.1102-1203, 2000.

HEIL, M.; BOSTOCK, M. R. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. **Annals of botany**, London, 2002, v.89, p.503-512.

HEISER, I.; OßWALD, W. F. Formação e função das espécies reativas de oxigênio nas interações planta-patógeno. Tradução de José Renato Stangarlin. In: PASCHOLATI, S. F. *et al.* **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e molecular**. 627 p. Piracicaba, FEALQ, 2008, p.249-284.

HENNING, A. A. *et al.* Manual de identificação de doenças de soja. 4.ed. Londrina: Embrapa Soja, **Embrapa Soja Documentos**. 74 p. n.256, 2010.

HIRAGA, S.; *et al.* A large family of class III plant peroxidases. **Plant and Cell Physiology**. Tokyo, 2001, v.2, n.5, p.462-468.

HOFFMANN, M. R. B. *et al.* Controle do cretamento bacteriano comum por *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii* e óleo essencial de laranja em feijoeiro suscetível e moderadamente resistente. **Cultivando o saber**; Cascavel, 2012, v.5, n.4, p.8-23.

ITAKO, A. T. *et al.* Controle de *Cladosporium fulvum* em tomateiro por extratos de plantas medicinais. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, 2009, v.76, n.1, p.75-83.

IURKIV, L. **Purificação parcial de compostos biologicamente ativos a partir de *Pycnoporus sanguineus* para o controle de ferrugem asiática em soja**. 104 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). UNIOESTE – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon. 2009.

KAO, C. H. Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol on antioxidant enzymes in rice leaves. **Plant Growth Regulation**. 2003, v. 39, p. 83-89.

KUHN, O. J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção.** Tese (Doutorado em Agronomia). Piracicaba SP. ESALQ – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 2007.

KUNOH, H. Aspectos celulares das interações planta-patógeno. Tradução de: Nelson Arno Wullf. In: PASCHOLATI, S. F. *et al.* **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e molecular.** 627. Piracicaba, FEALQ, 2008, p.153-176.

LABANCA, E. R. G. **Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de glicolinas em soja (*Glycine max*).** 107 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). ESALQ – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2002.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal.** São Carlos, SP: Ed. Rima, 2004, p. 531.

LAVABRE, M. Os aromas e perfumes na história. In: LAVABRE, M. **Aromaterapia: a cura pelos óleos essenciais**, 4 Ed., Rio de Janeiro: Record, 1997, p.531.

LEAL, T. C. A. B. *et al.* Avaliação do efeito da variação estacional e horário de colheita sobre o teor foliar de óleo essencial de capim cidreira (*Cymbopogon citratus*) (DC.) Stapf., **Revista Ceres**, n.278, p.445-453, 2001.

LEITE, B; STANGARLIN, J. R. Alterações fisiológicas na suscetibilidade. In: PASCHOLATI, S. F. *et al.* **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e molecular.** Piracicaba, FEALQ, 2008, p.115-152, p.531.

LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, 1972, v.47, p.273-279.

LORENZETTI, E. R. *et al.* Bioatividade de óleos essenciais no controle de *Botrytis cinerea* isolado de morangueiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.13, especial, p.619-627, 2011.

LOUSADA, L. L. *et al.* Bioatividade de extratos hidroalcoólicos de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. Sobre picão-preto (*Bidens pilosa* L.) e alface (*Lactuca sativa* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, 2012, v.14, n.2, p.282-286.

LUSSO, M. F. G.; PASCHOLATI, S. F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. **Summa Phytopathological**. 1999, v.25, p.244-249.

MAROTTI, M. *et al.* 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.

MARTINS, E. M. F. Proteínas relacionadas à patogênese. In: PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. (Ed.). **Interação Planta Patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular.** Piracicaba: FEALQ, 2008, p. 387-410..

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 2000, p.220.

MASSOLA JR, N. S.; KRUGNER, T. L. Fungos fitopatogênicos. In: AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**. 704 p. 4ª edição. Piracicaba, São Paulo: Ed. Agronômica Ceres. v.1, 2011, p149-206.

MAUCH-MANI, B.; METRAUX, J.P. Salicylic acid and systemic acquired resistance to plant pathogen attack. **Annals of Botany**, 1998, v. 82, p.535-540.

MAZARO, S. M. *et al.* Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a derivados de folhas de Pitangueira. **Ciência Rural**, v.38, n.7, out, 2008.

MELO, M. M.: Produção de esporos e inoculação de *Corynespora cassiicola* em soja. 76 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, Passo Fundo, 2009.

METRAUX, J. P.; NAWRATH, C.; GENOUD, T. Systemic acquired resistance. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. **Euphytica**. 2002, n.124, p.237-243.

MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. **European Journal of Plant Pathology**, v.107, n.1, p.13-18, 2001.

MOLINA, A.; HUNT, D. M.; RYALS, J. A. Impaired fungicide activity in plants blocked in disease resistance signal transduction. **The Plant Cell**, 1998, v. 10, n.11, p. 1903-1914,.

MORAES, M. G. Mecanismos da resistência sistêmica adquirida em plantas. **Revisão Anual de Patologia Vegetal**. v.6, p.261-284, 1998.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**. 2009, v.27.

MOREIRA, C. G. A. *et al.* Caracterização parcial de frações obtidas de extratos de *Cymbopogon nardus* com atividade elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja e efeito sobre *Colletotrichum lagenarium*. **Summa Phytopathologica**, 2008, v.34, n.4, p.332-337.

MOTOYAMA, M. M. *et al.* Indução de fitoalexinas em soja e em sorgo e efeito fungitóxico de extratos cítricos sobre *Colletotrichum lagenarium* e *Fusarium semitectum*. **Acta Scientiarum Agronomy**. Maringá, 2003, v. 25, no. 2, p. 491-496.

MYCOBANK. Disponível em: <http://www.mycobank.org> Acesso em 18 de março de 2013.

NASCIMENTO, I.B.; INNECCO, R.; MATOS, S.H.; BORGES, N.S.S.; MARCO, C.A. Influência do horário de corte na produção de óleo essencial de capim santo (*Andropogum sp.*). **Revista Caatinga**. v19, p.123-127, 2006.

NGUEFACK, J. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. **International Journal of Food Microbiology**. Washington, n.94, p.329-34, 2004.

OKOT-KOTBER, M. *et al.* Activation of ptyphenol oxidase in extracts of bran from several wheat (*Triticum aestivum*) cultivars using organic solvents, detergents, and chaotropes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.2410-2417, 2002.

OLIVEIRA, V. A. *et al.* Efeito da adubação mineral e orgânica sobre a produção de biomassa e óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* Stapf). **Pro Homine**. v.1, p.24-27, 2002.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: Mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres. 1995, v.1. cap.22, p.417-454.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência a doenças. In: LUZ, W. C. (Ed.). Revisão anual de patologia de plantas. Passo Fundo: **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.2, p.1-52, 1994.

PEREIRA, R. B. *et al.* Óleo essencial de citronela no controle e na ativação de respostas de defesa do cafeeiro contra a ferrugem e cercosporiose. **Ciência e agrotecnologia**. Lavras, 2012, v.36, n.4.

PEREIRA, R. B. *et al.* Extrato de casca de café, óleo essencial de tomilho e acibenzolar-S-metil no manejo da cercosporiose-do-cafeeiro. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, 2008, v.43, n.10, p.1287-1296.

PERES, R. L. *et al.* *Achillea millefolium* – asteraceae: estudo fitoquímico, espectrofotométrico e da atividade antifúngica (*Colletotrichum musae*). **Revista eletrônica de farmácia**, v.6, p81-93, 2009.

PICANÇO, M. C. *et al.* Manejo integrado de pragas. In: SEDIYAMA, T. **Tecnologias de produção e usos da soja**. 314 p. Londrina: Mecnas, 2009, p.119-132.

PICCOLO, G. *et al.* Efeito alelopático de capim limão e sabugueiro sobre a germinação de guaxuma. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, 2007, v.28, n.3, p.381-386.

PULZ, P. **Crescimento e esporulação de *Alternaria dauci* e *A. solani* em meio de cultura**. Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2007, p.68.

ROMEIRO, R. S. Indução de resistência em plantas à patógenos. In: PASCHOLATI, S. F. *et al.* **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e molecular**. 627 p. Piracicaba, FEALQ, 2008, p.411-432.

ROTHSCHILD, Z.: Cromatografia por exclusão. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (Org.). **Fundamentos de cromatografia**. 456 p. Editora da Unicamp, Campinas, SP. 2006, p.139-166.

ROZWALKA, L. C. *et al.* Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, v.38, n.2, 2008.

SANTOS NETO, J. **Bioatividade de subprodutos de capim-limão e proteção do tomateiro em sistema de cultivo orgânico contra septoriose.** 129 p. Dissertação. Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2012.

SCHNEIDER, C. F.; NOZAKI, M. H.; PIATTI, A. Efeito fungitóxico do óleo essencial de capim limão sobre *Mycosphaerella fragariae*. **Revista Varia Scientia Agrária**, v.2, n.2, p. 91-98, 2012.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. *et al.* Extratos de cogumelos no controle de doenças de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 20, p. 177-205, 2012.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S. F. *et al.* **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e molecular.** 627 p. Piracicaba, FEALQ, 2008, p. 227-248.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R. Extrato e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L.S. *et al.* (Ed.) **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos.** 263 p. Piracicaba: FEALQ, 2005, p.125-138.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Uso de extrato vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta (UFPR)**, Curitiba, 2000, v. 30, n. 1 e 2, p. 129-138.

SEDIYAMA, T.; TEIXEIRA, R. C.; BARROS, H. B. Origem, evolução e importância econômica. In: SEDIYAMA, T. **Tecnologias d produção e usos da soja.** 314 p. Londrina: Mecenas, 2009a, p.1-16.

SEDIYAMA, H. A.; TEIXEIRA, R. C., SEDIYAMA, T. Soja e seus derivados na alimentação humana. In: SEDIYAMA, T. **Tecnologias d produção e usos da soja.** 314 p. Londrina: Mecenas, 2009b, p.261-272.

SILVA, L. H. P.; *et al.* Efeito indutor de resistência acibenzolar-S-metil na proteção contra *Xanthomonas vesicatoria*, *Oidium lycopersici* e *Septoria lycopersici* em tomateiro. **Summa Phytopathologyca.** Botucatu, 2003, v.29, n.3, p.244-248.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Porto Alegre: Ed. Universidade-UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC. 1999, p. 387-415.

SNOW, J. P., BERGGREN JR, G. T. Target spot. In: Compendium of soybean diseases. 3. **American Phytopathological Society.** Ed. St Paul: Minnesota, 1989, p. 27-28.

SOBRINHO, C. A.; FERREIRA, P. T.; CAVALCANTI, L. S. Indutores abióticos. In: CAVALCANTI, L. S. *et al.* (Ed.): **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos,** Piracicaba: FEALQ, 2005, p.51-80.

SOMSSICH, I. E.; HAHBROCK, K. Patogen defense in plants: a paradigm of biological complexity. **Trends in Plant Science**, 1998, v. 3, p. 86-90.

SPADARO, A. C. Cromatografia por troca iônica. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (Org.). **Fundamentos de cromatografia**. 456p. Editora da Unicamp, Campinas, SP. 2006, p.103-137.

STANGARLIN, J. R. *et al.* Control of plant diseases using extracts from medicinal plants and fungi. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Org.). **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**. 1ª ed. Badajoz, Espanha: Formatex Research Center, 2011, v.2, p.1033-1042.

STANGARLIN, J. R. *et al.* Indução de fitoalexinas em soja e sorgo por preparações de *Saccharomyces boulardii*. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, 2010, v.77, n.1, p.91-98.

STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Proteção de plântulas de milho pipoca contra *Exserohilum turcicum* pelo uso de *Saccharomyces cerevisiae*. **Summa Phytopathologica**. 1994, v. 20, p. 16-21.

STEFFEN, R. B. *et al.* Avaliação de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de *Meloidogyne graminicola* em arroz irrigado. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, São Paulo, Brasil, 2008, v.32, n.2.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B. M.; MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, 1997, v. 35, p. 235-270.

TEIXEIRA *et al.* Composição, valor nutricional e propriedades funcionais. In: SEDIYAMA, T.: **Tecnologias d produção e usos da soja**. 314 p. Londrina: Mecenias, 2009, p.247-260.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**, 719p., 4ª ed., Porto Alegre: Artmed, 2009.

TERRY, L. A.; JOYCE, D. C. Elicitors of induced disease resistance in harvested horticultural crops: a brief review. **Postharvest Biology and Technology**, 2004, v.32, p.1-13.

TOILLIER, S. L. *et al.* Controle de cretamento bacteriano comum (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) e alterações bioquímicas em feijoeiro induzidas por *Pycnoporus sanguineus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, 2010, v.77, n.1, p.99-110.

UMESHA, S. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. **Phytoparasitica**, 2006, v.34, n.1, p.68-71.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 1999, v.55, p. 85-97.

VAN LOON, L. C. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, 1994, v. 12, p. 245-264.

VIGO, S. C. *et al.* Ação de tinturas e óleos essenciais de plantas medicinais sobre o cretamento bacteriano comum do feijoeiro e na produção de proteínas de indução de resistência. **Summa Phytopathologica**, 2009, v.35, n.4, p.293-304.

VOGELSANG, R.; BARZ, W. Purification, characterization and differential hormonal regulation of a β -1,3-glucanase and two chitinases from chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Planta**, 1993, v. 189, p.60–69.

WIRTH, S. J. & WOLF, G. A. Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. **Journal of Microbiological Methods**, v.12, p.197-205, 1990.

WULFF, N. A. **Caracterização parcial de elicitores de fitoalexinas em sorgo (*Sorghum bicolor*) obtidos a partir de *Saccharomyces cerevisiae***. 62p. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

YAMUNARANI, K. *et al.* Induction of early blight resistance in tomato by *Quercus infectoria* gall extract in association with accumulation of phenolics and defenserelated enzymes. **Acta Physiologiae Plantarum**, Warsaw, 2004, v. 26, n. 3, p. 281-290.

ZANCOPE, G. J.; NASSER, J. M. **O Brasil que deu certo – A saga da soja brasileira**. 279 p. Editora Tríade, 2005.

ZIEGLER, E.; PONTZEN, R. Specific inhibition of glucanelicited glyceolin accumulation in soybeans by an extracellular mannan-glycoprotein of *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. **Physiological Plant Pathology**, 1982, v.20, n.3, p.321-31.