



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**UTILIZAÇÃO DE EXTRATO PADRONIZADO E ÓLEO ESSENCIAL DE
Rosmarinus officinalis L. (Lamiaceae) NO CONTROLE DA BRUSONE
(*Magnaporthe oryzae*) DO ARROZ (*Oryza sativa* L. - Poaceae)**

MARÍA DEL CARMEN HERRERA RODRÍGUEZ

GOIÂNIA, GO

2015

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E
DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem resarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	María del Carmen Herrera Rodríguez		
E-mail:	carminha.herrera@gmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Vínculo empregatício do autor			
Agência de fomento:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico	Sigla: CNPq	
País:	Brasil	UF:	GO
UF:	GO	CNPJ:	
Titúlo:	UTILIZAÇÃO DE EXTRATO PADRONIZADO E ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Lamiaceae) NO CONTROLE DA BRUSONE (<i>Magnaporthe oryzae</i>) DO ARROZ (<i>Oryza sativa</i> L. - Poaceae)		
Palavras-chave:	Alecrim, brusone, manejo integrado, ácido rosmarínico		
Titúlo em outra língua:	Use of standardized extract and essential oil of <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Lamiaceae) in the control of rice blast (<i>Magnaporthe oryzae</i>) in Rice (<i>Oryza sativa</i> L. - Poaceae)		
Palavras-chave em outra língua:	Rosemary, rice blast, integrated management, rosmarinic acid		
Área de concentração:	Farmacologia e fisiologia		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	24 de fevereiro de 2015		
Programa de Pós-Graduação:	Em ciências biológicas		
Orientador (a):	Prof. Dr. José Realino de Paulo		
E-mail:	jrealino@farmacia.ufg.br		
Co-orientador:	Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição/ Prof. Dra. Marta Cristina Corsi de Filippi		
E-mail:	ecardoso@farmacia.ufg.br / macrisfilippi@gmail.com		

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.


 Assinatura do (a) autor (a)

Data: 23 / 07 / 2015

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão desse prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

MARÍA DEL CARMEN HERRERA RODRÍGUEZ

**UTILIZAÇÃO DE EXTRATO PADRONIZADO E ÓLEO ESSENCIAL DE
Rosmarinus officinalis L. (Lamiaceae) NO CONTROLE DA BRUSONE
(*Magnaporthe oryzae*) DO ARROZ (*Oryza sativa* L. - Poaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. José Realino de Paula
Co-orientadora: Marta Cristina Corsi de Filippi
Co-orientador: Edemilson Cardoso da Conceição

GOIÂNIA, GO

2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Herrera Rodríguez, María del Carmen
UTILIZAÇÃO DE EXTRATO PADRONIZADO E ÓLEO ESSENCIAL DE
Rosmarinus officinalis L. (Lamiaceae) NO CONTROLE DA BRUSONE
(Magnaporthe oryzae) DO ARROZ (Oryza sativa L. - Poaceae)
[manuscrito] / María del Carmen Herrera Rodríguez. - 2015.
XVII, 87 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. José Realino de Paula; co-orientador Dr.
Edemilson Cardoso da Conceição; co-orientador Dr. Marta Cristina
Corsi de Filippi.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Ciências Biológicas (ICB) , Programa de Pós-Graduação em Biologia,
Goiânia, 2015.

Bibliografia.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de
figuras, lista de tabelas.

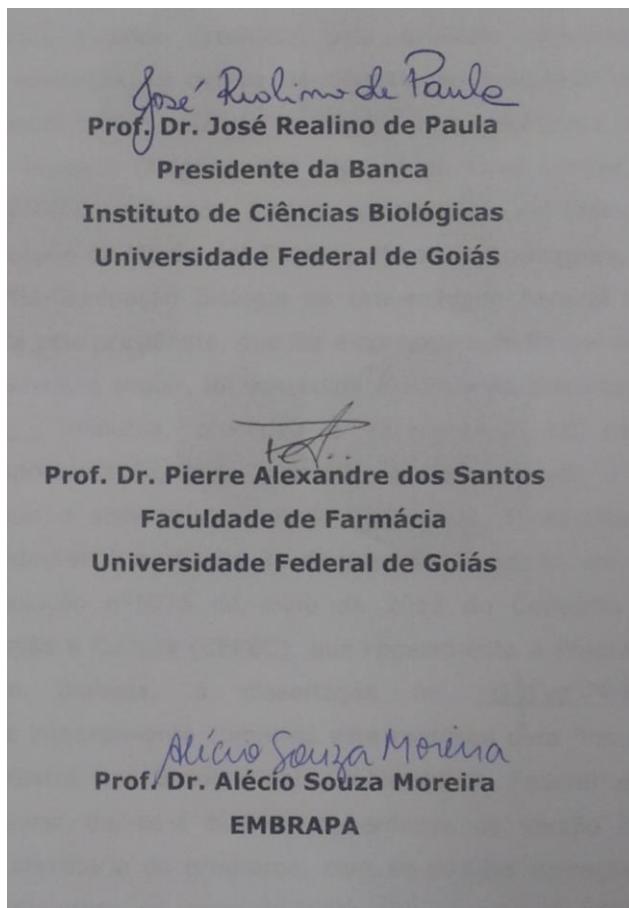
1. Alecrim. 2. Brusone. 3. Manejo integrado. 4. Ácido rosmariníco. I.
Realino de Paula, José, orient. II. Cardoso da Conceição, Edemilson,
co-orient. III. Título.

MARÍA DEL CARMEN HERRERA RODRÍGUEZ

**UTILIZAÇÃO DE EXTRATO PADRONIZADO E ÓLEO ESSENCIAL DE
Rosmarinus officinalis L. (Lamiaceae) NO CONTROLE DA BRUSONE
(*Magnaporthe oryzae*) DO ARROZ (*Oryza sativa* L. - Poaceae)**

Dissertação defendida e aprovada em 24/02/2015

BANCA EXAMINADORA



A todas las personas que alguna vez me inspiraron
y me ayudaron a salir adelante.

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo apoio incondicional para continuar estudando e poder viajar para o Brasil.

À minha coorientadora Marta Cristina Corsi de Filippi por sua amizade, simpatia, orientação, paciência e ensinamentos.

Ao meu orientador José Realino de Paula por ter me aceitado como sua aluna e por sua orientação.

Ao Márcio Vinicius de Carvalho Barros Côrtes por sua amizade e cooperação nos experimentos desenvolvidos na Embrapa Arroz e Feijão.

Ao professor Edemilson Cardoso da Conceição e Nathalia Pedroso Barbosa por suas enormes ajudas na minha chegada ao Brasil e por suas amizades.

Aos meus amigos: Luiza Toubas, Mythali García, Rubia Machado, Lorena Peixoto, Leonardo Levorato, Rafaela Guimarães, Juiva Marques, Rejanne, Bárbara Estevam, Leilane, Jordene, Thatyane, Erika, Antonia, Verónica Noriega, Júlio Grandez, Alonso Poma, Sergio, Rosalva, Fabricio (brasileiros, colombianos, peruanos, e mexicanos) que fizeram uma experiência muito agradável neste país.

Ao Marcello Reis, Mônica, pelo apoio físico na elaboração dos experimentos.

A todos meus colegas do LPPN e do Laboratório de fitopatologia Embrapa Arroz e Feijão por sua amizade e pela constante ajuda em todos os momentos.

À Embrapa arroz e feijão por permitir fazer parte de meu projeto em suas instalações.

À UFG, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas e a CAPES, pela oportunidade e pelo apoio intelectual e financiamento do projeto.

Que tu corazón se enderece: aquí nadie vivirá para siempre.

Nezahualcóyotl

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xvi
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xix
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Brusone	2
1.1.2 Taxonomia.....	2
1.1.3 Morfologia	2
1.1.4 Sintomas.....	3
1.1.5 Ciclo da doença.....	4
1.1.6 Controle.....	5
1.1.6.1 Controle químico.....	6
1.2 Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i>).....	8
1.3 Óleos essenciais.....	9
1.3.1 Composição química.....	10
1.3.2 Efeitos biológicos.....	10
1.4 Extratos vegetais.....	12
1.5 Padronização dos extratos vegetais.....	13
1.6 Ácido rosmarínico.....	14
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Caracterização do material vegetal.....	16
3.1.1 Determinação da perda por dessecção.....	16
3.1.2 Determinação de cinzas totais.....	16
3.1.3 Determinação da granulometria do pó.....	17
3.1.4 Determinação do índice de intumescência (II).....	17
3.1.5 Determinação de teor de fenóis totais.....	17
3.1.6 Determinação de teor de flavonoides totais	18
3.1.7 Determinação do teor de taninos totais.....	19
3.2 Caracterização do extrato concentrado.....	20
3.2.1 Obtenção do extrato.....	20
3.2.2 Determinação de pH do extrato líquido concentrado.....	20
3.2.3 Determinação do perfil cromatográfico do pó e extrato líquido concentrado por Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	21
3.2.4 Quantificação de ácido rosmarínico no extrato líquido por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e validação da metodologia analítica.....	21
3.2.4.1 Preparo das amostras.....	21
3.2.4.2 Determinação das condições cromatográficas.....	21
3.2.4.3 Validação do método analítico.....	22
3.2.4.4 Seletividade.....	22
3.2.4.5 Linearidade.....	22

3.2.4.6 Limite d Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	22
3.2.4.7 Precisão.....	23
3.2.4.8 Exatidão.....	23
3.2.4.9 Robustez.....	24
3.2.4.10 Determinação do teor de ácido rosmarínico.....	24
3.3 Extração de óleo essencial.....	25
3.3.1 Índice de refração do óleo essencial.....	25
3.3.2 Cromatografia gasosa.....	25
3.4 Efeitos do extrato e óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> e do marcador ácido rosmarínico no crescimento micelial de <i>Magnaporthe oryzae</i>.....	26
3.4.1 Crescimento micelial.....	26
3.5 Atividade fungicida do extrato e óleo essencial de <i>R. officinalis</i> contra <i>M. oryzae</i>.....	27
3.6 Efeito do extrato de <i>R. officinalis</i> e do marcador ácido rosmarínico na germinação, desenvolvimento do tubo germinativo e na formação do apressório de <i>M. oryzae</i>, sobre uma superfície hidrofóbica	28
3.6.1 Preparo das concentrações de extrato e de ácido rosmarínico	28
3.6.2 Preparo da suspensão de conídios.....	28
3.6.3 Extrato e ácido rosmarínico	28
3.6.4 Óleo essencial	29
3.6.5 Avaliações.....	31
3.7 Efeito do extrato padronizado e do óleo essencial de <i>R. officinalis</i> e do ácido rosmarínico sobre a membrana plasmática e parede celular de <i>M. oryzae</i> por microscopia de fluorescência.....	31
3.8 Supressão da Brusone (<i>M. oryzae</i>) foliar em arroz, com extrato de alecrim (<i>R. officinalis</i>), sob condições controladas em casa de vegetação.....	32
3.8.1 Plantio.....	32
3.8.2 Suspensão de conídios de <i>M. oryzae</i>	32
3.8.3 Tratamentos na casa de vegetação.....	32
3.8.4 Inoculação por pulverização foliar.....	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1 Caracterização da matéria prima vegetal e do extrato concentrado.....	35
4.1.1 Determinação da perda por dessecação.....	35
4.1.2 Determinação de cinzas totais.....	35
4.1.3 Determinação do Índice de Intumescência.....	35
4.1.4 Determinação da granulometria do pó.....	36
4.1.5 pH do extrato líquido concentrado.....	36
4.1.6 Determinação de polifenóis, flavonoides e taninos do material vegetal e do extrato concentrado.....	37
4.1.7 Determinação do perfil cromatográfico do pó e do extrato concentrado de <i>R. officinalis</i> por Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	37
4.2. Validação do método analítico para identificação e quantificação de ácido rosmarínico por Cromatografia líquida de Alta eficiência (CLAE).....	38
4.2.1 Seletividade.....	39
4.2.2 Linearidade.....	40

4.2.3 Limite de detecção e quantificação.....	41
4.2.4 Precisão.....	44
4.2.5 Exatidão.....	43
4.2.6 Robustez	43
4.2.7 Determinação do teor de ácido rosmarínico no extrato concentrado de <i>R. officinalis</i>	44
4.3 Extração do óleo essencial.....	44
4.3.1 Índice de refração.....	44
4.3.2 Densidade relativa.....	44
4.3.3 Constituição química do óleo essencial	45
4.4 Efeitos do extrato e óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> e do ácido rosmarínico no crescimento micelial de <i>Magnaporthe oryzae</i>.....	46
4.4.1 Efeito do extrato de <i>R. officinalis</i>	49
4.4.2 Efeito do ácido rosmarínico.....	51
4.4.3 Efeito do Óleo essencial.....	51
4.5 Atividade fungicida do extrato e óleo essencial de <i>R. officinalis</i>.....	55
4.6 Efeito do extrato e do óleo essencial de <i>R. officinalis</i> e do ácido rosmarínico na germinação dos conídios e formação do apressório de <i>M. oryzae</i>, sobre uma superfície hidrofóbica.....	56
4.6.1 Efeito do extrato de <i>R. officinalis</i>	56
4.6.2 Efeito do ácido rosmarínico.....	58
4.6.3 Efeito do óleo essencial.....	60
4.7 Efeito do extrato padronizado e do óleo essencial de <i>R. officinalis</i> e do marcador ácido rosmarínico sobre a membrana plasmática e a parede celular de <i>M. oryzae</i> por microscopia de fluorescência.....	64
4.8 Supressão da brusone foliar (<i>M. oryzae</i>) do arroz, com extrato de alecrim (<i>R. officinalis</i>) e com o ácido rosmarínico, sob condições controladas em casa de vegetação.....	67
5. CONCLUSÃO.....	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BDA	Batata Dextrosa Ágar
CG/MS	Cromatografia Gasosa
CCD	Cromatografia de camada delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de alta eficiência
DMSO	Dimetil sulfóxido
DL ₅₀	Dose letal mediana
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FeCl ₃	Cloreto de ferro (III)
FM	Fase móvel
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
II	Índice de intumescência
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
NPK	Nitrogênio, Fósforo e Potássio
DP	Desvio padrão
pH	Potencial Hidroniônico
Rf	Fator de retenção

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sintomas da brusone em plantas de arroz: A) na folha, B) de nó e C) de pescoço em arroz irrigado. Embrapa Clima Temperado (2009).....	3
Figura 2. Ciclo da doença de <i>M. oryzae</i> (a) Conídios simpodiais sobre os conidióforos. (b) Conídios aderidos na superfície do hospedeiro utilizando mucilagem. (c) Conídios germinados com filamento de hifas revestidas de uma matriz extracelular. (d) apressório melanizado com conteúdos autofagocitados do conídio e tubo germinativo. (e) peg de penetração. Adaptado de Ebbole, (2007).....	5
Figura 3. Estruturas químicas dos fungicidas sistêmicos utilizados para o controle da brusone.....	7
Figura 4. <i>Rosmarinus officinalis</i> cultivado em horta familiar	9
Figura 5. Estructura química do ácido rosmarínico.....	14
Figura 6. Demonstração ilustrativa de cada tratamento para determinar o efeito do extrato e o marcador ácido rosmarínico sobre a germinação e desenvolvimento do tubo germinativo e apressório de <i>M. oryzae</i>	29
Figura 7. Demonstração ilustrativa de cada tratamento para determinar o efeito da volatilidade do óleo essencial de alecrim sobre a germinação e desenvolvimento do tubo germinativo e apressório de <i>M. oryzae</i>	30
Figura 8. Bandeja semeada com semente do cultivar “BRS Primavera” e solo adubado.....	32
Figura 9. Suspensão de conídios de <i>M. oryzae</i> homogeneizados com extrato de <i>R. officinalis</i> , compondo os tratamentos para a pulverização das folhas de arroz.....	33
Figura 10. Disposição dos tratamentos após ser inoculados com <i>M. oryzae</i> na casa de vegetação.....	34
Figura 11. Distribuição granulométrica do pó de <i>R. officinalis</i>	36
Figura 12. Perfil cromatográfico do pó e do extrato de <i>R. officinalis</i> junto com o marcador ácido rosmarínico junto com seu respectivo Rf.....	38
Figura 13. Cromatograma e espectro de absorbância do padrão ácido rosmarínico (11,37 min).....	39

Figura 14. Cromatograma e espectro de absorbância do extrato de <i>R. officinalis</i> (11, 44 min).....	40
Figura 15. Curva padrão do ácido rosmarínico.....	41
Figura 16. Crescimento micelial (área média) de <i>M. oryzae</i> em meio de cultura BDA contendo diferentes concentrações de extrato de <i>R. officinalis</i>	47
Figura 17. Crescimento e coloração micelial de <i>M. oryzae</i> e formação de halo, em placas de Petri contendo meio de cultura BDA e diferentes concentrações do extrato de <i>R. officinalis</i> : A:50; B: 45; C:40; D:35; E:30; F:25; G:20; H: 15; I: 10; J: 5 mg/mL e K: Controle.....	48
Figura 18. Crescimento micelial (área média) de <i>M. oryzae</i> em meio de cultura BDA contendo diferentes concentrações de ácido rosmarínico.....	49
Figura 19. Crescimento e coloração micelial de <i>M. oryzae</i> e formação de halo, em placas de Petri contendo meio de cultura BDA e diferentes concentrações do ácido rosmarínico: A:1,05; B: 0,945; C:0,81; D:0,735; E:0,63; F:0,525; G:0,42; H: 0,315; I: 0,21; J: 0,105 mg/mL e K: controle.....	50
Figura 20. Crescimento micelial (área média) de <i>M. oryzae</i> em meio de cultura BDA contendo diferentes concentrações do óleo essencial.....	51
Figura 21. Crescimento micelial de <i>M. oryzae</i> em placas de Petri contendo meio de cultura BDA e diferentes concentrações do óleo essencial de <i>R. officinalis</i> : A:5; B: 4,5; C:4; D:3,5; E:3; F:2,5; G:2; H: 1,5; I: 1; J: 0,5 μ L/mL e K: Controle.....	52
Figura 22. Crescimento micelial de <i>M. oryzae</i> nos tratamento: A) 50; B) 45; C) 40 e D)35 mg/mL do extrato de <i>R. officinalis</i> (direita) comparado com o controle (esquerda).....	55
Figura 23. Crescimento micelial de <i>M. oryzae</i> nos tratamento: A) 5, B)4,5; C) 4 e D)3,5 μ L/mL do óleo essencial.....	55
Figura 24. Germinação de conídios e formação do apressório de <i>M. oryzae</i> , em superfície hidrofóbica, as 4, 6 e 24 horas de exposição aos tratamentos com nas concentrações de 5, 10, 20, 25, 30, 40 e 50 mg/mL do extrato de <i>R. officinalis</i>	57
Figura 25. Germinação de conídios e formação do apressório de <i>M. oryzae</i> as 24 horas após o início do bioensaio, com extrato de <i>R. officinalis</i> sobre uma superfície hidrofóbica nas concentrações de: (A) Controle, B) 5, C) 10, D) 20, E) 25, F) 30, G) 40, e H) 50 mg/mL).....	58

Figura 26. Germinação de conídios e formação do apressório de <i>M. oryzae</i> , em superfície hidrofóbica, as 4, 6 e 24 horas de exposição aos tratamentos com as concentrações de 0,052; 0,105; 0,21; 0,42; 0,63; 0,84 e 1,05 mg/mL do ácido rosmarínico.....	59
Figura 27. Germinação de conídios e formação do apressório de <i>M. oryzae</i> , depois de 24 horas de início do bioensaio com ácido rosmarínico sobre uma superfície hidrofóbica nas concentrações de:(A) Controle, B) 0,052; C) 0,105; D) 0,21; E) 0,42; F) 0,63; G) 0,84; e H)1,05 mg/mL) de ácido rosmarínico.....	60
Figura 28. Germinação de conídios e formação do apressório de <i>M. oryzae</i> , em superfície hidrofóbica, as 4, 6 e 24 horas de exposição aos tratamentos com as concentrações de 0,02; 0,03; 0,04 e 0,05 $\mu\text{L}/\text{cm}^3$ do óleo essencial de <i>R. officinalis</i>	61
Figura 29. Germinação de conídios e formação do apressório de <i>M. oryzae</i> , depois de 24 horas de início do bioensaio com óleo essencial de <i>R. officinalis</i> nas diferentes concentrações (A) Controle, B) 0,02; C) 0,03; D) 0,04; E) 0,05 $\mu\text{l}/\text{cm}^3$).	62
Figura 30. Microscopia de fluorescência dos conídios, conídios germinados e apressórios formados de <i>M. oryzae</i> , após 24 horas do início do bioensaio, com diferentes concentrações de extrato de <i>R. officinalis</i> : A) Controle; B)2,5; C)5; C)10; D)20; E)30; G)40 e H)50 mg/mL.....	65
Figura 31. Microscopia de fluorescência dos conídios de <i>M. oryzae</i> conídios germinados e apressórios formados de <i>M. oryzae</i> , após 24 horas do início do bioensaio, concentrações de ácido rosmarínico: A) Controle; B) 0,052; C)0,105; C)0,21; D)0,42; E)0,63; G)0,84 e H)1,05 mg/mL.....	66
Figura 32. Microscopia de fluorescência dos conídios de <i>M. oryzae</i> , conídios germinados e apressórios formados de <i>M. oryzae</i> , após 24 horas do início do bioensaio, com as diferentes concentrações do óleo essencial de <i>R. officinalis</i> : A) Controle; B) 0,02; C) 0,03; D) 0,04 e E) 0,05 $\mu\text{L}/\text{cm}^3$	66
Figura 33. Severidade da brusone foliar nos tratamentos com extrato de <i>R. officinalis</i> , sob condições de casa de vegetação: T:controle; 50, 100 e 150 mg/mL. Barras seguidas de letras diferentes indicam a diferença estatística entre cada tratamento pelo teste de Duncan ($p=0,05$).....	67
Figura 34. Severidade da brusone foliar do arroz nos tratamentos com diferentes concentrações de extrato de <i>R. officinalis</i> : sob condições casa de vegetação: A) Controle; B)50; C)100; D)150 mg/mL	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações finais dos tratamentos com o extrato de <i>R. officinalis</i> , ácido rosmarínico e óleo essencial em meio de cultura BDA:.....	27
Tabela 2. Concentrações finais do extrato de <i>R. officinalis</i> , ácido rosmarínico e óleo essencial utilizados na germinação e formação de apressórios.....	30
Tabela 3. Concentrações finais do extrato, óleo essencial e ácido rosmarínico testadas sobre a membrana plasmática e parede celular de <i>M. oryzae</i>	32
Tabela 4. Concentrações e volume final das suspensões de inoculo dos 7 tratamentos com extrato de alecrim.....	33
Tabela 5. Teor de polifenóis, flavonoides e taninos encontrados no material vegetal e extrato concentrado de <i>R. officinalis</i>	37
Tabela 6. Os valores de <i>system suitability</i> obtidos para os cromatogramas do padrão ácido rosmarínico e o extrato de <i>R. officinalis</i>	39
Tabela 7. Áreas dos picos do padrão de ácido rosmarínico obtidas para a construção da curva.....	41
Tabela 8. Repetibilidade do método analítico para doseamento de ácido rosmarínico no extrato concentrado de <i>R. officinalis</i>	42
Tabela 9. Precisão intermediária do método analítico para doseamento de ácido rosmarínico no extrato concentrado de <i>R. officinalis</i>	42
Tabela 10. Resultados da recuperação do padrão adicionado ao extrato concentrado de <i>R. officinalis</i>	43
Tabela 11. Resultados da robustez do método para doseamento de ácido rosmarínico no extrato concentrado de <i>R. officinalis</i>	44
Tabela 12. Constituintes do óleo essencial de <i>R. officinalis</i>	46

RESUMO

O consumo de fungicidas para o controle da brusone do arroz aumentou nos últimos anos, gerando vários inconvenientes, tais como aumento dos custos de produção, o desenvolvimento de resistência do patógeno e a presença de resíduos em alimentos. Isto leva à necessidade de desenvolver novos métodos e estratégias para o controle desta doença como o uso de extratos vegetais e óleos essenciais. O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* e *in vivo* a atividade antimicrobiana do extrato padronizado em ácido rosmarínico e do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* sobre *Magnaporthe oryzae*. O material vegetal foi caracterizado de acordo com a Farmacopeia Brasileira 5° edição. O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação em aparelho de Clevenger e os constituintes foram identificados por Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. A quantificação do ácido rosmarínico no extrato foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a metodologia analítica foi validada. Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados *in vitro* e *in vivo*, a partir de um delineamento inteiramente casualizado. *In vitro* foram avaliadas as concentrações de 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 e 0 mg/mL do extrato concentrado, 5; 4,5; 4; 3,5; 3; 2,5; 2; 1,5; 1; 0,5 e 0 μ L/mL do óleo essencial e 1,05; 0,945; 0,81; 0,735; 0,63; 0,525; 0,42; 0,315; 0,21; 0,105 e 0 mg/mL do ácido rosmarínico sobre o crescimento micelial. A inibição da germinação, formação do apressório e o efeito sobre a membrana plasmática foram realizados nas concentrações de 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2,5 e 0 mg/mL de extrato; 0,105; 0,84; 0,63; 0,42; 0,21; 0,105; 0,052 e 0 mg/mL do ácido rosmarínico e 0,05; 0,04; 0,03; 0,02 e 0 μ L/cm³ de óleo essencial. *In vivo* foram testadas as concentrações de 150, 100, 50 e 0 mg/mL do extrato e 6,3; 4,2; 2,1 e 0 mg/mL do ácido rosmarínico. As melhores concentrações que inibiram o crescimento micelial foram 50, 45, 40 e 35 mg/mL e 5; 4,5; 4 e 3,5 μ L/mL de extrato e de óleo essencial respectivamente, porém o ácido rosmarínico apresentou o efeito inibitório apenas nas concentrações de 0,945 e 1,05 mg/mL. Por outro lado, as concentrações de 40 e 50 mg/mL do extrato e as concentrações de 0,21; 0,42; 0,63; 0,84 e 1,05 mg/mL de ácido rosmarínico e todas as concentrações do óleo essencial inibiram a germinação e a formação do apressório as 4, 6 e 24 horas, sem contudo, causar dano a parede e

membrana plasmática dos conídios de *M. oryzae*. *In vivo*, todos os tratamentos com extrato reduziram a severidade da brusone foliar, destacando-se 150 mg/mL, que reduziu em mais de 90% da área foliar afetada. O ácido rosmarínico não apresentou efeito inibitório da severidade da brusone foliar.

Palavras chave: alecrim, brusone, manejo integrado, ácido rosmarínico.

ABSTRACT

Fungicides consumption was increased in recent years for control of rice blast, causing various problems, such as increased production costs, the development of resistance to the pathogen, the presence of residues in foods. This leads to the need to develop new methods and strategies of control of the disease and the application of plant extracts and essential oils. The objective of this study was to evaluate *in vitro* and *in vivo* antimicrobial activity of standardized extract in rosmarinic acid and essential oil of *Rosmarinus officinalis* on *Magnaporthe oryzae*. Were evaluated *in vitro* concentrations 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 and 0 mg/mL of the concentrated extract 5, 4.5, 4, 3.5, 3, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.5 and 0 μ L/mL, of essential oil and 1.05, 0.945, 0.81, 0.735, 0.63, 0.525, 0.42, 0.315, 0.21, 0.105 and 0 mg/mL of rosmarinic acid on the mycelial growth Inhibition of germination, apressorium formation and the effect on the plasmatic membrane were performed in concentrations 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2.5 and 0 mg/mL of extract, 1.05, 0.84, 0.63, 0.42, 0.21, 0.105, 0.052 and 0 mg/mL of rosmarinic acid and 0.05, 0.04, 0.03, 0.02 and 0 μ L/cm³ of essential oil. *In vivo* were tested concentrations 150, 100, 50 and 0 mg/mL of extract and 6.3, 4.2, 2.1 e 0 mg/mL of rosmarinic acid. The best concentrations that inhibited mycelial growth were 50, 45, 40 and 35 mg/mL and 5, 4.5, 4 and 3.5 μ L/mL of extract and essential oil, respectively, but rosmarinic acid had an inhibitory effect at the concentrations of 0.945 and 1.05 mg/mL. On the other hand, the concentrations of 40 and 50 mg/mL of the extract and the concentration of 0.21, 0.42, 0.63, 0.84 and 1.05 mg/mL rosmarinic acid and all the essential oil concentrations inhibited the germination and the formation of the apressorium 4, 6 and 24 hours without damaging the plasmatic membrane and cell wall of conidia of *M. oryzae*. *In vivo*, all treatments of extract reduced the severity of rice blast, with a optimal concentration of 150 mg/mL reducing above 90% of the disease, rosmarinic acid no showed inhibitory effect.

Keywords: rosemary, rice blast, integrated management, rosmarinic acid

1 INTRODUÇÃO

Entre os cereais mais consumidos no mundo encontra-se o arroz (*Oryza sativa* L. Poaceae), considerado parte da alimentação básica devido a sua grande importância nutricional, fornecendo 20% da energia e 15% da proteína necessária para o ser humano (Kennedy e Burlingame, 2003; Dos santos et al., 2006). Devido a estas características nutricionais, esta cultura deve ser enfocada quanto a questões de segurança alimentar.

Este grão é consumido em todos os continentes, e é destacado pela área de cultivo e sua produção, desempenhando um importante papel no aspecto econômico e social. São cultivados aproximadamente 150 milhões de hectares de arroz no mundo (Alonço et al., 2005) das quais para o ano 2012 se obteve uma produção aproximada de 738 milhões de toneladas (FAO, 2014).

Cerca de 90% do arroz mundial é consumido e cultivado na Ásia, ocupando a América Latina o segundo lugar em produção e o terceiro em consumo, e o Brasil como o maior produtor fora do continente Asiático (Alonço et al., 2005) com uma produção de 11 milhões de toneladas durante o ano 2012 (FAO, 2014).

O crescimento do consumo deste cereal encontra-se acima de sua produção, havendo grande preocupação em relação à estabilização da mesma (Alonço et al., 2005). Entre os fatores que diminuem a produção do arroz, encontram-se os relacionados à fitossanidade ocasionados por insetos, ácaros, nematóides, bactérias e fungos. Entre as doenças fúngicas destaca-se a brusone causada por *Magnaporthe oryzae* (Barr) Couch [anamorfo *Pyricularia oryzae* (Cav.)] (Prabhu et al., 2009). Mundialmente esta doença é considerada a mais importante na cultura de arroz, devido aos severos ataques que reduzem a área fotossintética da folha (Bastians, 1991; Sester et al., 2014) diminuindo a produção.

Várias medidas são recomendadas para o controle desta doença, principalmente o uso de fungicidas, mas o uso indiscriminado destes produtos geram vários inconvenientes, tais como aumento dos custos de produção, o desenvolvimento de resistência do patógeno, a presença de resíduos em alimentos e, consequentemente,

os riscos na saúde humana e para o ambiente. Isto leva à necessidade de desenvolver novos métodos e estratégias de controle desta doença de modo a manter os rendimentos da produção, não envolver um alto custo ambiental e ser compatível com uma agricultura sustentável.

Uma estratégia que tem sido bem sucedida na redução do uso de produtos sintéticos de alto custo e potencialmente nocivos e perigosos é o Manejo Integrado de Doenças (MID). Dentro desta opção destaca-se o uso de substâncias naturais, considerados mais seguros para a saúde humana e para o ambiente. A aplicação de extratos de plantas e óleos essenciais é um método muito atraente para o controle de doenças de importância agrícola.

1.1 Brusone

O arroz (*Oryza sativa* L.), junto com outros cereais constitui a base da alimentação humana, contribuindo com cerca da metade da ingestão energética e protéica (Young e Pellet, 1994). Na América Latina, o Brasil é o maior produtor de arroz e o nono a nível mundial (FAO, 2004). Dentre os fatores limitantes na produtividade desta cultura, destaca-se a incidência da brusone, causada pelo fungo *Magnaporthe oryzae* (Barr) Couch [anamorfo *Pyricularia oryzae* (Cav.)], que se destaca por ocasionar perdas entre 10 aos 30% nível mundial (Talbot, 2003; Nadales et al., 2014) e perdas de até 100% na produção de arroz de terras altas (Prabhu et al., 2009).

1.1.2 Taxonomia

A fase perfeita ou teleomorfo pertence à classe Ascomicetos, ordem Magnaportales e Magnaporaceae. Os ascósporos são hialinos, fusiformes, com três septos e os ascos unitunicados, não tendo sido, ainda encontrada na natureza. O estágio imperfeito pertence a classe Deuteromicetos e ordem Moniliales (Ellis, 1971).

1.1.3 Morfologia

Os conídios (fase anamorfa) são piriformes, obclavados, com base circular e o ápice fino, levemente escuros ou hialinos, a maioria possui um ou dois septos transversais. Existe uma variação considerável entre os isolados de arroz quanto ao

tamanho dos conídios, variando de acordo com as condições ambientais de sua produção (Asumaya, 1965). As células conidiais são mononucleares e têm, em geral, sete cromossomos (Giatong e Frederiksen, 1969; Xu e Xue, 2002).

1.1.4 Sintomas

Esta doença pode atacar desde o estádio de plântula até a fase de maturação da cultura. A sintomatologia nas folhas inicia-se com a formação de pequenas lesões necróticas, com coloração marrom, que evoluem, aumentando de tamanho, tornando-se elípticas com margem marrom e centro cinza ou esbranquiçado (Figura 1-A). Em condições favoráveis, as lesões coalescem, causando morte nas folhas e, muitas vezes, da planta inteira. Os sintomas nos nós e entrenós aparecem, geralmente, na fase de planta madura. A área infectada do nó torna-se escura, impedindo a circulação da seiva, provocando o acamamento da planta ou a quebra do colmo no ponto de infecção (Figura 1-B). Na fase da emissão da panícula é comum ter infecção da aurícola ou da lígula, principalmente da folha bandeira. A infecção no primeiro nó, abaixo da panícula, é conhecida como brusone do pescoço (Figura 1-C). Varias partes da panícula, como ráquis, ramificações primárias, secundárias e pedicelos, também são infectadas. Os sintomas de brusone nas glumelas não são comuns. Em condições de alta umidade, o fungo esporula nas espiguetas, causando chochamento completo na fase leitosa (Ribeiro, 1984; Webster e Gunell, 1992; Prabhu et al., 1995).



Figura 1. Sintomas da brusone em plantas de arroz: A) na folha, B) de nó e C) de pescoço em arroz irrigado. Fonte: Embrapa Clima Temperado, (2009).

1.1.5 Ciclo da doença

O ciclo inicia-se quando os conídios produzidos nas lesões são disseminados e entram em contato com a superfície das folhas do arroz e são aderidos na folha com auxílio da mucilagem, cuja função principal é permitir a aderência do conídio a qualquer superfície, mesmo debaixo da água (Howard, 1994). Logo após a aderência, os conídios iniciam a germinação com a emissão do tubo germinativo. A germinação do conídio inicia-se após 30 a 90 minutos do contato com a água. Segundo Lee e Dean, (1993) a superfície onde os conídios são depositados tem pouco efeito sobre a germinação, podendo germinar mesmo em suspensão de água. Enquanto o tubo germinativo alonga-se, simultaneamente o núcleo dessa célula submete-se a uma divisão mitótica. Um núcleo permanece no conídio e outro é transferido para o futuro apressório, o qual se separa do tubo germinativo através de um septo; a parede celular do apressório é engrossada por uma camada de melanina e posteriormente adere-se a superfície utilizando uma camada grossa de material adesivo que parcialmente infiltra na cutícula abaixo do apressório imaturo. Este processo completa-se com a emergência da estrutura de penetração *peg*, que rompe a cutícula e entra na epiderme da folha de arroz. A penetração ocorre diretamente na epiderme da folha, logo após a formação do apressório, que exerce força mecânica gerada pela atividade enzimática das reservas acumuladas no conídio (Howard, 1994). A hifa de infecção da origem a hifas secundárias e subsequentes dentro das células da epiderme e do mesófilo, resultando na colonização do tecido invadido e na formação de lesões (Figura 2).

As lesões nas folhas do arroz, são visíveis 72 horas após a inoculação, crescem em tamanho e número até coalescerem. Em 144 horas e sob condições de alta umidade, começam a produzir conídios em abundância, os quais são liberados e dispersos pelo vento, fornecendo o inóculo para um ciclo de infecção subsequente (Prabhu et al., 2006).

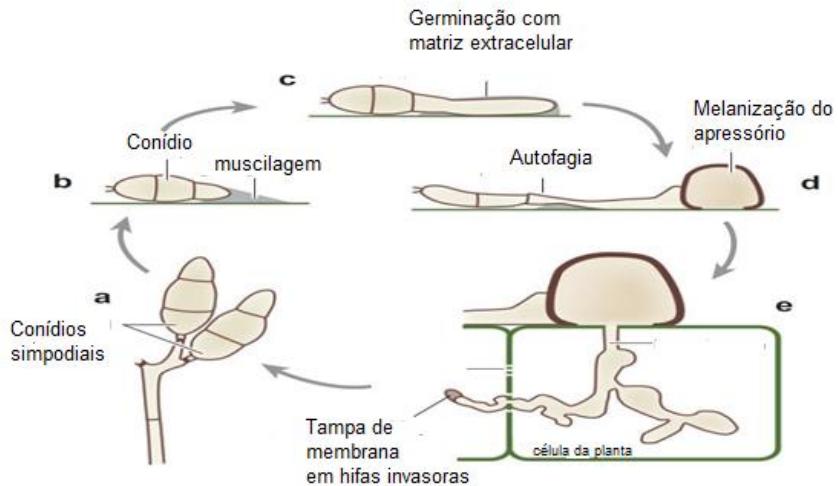


Figura 2. Ciclo da doença de *M. oryzae* (a) Conídios simpodiais sobre os conidióforos. (b) Conídios aderidos a superfície do hospedeiro utilizando mucilagem. (c) Conídios germinados com filamento de hifas revestidas de uma matriz extracelular. (d) apressório melanizado com conteúdos autofagocitados do conídio e tubo germinativo. (e) peg de penetração. A peg de penetração dá origem a hifas de infecção e que ramificam dentro da célula. As hifas invasivas tem uma tampa de membrana composta de lamelas de membrana que pode funcionar na secreção de proteína dentro do citoplasma da célula do hospedeiro. Adaptado de Ebbolle, (2007).

1.1.6 Controle

Para o controle da brusone são recomendadas uma série de medidas, desde o plantio até a colheita como: práticas culturais, uso de fungicidas no tratamento de sementes e aplicação na parte aérea e uso de cultivares moderadamente resistentes (Prabhu et al., 2002).

Kato, (2001) descreve algumas medidas de controle:

O material de resíduo doente da cultura anterior deve ser queimado ou compostado, de outra maneira pode-se tornar uma fonte de inóculo para próximos plantios. Quanto à adubação ou fertilização a quantidade e o tipo de fertilizante devem ser decididos de acordo com a cultivar utilizada, tipo de solo, condições climáticas e risco da doença. Por exemplo, em alguns casos o excesso de nitrogênio estimula o

desenvolvimento da doença. O uso de cultivares resistentes é considerado o método mais econômico do controle da brusone. (Prabhu et al., 2006).

1.1.6.1 Controle químico

O uso de fungicidas continua sendo um componente importante no manejo integrado devido a curta durabilidade da resistência vertical e o aumento gradativo de susceptibilidade das cultivares com resistência parcial, tanto em arroz de terras altas quanto arroz irrigado (Prabhu et al., 2006).

Diversos fungicidas a base de cobre foram utilizados para o controle da brusone desde 1923 no Japão. Devido ao seu efeito fitotóxico esses fungicidas foram utilizados em mistura com acetato de fenil mercúrio após a Segunda Guerra Mundial e a partir dos anos 50, por mais de 15 anos os fungicidas organomercuriais dominaram o mercado no controle da brusone (Prabhu et al., 2006).

Fungicidas sistêmicos vêm substituindo os protetores, como triciclamida, kasugamicina, edifenfos e iprodion (Figura 3). Eles possuem atividade sistêmica a qual é muito importante, porque os fungicidas são absorvidos e translocados para áreas não tratadas para garantir o controle da doença. Além disso, eles não são degradados pelas chuvas após sua aplicação e possuem outra característica importante que é o efeito residual que determina se o fungicida é resistente à degradação biológica e química e se oferece o controle por, aproximadamente, 15 dias após a aplicação. Esta atividade residual é de grande importância para reduzir o número de aplicações (Prabhu et al., 2006).

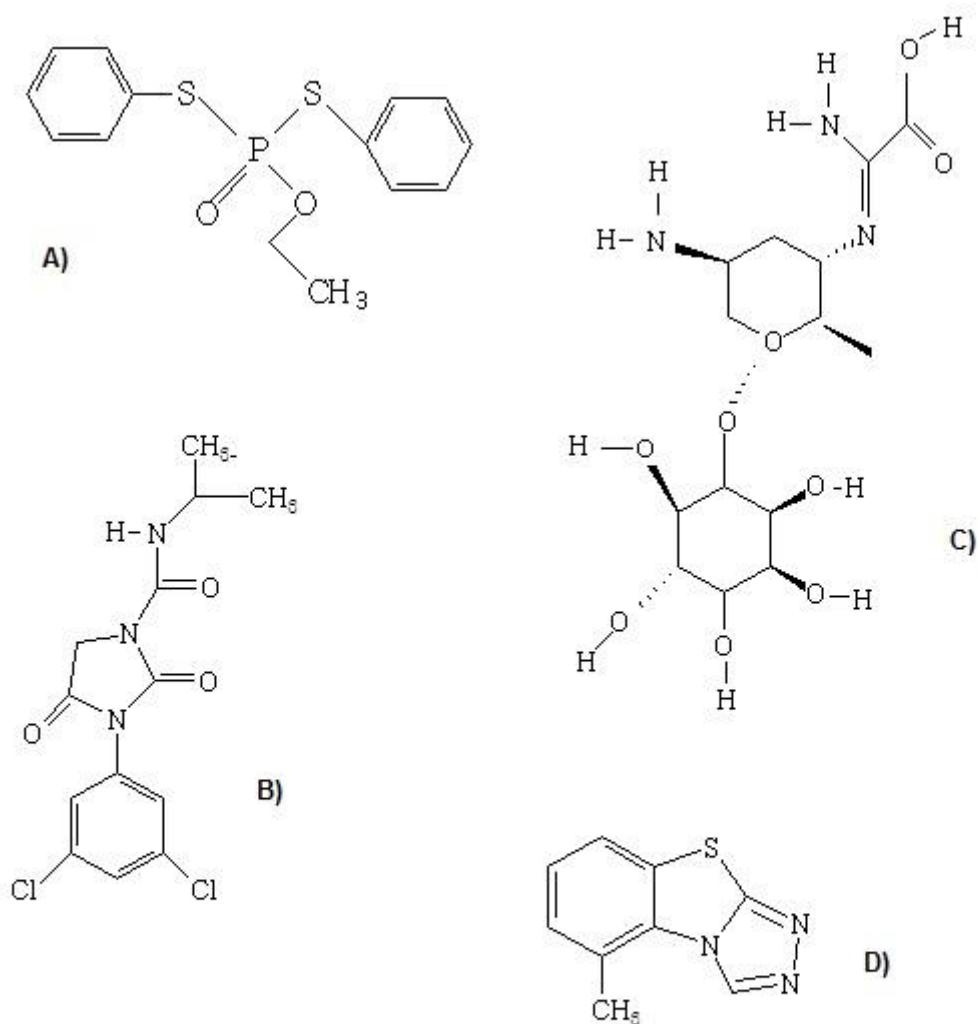


Figura 3. Estruturas químicas dos fungicidas sistêmicos utilizados para o controle da brusone: A) edifenfos, fórmula molecular: $C_{14}H_{15}O_2PS_2$; B) iprodian, fórmula molecular: $C_{13}H_{13}Cl_2N_3O_3$; C) kasugamicina, fórmula molecular: $C_{14}H_{26}ClN_3O_9$ e D) triciclazole, Formula molecular: $C_9H_7N_3S$. Fonte: NCBI, (2015).

Triciclazole é o fungicida mais utilizado no Brasil para o controle da brusone. As principais limitações do uso de fungicidas na agricultura incluem a capacidade de alguns patógenos desenvolverem resistência e a economicidade de seu uso, como acontece com *M. oryzae*. Outras desvantagens incluem a toxicidade aguda, imediata

ou em longo prazo nos seres humanos, na microflora e a outros micro-organismos benéficos (Prabhu et al., 2006).

A aplicação de fungicidas sintéticos para o controle de doenças de grande importância econômica, como a brusone, pode às vezes estimular novas doenças ou doenças de importância secundária (Griffiths, 1981). Utilizou-se o termo doença “iatrogênica” derivado da medicina humana, para as doenças resultantes do uso de um fungicida específico ou que, em função dessa utilização tiveram aumento de severidade (Horsfall, 1972).

Com tudo isto, a procura de métodos alternativos e não sintéticos no controle de doenças na cultura do arroz, como o uso de extratos vegetais e óleos essenciais são necessários para diminuir à dependência excessiva de produtos sintéticos. Alguns estudos tem mostrado a importância dos produtos naturais como uma possível fonte de pesticida não fitotóxica e biodegradável (Singh, 1994; Qasem e Abu-Blan, 1996; Mason e Mathew, 1996). Porém, muitas espécies do reino vegetal ainda não têm sido exploradas para sua utilização na agricultura e em especial para o controle de *M. oryzae* causador da brusone em arroz. Dentro deste contexto é preciso continuar a procura para o desenvolvimento de novos bio-fungicidas a base de plantas para o controle desta doença.

1.2 Alecrim (*Rosmarinus officinalis*)

Rosmarinus officinalis L. (Lamiaceae) conhecido comumente como Alecrim é um arbusto aromático, verde (Orhan et al., 2008; Al-Sereiti et al., 1999) (Figura 4) originária do Mediterrâneo e é cultivada em todo o mundo, (González et al., 2013). As folhas abrigam glândulas contendo óleo essencial (Al-Sereiti et al., 1999) esta planta é usada para condimentar uma variedade de alimentos além de possuir aplicações medicinais (Carvalho-Junior et al., 2004). Dentre as ações farmacológicas de *R. officinalis* tem-se observado atividade hipoglicemizante, inibidor da enzima acetilcolinesterase e α -amilase, sabe-se que melhora a circulação sanguínea local, alivia a dor e tem atividade anticancerígena (Barbosa-Filho et al., 2005; Barbosa-Filho et al., 2006; Funke et al., 2006; Sagorchev et al., 2010; Tsai et al., 2010; Jordán et al., 2012). Do mesmo modo foi

encontrada atividade antimicrobiana sobre alguns fungos e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Alonso, 1998).



Figura 4. *Rosmarinus officinalis* L. cultivado em horta familiar.

Fonte: M.C.H.R. 20/08/2014

1.3 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos voláteis, naturais caracterizados por um forte odor aromático e obtidos a partir de plantas aromáticas como metabólitos secundários (Bakkali et al., 2008).

Eles são líquidos, voláteis, límpidos e raramente coloridos, solúveis em lipídeos e solventes orgânicos e geralmente com densidade mais baixa que da água. Eles podem ser sintetizados por todos os órgãos das plantas, flores, folhas, haste, ramos, sementes, frutos, raízes, madeira e casca, e são armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares (Bakkali et al. 2008).

Na natureza, os óleos essenciais desempenham uma importante função na proteção das plantas como antibacterianos, anti-virais, antifúngicos, inseticidas e também contra herbívoros mediante a redução do apetite sobre tais plantas. Eles também podem atrair alguns insetos para favorecer a dispersão de pólen e sementes, ou repelir outros não desejados (Bakkali et al., 2008).

Aproximadamente 3000 óleos essenciais são conhecidos, 300 dos quais são comercialmente importantes nas indústrias farmacêutica, agronômica, alimentícia, sanitária, cosmética e de perfumaria (Bakkali et al., 2008).

1.3.1 Composição química

Os óleos essenciais são misturas complexas que podem conter em torno de 20-60 constituintes em diferentes concentrações. Eles são caracterizados por dois ou três componentes majoritários em concentrações muitas altas (20-70%) comparados com os outros constituintes presentes em menores quantidades. Geralmente, os componentes majoritários são os que determinam as propriedades biológicas do óleo essencial (Bakkali et al., 2008). A maioria dos óleos essenciais é constituída quimicamente de derivados fenilpropanoides ou de terpenoides (Simões et al., 2007). A composição química do óleo essencial depende das condições climáticas do cultivo, a parte da planta usada, o método de extração empregado (Carvalho-Junior et al., 2004; Svoboda et al., 1992) e a época de coleta.

1.3.2 Efeitos biológicos

Devido ao grande número de constituintes, óleos essenciais parecem não ter alvos celulares específicos (Carson et al., 2002). Os lipófilos típicos passam através da parede celular e da membrana citoplasmática, perturbando a estrutura das diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e os fosfolipídeos. A citotoxicidade parece incluir tais danos na membrana (Knobloch et al., 1989; Sikkema et al., 1994; Helander et al., 1998; Ultee et al., 2000, 2002; Di Pasqua et al., 2006; Turina et al., 2006). Os óleos essenciais podem provocar despolarização das membranas mitocondriais em células eucariotas provocando uma redução do potencial da membrana, afetando o ciclo iônico do Ca^{++} (Ritchter e Schlegel, 1993; Novgorodov e Gudz, 1996; Vercesi et al., 1997) e outros canais iônicos e redução do pH, afetando em bactérias o bombeamento dos prótons e *pool* (acervo/armazenamento) de ATP. Eles mudam a fluidez da membrana resultando a fuga dos radicais livres, citocromo C, íons de cálcio e proteínas, provocando estresse oxidativo e falha bioenergética. A permeabilização externa e interna das membranas mitocondriais conduz a morte celular por apoptose e necrose.

(Yoon et al., 2000; Armstrong, 2006). Parece que as reações em cadeia a partir da parede da célula ou a membrana celular externa invadem toda a célula através das membranas de diferentes organelas tais como as mitocôndrias e peroxissomas. Estes efeitos sugerem uma atividade como pró-oxidante fenólico (Sakagami e Satoh, 1997; Cowan, 1999; Sakagami et al., 1999; Fukumoto e Mazza, 2000; Sakihama et al., 2002; Burt, 2004; Barbehen et al., 2005).

Observações em microscopia eletrônica de transmissão revelaram alterações ultra estruturais de células em vários compartimentos, como a membrana plasmática, citoplasma (inchaço, enrugamento, vacuolacão) e núcleo (Soylu et al., 2006; Santoro et al., 2007a, b). A análise dos perfis lipídicos por cromatografia gasosa e da estrutura do envelope da célula por microscopia eletrônica de varredura de várias bactérias tratadas por alguns dos componentes de óleo essencial, mostrou uma forte diminuição de ácidos graxos insaturados e um aumento em ácidos graxos saturados, bem como alterações dos envelopes celulares (Di Pasqua et al., 2007). A ruptura do envelope viral HSV (Herpes Simplex Virus) por óleos essenciais também pode ser observada por microscopia eletrônica prevenindo as células hospedeiras de infecção (Schnitzler et al., 2007).

Em geral, a atividade citotóxica de óleos essenciais ocorre principalmente devido à presença de fenóis, aldeídos e álcoois (Bruni et al., 2003; Sacchetti et al., 2005). Esta propriedade citotóxica é de grande importância nas aplicações dos óleos essenciais não só contra certos patógenos e parasitas em humanos ou animais, mas também para a conservação dos produtos agrícolas ou marinhos. Óleos essenciais ou alguns dos seus constituintes são realmente eficazes contra uma grande variedade de organismos, incluindo bactérias (Holley e Dhaval, 2005; Basile et al., 2006; Schelzet et al., 2006; Hu "snu" Can Baser et al., 2006), Vírus (Duschatzky et al., 2005), e fungos (Hammer et al., 2002; Velluti et al., 2003, 2004; Serrano et al., 2005; Cavaleiro et al., 2006; Pawar e Thaker, 2006; Soylu et al., 2006).

Em alguns estudos prévios o óleo essencial de *R.officinalis*, apresentou como principais constituintes: 1,8-cineol, cânfora, borneol, acetato de bornila, canfeno, α -

pineno, ρ -cimeno, mirceno, sabineno, β -felandreno, β -pineno e β -cariofileno (Soliman et al., 1994). Dentro destes componentes o 1,8-cineol, pineno, canfeno e cânfora são considerados os responsáveis pela atividade antibacteriana (Shelef et al., 1980; Burt, 2004).

1.4 Extratos vegetais

Os extratos são preparações concentradas obtidas de material vegetal fresco ou seco e são preparados com solventes, que permitem a extração dos princípios ativos (Sales, 2004).

O uso de extratos vegetais tornou-se de grande importância em estudos terapêuticos e farmacológicos, destacando-se alguns exemplos com extratos hidroetanólicos e aquosos de *R. officinalis* com propriedades antioxidantes, como estimulantes (Genena et al., 2008), como liberadores de dopamina (Sozio et al., 2008), com ação diurética (Martínez et al., 2004; Haloui e Lovedec, 2000) e como reguladores de ácidos graxos (Bustanji e Issa, 2010).

Outros estudos mencionam a atividade antimicrobiana do extrato de *R. officinalis* em patógenos humanos como Silva et al., (2008), que descrevem a sensibilidade de bactérias orais planctônicas ao extrato de *R. officinalis*. Neste estudo, as bactérias *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556, *Streptococcus mutans* ATCC 25175 e *Streptococcus sobrinus* ATCC 27609 mediante o método de difusão em meio sólido, foram inibidas pelo extrato de alecrim, apresentando halos de inibição acima de 11 mm de diâmetro. Genena et al., (2007) observaram uma atividade semelhante do extrato de *R. officinalis* em bactérias Gram positivas e bactérias Gram negativas: *S. aureus* e *B. cereus*; *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e atividade antifúngica: *Candida albicans*.

Outros estudos realizados por Itako et al., (2008) mostraram o poder inibitório dos extratos brutos aquosos de *Artemisia camphorata*, *Cymbopogon citratus* e *R. officinalis* nas concentrações de 20 e 40%, sobre a esporulação de *Alternaria solani*, que foi reduzida acima de 90%.

Por outro lado, existem estudos do uso de extratos vegetais na agricultura e alguns autores mencionam que o uso destes extratos se deve que eles conservam

algumas das substâncias sintetizadas no metabolismo secundário das plantas e podem constituir formas de controle alternativo ou preventivo de fitopatógenos, (Stangarlin et al., 2008) seja com ação biológica diretamente contra os patógenos ou induzindo resistência nas plantas, devido as características elicitadoras (Schwan-Estrada et al., 2003).

Algumas das vantagens do uso de extratos vegetais na proteção de plantas, quando comparados com os produtos sintéticos, deve-se a presença de novos compostos, os quais não são reconhecidos pelo patógeno e, por conseguinte não são inativados pelos mesmos, além de possuir um amplo modo de ação e serem rapidamente degradados pelo ambiente (Ferraz, 2008).

1.5 Padronização dos extratos vegetais

As plantas medicinais produzem uma grande quantidade de substâncias químicas como alcaloides, taninos, flavonoides, saponinas, entre outros e em diferentes proporções dependendo de diversos fatores edafo-climáticos e das características genéticas. Algumas destas substâncias são características de uma determinada espécie, servindo como parâmetros para a sua caracterização e identificação (Migliato et al., 2007; Gobbo-Neto e Lopes, 2007).

Os extratos obtidos de plantas medicinais são considerados fitocomplexos por possuírem diversos componentes ativos, isto busca garantir a ação farmacológica específica da espécie vegetal, levando em conta que o isolamento de princípios ativos não reproduz obrigatoriamente o efeito do fitocomplexo.

As drogas vegetais apresentam frequentemente variações relacionadas com os fatores referentes às condições do local de plantio, processo de coleta, manuseio e processamento, justificando a necessidade da caracterização desses produtos (Fischer, 2005).

A padronização é realizada com base no teor de uma substância marcadora presente no extrato, indicando se a mesma estiver presente em quantidade apropriada também os demais componentes estarão igualmente representados (David et al.,

2004). Tal substância não necessariamente apresenta a atividade farmacológica esperada ou para a qual o extrato é empregado.

Existem diferentes métodos para a padronização que incluem técnicas cromatográficas que permitem a quantificação de componentes de interesse e a caracterização química ou físico-química (Sonaglio et al., 1986).

O extrato de *R. officinalis* apresenta em sua composição alguns tipos de compostos fenólicos (Couto et al., 2012), dentre estes o ácido rosmarínico, substância que foi utilizada como marcador no presente trabalho.

1.6 Ácido rosmarínico

O ácido rosmarínico (Figura 5) é um éster do ácido caféico e o ácido 3,4-dihidroxifeniláctico amplamente encontrado no reino vegetal, principalmente na família Lamiaceae. Também tem sido descrito em outras famílias de plantas como Blechnaceae a qual pertence às samambaias (Petersen e Simmonds, 2003).

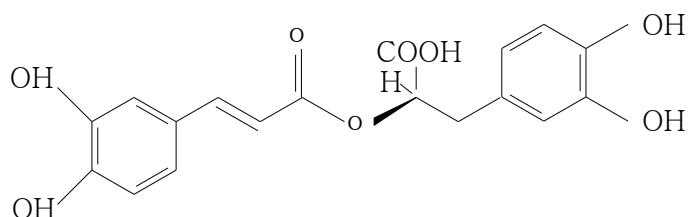


Figura 5. Estrutura química do ácido rosmarínico

O ácido rosmarínico contido no extrato de *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) é usado na terapia de infecções por *Herpes simplex* (Petersen e Simmonds, 2003). Do mesmo modo, algumas atividades biológicas lhe são atribuídas, tais como atividade antiviral, antibacteriana, anti-inflamatório e antioxidante (Petersen e Simmonds, 2003). Também se atribuem efeitos benéficos e promotores na saúde pela presença de ácido rosmarínico em algumas plantas medicinais, considera-se que também atua como composto de defesa pré-formado. (Petersen e Simmonds, 2003).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Padronizar o extrato vegetal de *R. officinalis* a partir do marcador ácido rosmarínico e avaliar seu potencial antimicrobiano para o controle da brusone foliar do arroz *in vitro* e *in vivo*.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterização da matéria prima vegetal.
- Obtenção, caracterização do extrato concentrado das folhas de *R. officinalis*.
- Obtenção e caracterização do óleo essencial das folhas de *R. officinalis*.
- Determinação da atividade inibitória e fungicida do extrato concentrado, do óleo essencial de *R. officinalis* e do marcador ácido rosmarínico sobre o crescimento micelial de *M. oryzae*.
- Determinação da porcentagem de inibição da germinação de conídios e da formação de apressórios de *M. oryzae* pelo extrato e óleo essencial de *R. officinalis* e o marcador ácido rosmarínico, sobre uma superfície hidrofóbica.
- Avaliação da ação do extrato e o óleo essencial de *R. officinalis* L. e do marcador ácido rosmarínico, na membrana plasmática e parede celular de *M. oryzae* por meio de microscopia de fluorescência.
- Avaliação da supressão da severidade da brusone foliar, sob condições controladas em casa de vegetação, do extrato e do ácido rosmarínico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As folhas de *R. officinalis* foram adquiridas na empresa “Paladar” em Goiânia, Goiás. A caracterização do material vegetal e o extrato concentrado de *R. officinalis* foi feita no Laboratório de Produtos Naturais, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás. Os ensaios de atividade antimicrobiana foram conduzidos no laboratório de Fitopatologia da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, Goiás.

3.1 Caracterização do material vegetal

A caracterização do material vegetal e do extrato foi realizada de acordo com os parâmetros estabelecidos na Farmacopeia Brasileira, 5º Edição (2010).

3.1.1 Determinação da perda por dessecção

A determinação da quantidade de substância volátil presente no pó das folhas foi realizada utilizando a balança de aquecimento halógeno. Cerca de 1 g de amostra foi colocada em uma balança marca Ohaus® modelo MB35, posteriormente foi submetida a uma temperatura de 105 °C. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram registrados em percentagem.

3.1.2 Determinação de cinzas totais

Pesou-se 3 gramas de pó de alecrim e colocou-se no cadiño previamente calcinado e tarado, incinerou-se em mufla durante 30 minutos a 200°C, 60 minutos a 400°C e 90 minutos a 600°C até que todo carvão fosse eliminado; posteriormente as amostras foram resfriadas em dessecador e novamente pesadas. O teor de cinzas totais (C_T) foi determinado em percentual pela média de três determinações segundo a equação 1:

$$C_T \left(\% \frac{m}{m} \right) = \left(\frac{mra_2}{mra_1} \right) \times 100 \quad (1)$$

Onde: mra_2 = massa do recipiente mais cinzas;

mra_1 = massa do recipiente mais amostra sem calcinar.

3.1.3 Determinação da granulometria do pó

Utilizou-se um jogo de tamises de aço inox de malhas de 710, 355, 300, 250 e 125 μm , previamente pesados e montados de maneira vertical do maior para o menor. Pesou-se 25 g de amostra de pó em uma balança analítica e em seguida distribuiu-se de maneira uniforme sobre o primeiro tamis. O jogo de tamises foi submetido a vibrações por 15 minutos na plataforma vibratória (Bertel). Posteriormente os tamises foram pesados para saber o peso que ficou retido em cada um deles; o procedimento foi realizado em triplicata e o percentual do pó em relação a cada tamis foi calculado de acordo com as indicações da Farmacopeia Brasileira, 5º Edição (2010).

3.1.4 Determinação do índice de intumescência (II)

Amostras de 1 g de pó de alecrim foram colocadas em provetas de 30 mL com tampa esmerilhada (Triplicata), em seguida foram adicionados 25 mL de água destilada em cada proveta; logo após as provetas foram agitadas por 10 minutos durante 1 hora. Após repouso de 3 horas a temperatura ambiente, foi verificado o volume final ocupado por cada amostra. O II foi calculado em mililitros pela média de três determinações segundo a equação 2:

$$\text{II} = \text{Vf} - \text{Vi} \quad (2)$$

Onde: II = Índice de intumescência

Vf = volume final ocupado pela amostra (mL);

Vi = volume inicial ocupado pela amostra (mL)

3.1.5 Determinação de teor de fenóis totais

Foi utilizado o método de Hagerman e Butler (Mole e Waterman, 1987). Este método se baseia na reação de complexação dos compostos fenólicos presentes na amostra com uma solução de FeCl_3 , que pode ser medida em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 510 nm.

Preparo da curva padrão: pesou-se 100 mg de ácido tânico e transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL, completando-se o volume com 40 mL de metanol a 50% e restante com água destilada. Posteriormente retiraram-se alíquotas de 600, 500, 400, 300, 200 e 100 μ L desta solução, transferiram-se para tubos de ensaio contendo 2 mL de solução de LSS/Trietanolamida e 1 mL de solução de FeCl_3 e completaram-se com água destilada até o volume de 4 mL. Cada ponto foi preparado em triplicata. Deixaram-se repousar durante 15 minutos e depois foram feitas as leituras de absorbância em 510 nm, com os resultados obtidos foi construída uma curva de calibração padrão da absorbância x concentração.

Para o doseamento de fenóis: pesou-se 0,75 g da amostra (pó de alecrim), transferiu-se para um Erlenmeyer de 250 mL e adicionou-se 150 mL de água destilada. Aqueceu até a ebulação e permaneceu em banho-maria entre 80 e 90 °C por 30 minutos. Foi resfriado em água corrente, transferido o conteúdo para um balão volumétrico de 250 mL e completado o volume com água destilada. Depois decantou e filtrou-se o sedimento em papel filtro, os primeiros 50 mL foram desprezados. Para o extrato pesou-se 0,045 g e transferiu-se a um balão de 10 mL que continha água destilada. Cada amostra foi preparada em triplicata. Posteriormente 0,5 mL das amostras foram adicionados em tubos de ensaio contendo 2 mL de solução de LSS/Trietanolamida e 1 mL de solução de FeCl_3 e foram completadas com água destilada até o volume de 4 mL, após 15 minutos de repouso foi realizada a leitura a 510 nm.

3.1.6 Determinação de teor de flavonoides totais

Foi utilizado o método espectrofotométrico descrito por Rolim et al., (2006) baseado na propriedade dos flavonoides em absorver radiação no comprimento de onda de luz ultravioleta (UV) de forma proporcional a sua concentração.

Preparação da curva padrão: pesou-se 10 mg de rutina e transferiu-se para um balão de 100 mL, completando o volume com uma solução de metanol: ácido acético 0,02 M (99:1). Retiraram-se alíquotas de 600, 500, 400, 300, 200 e 100 μ L e foram completadas com água destilada até 2 mL com a solução de metanol: ácido acético.

Foram feitas as leituras da absorbância em 361 nm em triplicata e de acordo os dados obtidos. Foi construída a curva padrão de absorbância x concentração.

Extração de flavonoides do material vegetal e o extrato

Cerca de 0,50 g do pó foi pesado e colocado em um balão de 125 mL, em seguida, adicionou-se 50 mL de uma solução de metanol: ácido acético 0,02M (99:1). O balão foi aquecido em banho-maria sob refluxo a 95°C e posteriormente a solução foi filtrada. Para o extrato pesou-se 0,1052 g e transferiu-se para um balão de 50 mL com água. Tudo isto, em triplicata.

Doseamento de flavonoides totais

Foi extraída uma alíquota de 1950 μ L das amostras do material vegetal e o extrato e o volume foi completado para 2 mL com a solução de metanol: ácido acético 0,02M (99:1). Efetuaram-se as leituras de absorbância em 361 nm. A porcentagem de flavonoides totais foi calculada com a seguinte fórmula:

$$\left| \%Fl_T \left(\frac{m}{m} \right) = C_A \left(\frac{mg}{mL} \right) \times FD \times 10^{-3} \times 10^2 \right| \div mg$$

Onde: C_A =Concentração da amostra utilizando a equação da curva padrão de rutina; FD = Fator de diluição da amostra; 10^{-3} = conversão de mg para g; 10^2 = porcentagem.

3.1.7 Determinação do teor de taninos totais

A metodologia utilizada foi proposta por Hagerman e Butler (Mole e Waterman, 1987) com algumas adaptações. Este método baseia-se na propriedade dos taninos de precipitar em solução aquosa na presença de proteína.

Preparação da curva padrão: Pesou-se 100 mg de ácido tântico e transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL, completando-se o volume com 40 mL de metanol 50% e o restante com água destilada. Retiraram-se alíquotas de 600, 500, 400, 300, 200 e 100 μ L e foram completadas com água destilada até 1 mL. Adicionou-se 2 mL de solução de albumina, aguardaram-se durante 15 minutos e foram centrifugadas a 3000 r.p.m. por 15 minutos. Em seguida desprezou-se o sobrenadante e dissolveu-se

o precipitado com 4mL de LSS/Trietanolamina; posteriormente adicionou-se 1 mL de solução de FeCl_3 e finalmente prosseguiu-se a leitura das amostras construindo uma curva de calibração padrão.

Doseamento de taninos: Pesou-se 0,75 g da amostra (pó de alecrim), transferiu-se para um Erlenmeyer de 250 mL e adicionou-se 150 mL de água destilada. Aqueceu até entrar em ebulação e permaneceu em banho-maria entre 80 e 90°C por 30 minutos. Foi resfriado em água corrente, transferido o conteúdo para um balão volumétrico de 250 mL e completado o volume com água destilada. Depois decantou e filtrou-se o sedimento com ajuda de papel filtro, os primeiros 50 mL foram desprezados. Cada amostra foi preparada em triplicata. Adicionaram-se em tubos de ensaio 1 mL das amostras e 2 mL de albumina, deixaram-se repousar por 15 minutos; após foram centrifugadas, desprezou-se o sobrenadante e foi dissolvido o precipitado 4 mL de solução LSS/Trietanolamina, adicionou-se 1 mL da solução de FeCl_3 ; a mistura deixou-se em repouso por 15 minutos e efetuou-se a leitura da absorbância em 510 mn, no espectrofotômetro.

3.2 Caracterização do extrato concentrado

3.2.1 Obtenção do extrato

O extrato líquido foi obtido através do método de percolação descrito na Farmacopeia Brasileira, 5° edição (2010) com algumas adaptações. Dois quilogramas de pó de alecrim e 15 litros de etanol 80% (v/v) foram misturados e permaneceram em repouso por 12 horas. Posteriormente essa mistura foi transferida a um percolador para o início do processo que teve duração de uma semana; o extrato percolado foi submetido ao processo de concentração em um rotoevaporador (Buchi® – modelo R-220 SE) e posteriormente foi colocado para secar com auxílio de um ventilador durante 12 horas, resultando um teor de sólidos de 43,33%.

3.2.2 Determinação de pH do extrato líquido concentrado

Foi utilizado um potenciômetro (Tecnal – modelo TEC 3-MP) previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0.

3.2.3 Determinação do perfil cromatográfico do pó e extrato líquido concentrado por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

De acordo com a Farmacopeia Portuguesa VIII (2005) pesaram-se 2,5 g da matéria prima vegetal e mediu-se 2,5 mL do extrato líquido concentrado, ambas as amostras foram misturadas com etanol P.A. em balões de 25 mL e colocadas em ultrassom durante 15 minutos, o mesmo procedimento foi realizado para a amostra com o padrão de ácido rosmarínico. Posteriormente, foram postas em uma extremidade da cromatoplaca de alumínio e sílica com auxílio de uma micropipeta. As cromatoplacas foram colocadas dentro de uma cuba de vidro contendo a fase móvel modificada: Diclorometano, acetona e ácido fórmico (80: 15: 5 v/v/v). Os resultados foram observados sob luz ultravioleta a 365 nm.

3.2.4 Quantificação de ácido rosmarínico no extrato concentrado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e validação da metodologia analítica

3.2.4.1 Preparo das amostras

Cerca de 10 mg do extrato e 40 mg da matéria prima vegetal foram pesados e transferidos a um balão volumétrico de 10 mL, posteriormente as amostras foram solubilizadas com etanol 80% (v/v). A solução foi submetida análise por CLAE.

As amostras foram analisadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Waters® – e2695) equipado com bomba quaternária, detector de arranjo de diodos (PDA) 2998 e sistema de processamento de dados *software* Empower 2.0. Foi utilizada uma coluna cromatográfica XTerra® RP18 5µm 4.6 x 250 mm.

3.2.4.2 Determinação das condições cromatográficas

A fase móvel foi constituída de um solvente A – 30% (acetonitrila) e de um solvente B –70% (água ultrapura/acetonitrila/ácido fórmico; 97: 2,5: 0,5% v/v) mantida a um vazão de 0,5 mL min⁻¹ sob condições isocráticas. O comprimento de onda de detecção foi de 329 nm, o volume de injeção foi de 20 µL e o tempo total de análise foi de 15 minutos.

Os parâmetros de *system suitability*: fator de cauda; resolução e número de pratos teóricos foram avaliados conforme especificações do guia de validação de métodos cromatográficos da *Food and Drug Administration* – FDA (CDER, 1994).

3.2.4.3 Validação do método analítico

A fim de verificar a confiabilidade do método, este foi validado quanto aos parâmetros analíticos de seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão (repetibilidade), exatidão e robustez. Estes estudos foram realizados seguindo as diretrizes propostas na resolução – RE nº 899/03 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 2003).

3.2.4.4 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada por meio da identificação do ácido rosmarínico na amostra por comparação dos tempos de retenção da amostra e do padrão.

3.2.4.5 Linearidade

A avaliação da linearidade foi efetuada mediante a obtenção de três curvas padrão, em três dias consecutivos, nas concentrações de: 2,5; 5; 10, 20 e 50 mg.mL⁻¹ do marcador ácido rosmarínico em metanol 80% (v/v). As amostras foram filtradas em membrana de 0,45 µm e injetadas em triplicata no cromatógrafo. O intervalo linear foi determinado mediante o cálculo do coeficiente de variação (CV) entre os pontos da curva e o coeficiente de correlação linear de Pearson (r).

3.2.4.6 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Foram determinados relacionando três curvas padrão e a curva média através das Equações 3 e 4.

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC} \quad (3)$$

Onde: LD = limite de detecção

DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo e de 3 curvas de calibração construídas

IC = inclinação da curva de calibração

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC} \quad (4)$$

Onde: LQ = limite de quantificação

DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo e de 3 curvas de calibração construídas

IC = inclinação da curva de calibração

3.2.4.7 Precisão

A precisão foi avaliada nos níveis de repetibilidade e de precisão intermediária e foi expressa pelo coeficiente de variação (CV%), a equação utilizada foi:

$$CV(\%) = Dp * \frac{100}{CMD} \quad (5)$$

Onde:

Dp: desvio padrão.

CMD: concentração média determinada.

A repetibilidade foi realizada por 6 análises em um mesmo dia e por um único analista e a precisão intermediária foi realizada em dias diferentes e por analistas diferentes.

3.2.4.8 Exatidão

Realizou-se o teste de recuperação do padrão, foram realizadas 3 determinações em três concentrações diferentes: alta (120%), média (100%) e baixa (80%). A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente. As amostras foram injetadas no cromatógrafo em triplicata a uma quantidade de 20 μL posteriormente a exatidão foi calculada por meio da equação:

$$Ex = \frac{CME*100}{CT} \quad (6)$$

Onde: Ex: exatidão; CME: concentração média experimental e CT: concentração teórica.

3.2.4.9 Robustez

Foi avaliada mediante pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Os parâmetros avaliados foram composição da fase móvel, fluxo da fase móvel e temperatura da coluna. A robustez foi expressa pelo coeficiente de variação entre o teor médio na amostra.

3.2.4.10 Determinação do teor de ácido rosmarínico

Foram diluídos 28,9 mg do extrato para 10 mL de solvente (etanol 80% v/v) e submetidos análise CLAE nas condições analíticas descritas no item 3.4.4. O teor foi calculado através da fórmula:

$$T(\%) = (C \times FD \times 100)/m \quad (7)$$

Onde:

T(%): Teor

C: concentração da solução; determinada pela equação da reta da curva padrão (mg/mL)

FD:Fator de diluição da amostra

m: massa do extrato (mg)

3.3 Extração de óleo essencial

A extração de óleo essencial foi realizada de acordo com a Farmacopéia Brasileira 5^a Edição (Brasil, 2010) pelo processo de destilação por arraste de vapor em aparelho de Clevenger.

Pesou-se 200 g de material vegetal de alecrim, transferiu-se para um balão de 6000 mL posteriormente foi aquecido até atingir o ponto de ebulição; após foi ligado ao condensador para levar o processo de destilação. Ao final o volume de óleo foi recolhido no tubo graduado e calculado o rendimento de óleo essencial por 200 g de droga.

3.3.1 Índice de refração do óleo essencial

O índice de refração do óleo essencial foi medido com auxílio de um refratômetro de bancada analógico.

3.3.2 Cromatografia gasosa

O óleo essencial obtido foi enviado ao Laboratório Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do IQ/UFG e submetido à análise cromatográfica, em fase gasosa, acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) em aparelho SHIMADZU QP5050A. Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida (CBP – 5; 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm), com um vazão de 1mL/min de Hélio, como gás de arraste, aquecimento com temperatura programada (60 $^{\circ}\text{C}$ /2min; 3 $^{\circ}\text{C}$ min^{-1} /240 $^{\circ}\text{C}$; 10 $^{\circ}\text{C}$ min^{-1} /280 $^{\circ}\text{C}$; 280 $^{\circ}\text{C}$ /10min), e energia de ionização de 70 e V. O volume de injeção foi de 1 μL da amostra de óleo essencial diluída em CH_2Cl_2 na proporção de 1:5. Os componentes químicos dos óleos essenciais foram identificados por comparação dos espectros de massas e índices de retenção com os relatados na literatura para os componentes mais comuns de óleos essenciais (Adams, 2007). Os índices de retenção foram calculados através da coinjeção de uma mistura de hidrocarbonetos, C9 – C22, e utilização da equação de Van Den Dool e Kratz (1963).

Equação de Van Den Dool & Kratz:

$$\text{IR} = 100 \cdot N [(t_x - t_{n-1}) / (t_n - t_{n-1})] + 100 \cdot C_{n-1} \quad (8)$$

Onde: $N = C_n - C_{n-1}$

C_n = número de carbonos do n -alcano que elui após a substância analisada

C_n-1 = número de carbonos do *n*-alcano que elui antes da substância analisada

t_x = tempo de retenção da substância analisada

t_n = tempo de retenção do *n*-alcano que elui após a substância analisada

t_{n-1} = tempo de retenção do *n*-alcano que elui antes da substância analisada

3.4 Efeitos do extrato e óleo essencial de *R. officinalis* e do marcador ácido rosmarínico no crescimento micelial de *M. oryzae*

3.4.1 Crescimento micelial

Foi utilizada a metodologia de Amadioha, (2000) com algumas modificações.

Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado e, cada ensaio foi composto de 11 tratamentos (Tabela 1), com três repetições; placas de Petri contendo 20 mL de meio de cultura BDA (20 g dextrose, 15 g de ágar e 20 g batata) homogeneizado com as diferentes concentrações do extrato, do óleo essencial + (DMSO 10%) e do ácido rosmarínico + (Etanol a 80%). Os controles consistiram em 19 mL BDA + 1 mL de DMSO (10%) e Etanol 80%, respectivamente (Tabela 1). Discos de 5 mm de *M. oryzae*, isolado BRM29138 (Coleção de Micro-organismos do Laboratório de Fitopatologia, Embrapa Arroz e Feijão) foram transferidos para o centro de cada placa de Petri. As placas foram mantidas em câmara de incubação, a 25 °C, acima de 80% de umidade, durante 10 dias. Os diâmetros das colônias foram determinados com auxílio de um paquímetro digital.

Tabela 1. Concentrações finais dos tratamentos contendo extrato padronizado de *R. officinalis*, o marcador ácido rosmarínico, e óleo essencial, testados como inibidores do crescimento micelial de *M. oryzae*.

Tratamentos	Extrato (mg/mL)	Concentrações finais	
		Ácido rosmarínico (mg/mL)	Óleo essencial (µL/mL)
1	50	1,05	5
2	45	0,94	4,5
3	40	0,81	4
4	35	0,73	3,5
5	30	0,63	3
6	25	0,52	2,5
7	20	0,42	2
8	15	0,31	1,5
9	10	0,21	1
10	5	0,10	0,5
Controle	0	0	0

Para os três testes de inibição micelial, as placas foram mantidas em câmara de incubação, a uma temperatura de 25 °C e umidade relativa acima de 80%. Após 10 dias de incubação avaliou-se o crescimento micelial, medindo os diâmetros das colônias do fungo, com auxílio de um paquímetro digital.

A DL₅₀ foi calculada de acordo com Lagunes, (1994) utilizando regressão simples e o probit foi determinado segundo Finney,(1952).

3.5 Atividade fungicida do extrato e óleo essencial de *R. officinalis* contra *M. oryzae*.

Os discos de *M. oryzae*, dos tratamentos do ensaio de crescimento micelial, que obtiveram 100% de inibição do crescimento foram transferidos para novas placas de Petri contendo meio de cultura BDA sem a presença do extrato, do óleo e foram incubados sob as mesmas condições. Após 10 dias avaliou-se o diâmetro das colônias com o auxílio de um paquímetro digital.

3.6 Efeito do extrato de *R. officinalis*, do ácido rosmarínico e do óleo essencial na germinação e na formação do apressório de *M. oryzae*, sobre uma superfície hidrofóbica

3.6.1 Preparo das concentrações de extrato e de ácido rosmarínico

Foi preparada uma solução estoque de 1 mg/mL de extrato em água que, posteriormente foi centrifugada, durante 5 minutos a 5,000 rpm e o sobrenadante foi utilizado para posteriores diluições (Tabela 2). As diferentes concentrações das soluções de ácido rosmarínico foram preparadas com 10% de etanol a 80% e o volume final foi completado com água (Tabela 2).

3.6.2 Preparo da suspensão de conídios

Foi utilizada a metodologia descrita por Sena et al., (2013) com as seguintes adaptações: após 10 dias de crescimento em meio de aveia do isolado BRM29138 de *M. oryzae* foi estimulada a conidiogênese e deixou-se em câmara úmida sob luz fluorescente durante 48 horas. Os conídios foram coletados das colônias mediante pressão e sucção, com o auxílio de uma micropipeta e água destilada estéril. A concentração da suspensão de conídios foi ajustada a 2×10^5 conídios/mL para todos os tratamentos.

3.6.3 Extrato e ácido rosmarínico

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 8 tratamentos e 2 repetições (Tabela 2). Para cada tratamento, 1 gota, que corresponde ao volume final de 30 μ L, foi composta de 15 μ L de cada concentração do extrato e 15 μ L de suspensão de conídios (2×10^5 conídios/mL). O mesmo ocorreu para o padrão ácido rosmarínico e suas respectivas concentrações. As gotas de 30 μ L foram depositadas sobre uma superfície plástica de 1cm² acondicionadas em câmara úmida (Figura 6).

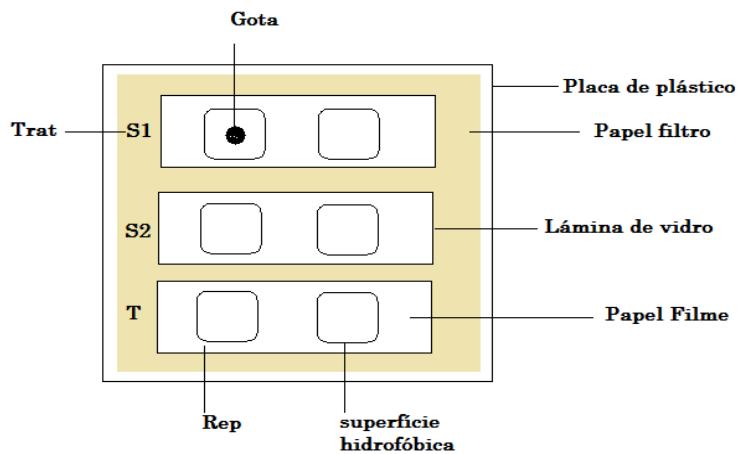


Figura 6. Demonstração ilustrativa do ensaio utilizado para determinar o efeito do extrato e o marcador ácido rosmarínico sobre a germinação e desenvolvimento do tubo germinativo e apressório de *M. oryzae*.

3.6.4 Óleo essencial

Em delineamento experimental inteiramente casualizado, com 5 tratamentos e 2 repetições, cada tratamento foi composto de gotas de 30 μL da suspensão de conídios (2×10^5 conídios/mL), depositada sobre uma superfície hidrofóbica (1 cm^2). Entre duas gotas, diferentes concentrações do óleo essencial (Tabela 2) foram depositadas em um segmento (1 cm^2) de papel filtro e acondicionadas em câmara úmida até o momento das avaliações (Figura 7).

Tabela 2. Concentração final dos diferentes tratamentos contendo extrato de *R. officinalis*, ácido rosmarínico e óleo essencial utilizados na inibição da germinação de conídios e formação do apressório de *M. oryzae*.

Tratamento	Extrato concentrado (mg/mL)	Ácido rosmarínico (mg/mL)	Óleo essencial ($\mu\text{L}/\text{cm}^3$)
1	50	1,05	0,05
2	40	0,84	0,04
3	30	0,63	0,03
4	20	0,42	0,02
5	10	0,21	-
6	5	0,105	-
7	2,5	0,052	-
Controle	0	0	0

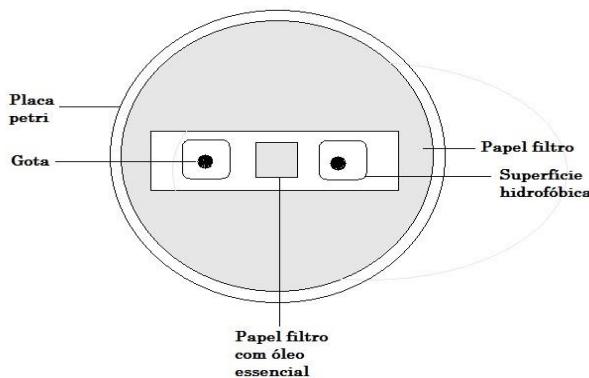


Figura 7. Demonstração ilustrativa do ensaio utilizado para determinar o efeito do óleo essencial de *R. officinalis* sobre a germinação e desenvolvimento do tubo germinativo e apressório de *M. oryzae*.

3.6.5 Avaliações:

As avaliações foram feitas em 4, 6 e 24 horas após o início de cada ensaio; realizaram-se duas leituras por repetição com auxílio de um microscópio estereoscópico em uma resolução de 20X. Os conídios germinados, conídios com apressórios formados e o total de conídios foram quantificados. A porcentagem de conídios germinados e de conídios com apressório formado foi calculada com as seguintes fórmulas:

$$\%G = (Cg \times 100) / Tc \quad (9)$$

$$\%A = (Ca \times 100) / Tc \quad (10)$$

%G: Porcentagem de germinação;

%A: Porcentagem de conídios com apressório formado;

Cg: Número de conídios germinados;

Ca: Número de conídios com apressório formado;

Tc: Número total de conídios;

3.7 Efeito do extrato padronizado e do óleo essencial de *R. officinalis* e do ácido rosmarínico sobre a membrana plasmática e parede celular de *M. oryzae* por microscopia de fluorescência

Seguiu-se a metodologia de Sena et al., (2013) descrita no **item 3.6.2**, para o preparo da suspensão de conídios, e os **itens 3.6.3 e 3.6.4** para o preparo dos tratamentos com extrato, padrão e óleo essencial. Antes da visualização ao microscópio, foi adicionada uma gota de calcoflúor White 0,01% (Côrtes et al., 2014), em cada tratamento, seguido de 30 minutos de repouso. Os tratamentos são demonstrados na Tabela 3.

A avaliação foi qualitativa observando se os conídios apresentavam ou não fluorescência em cada tratamento. As imagens foram captadas por câmera digital DXM 1200, acoplada ao microscópio com contraste de fases Nikon® modelo elipse 80i, aumento de 400 vezes e software ACT-1C.

Tabela 3. Concentração final dos diferentes tratamentos no teste de efeito do extrato padronizado e do óleo essencial de *R. officinalis* e do ácido rosmarínico sobre a membrana plasmática e parede celular de *M. oryzae* por microscopia de fluorescência.

Tratamentos	Extrato concentrado (mg/mL)	Ácido rosmarínico (mg/mL)	Óleo essencial (µL/cm ³)
1	50	1,05	0,05
2	40	0,84	0,04
3	30	0,63	0,03
4	20	0,42	0,02
5	5	0,105	
6	2,5	0,052	
Controle	0	0	0

3.8 Supressão da Brusone foliar (*M. oryzae*) em arroz, com extrato de alecrim (*R. officinalis*) e o ácido rosmarínico, sob condições controladas em casa de vegetação.

3.8.1 Plantio

A cultivar “BRS Primavera” foi semeada em bandejas plásticas, contendo 3 kg de solo, previamente adubado com 1 g de sulfato de zinco, 3 g de sulfato de amônio e 5 g NPK. Cada bandeja continha oito sulcos de 4 cm de comprimento, com aproximadamente 20 sementes (Figura 8). Após 20 dias de semeadura, realizou-se uma adubação de cobertura com 2 g/bandeja de sulfato de amônio (Prabhu et al., 2006).



Figura 8. Bandeja semeada com sementes do cultivar “BRS Primavera” em solo adubado. Fonte: M.C.H.R. 12/03/2014.

3.8.2 Suspensão de conídios de *M. oryzae*

A suspensão de conídios foi obtida conforme o item 3.6.2, porém, a concentração final foi ajustada para 3×10^5 conídios. mL^{-1} .

3.8. 3 Tratamentos na casa de vegetação

Dois ensaios (com extrato de *R. officinalis* e ácido rosmarínico) foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado, com 7 tratamentos e 3 repetições cada um (Tabela 4). Os tratamentos consistiram na aplicação de 30 mL de uma solução, composta de 15 mL de suspensão de conídios de *M. oryzae* e 15 mL de cada concentração do extrato ou do ácido rosmarínico (Figura 9). Para a obtenção das

concentrações testadas neste bioensaio foram realizados estudos prévios não apresentados neste trabalho. .

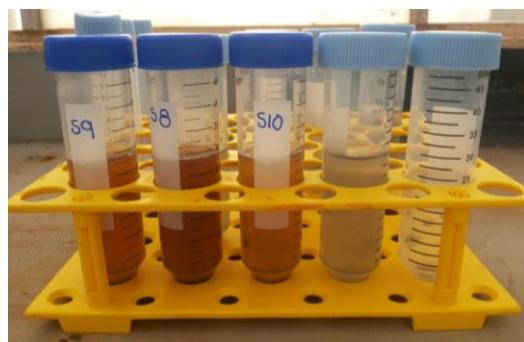


Figura 9. Suspensão de conídios de *M. oryzae* homogeneizados com extrato de *R. officinalis*, compõe os tratamentos para a pulverização das folhas de arroz.

Tabela 4. Concentração e volume final das suspensões de inóculo dos 7 tratamentos com extrato de alecrim.

Tratamentos	Suspensão de conídios a 3×10^5	Extrato concentrado (mg/mL)	Ácido rosmarínico (mg/mL)
Controle	30 mL	0	0
1	15 mL	50	2,1
2	15 mL	100	4,2
3	15 mL	150	6,3
4	0	50	2,1
5	0	100	4,2
6	0	150	6,3

3.8.4 Inoculação por pulverização foliar

Para cada um dos ensaios (extrato e ácido rosmarínico), a inoculação foi realizada aos 21 dias após o plantio, com a ajuda de um pulverizador Black&Decker IC500-BR Tipo 1 ligado a um compressor. Cada tratamento foi composto de 3 repetições (bandejas), que foram transferidas para dentro de uma gaiola de plástico, com esquadrias de alumínio revestido (Figura 10).

Após a pulverização das folhas, as gaiolas foram cobertas e incubadas a aproximadamente 100% de umidade a 25°C, durante 24 horas. Durante 7 dias

restantes, as gaiolas mantiveram-se descobertas em temperaturas de 25-27°C, a umidade acima de 80 (Prabhu et al., 2006). A avaliação da severidade da doença foi realizada 7 dias após inoculação utilizando a escala diagramática de Notteghem, (1981)..

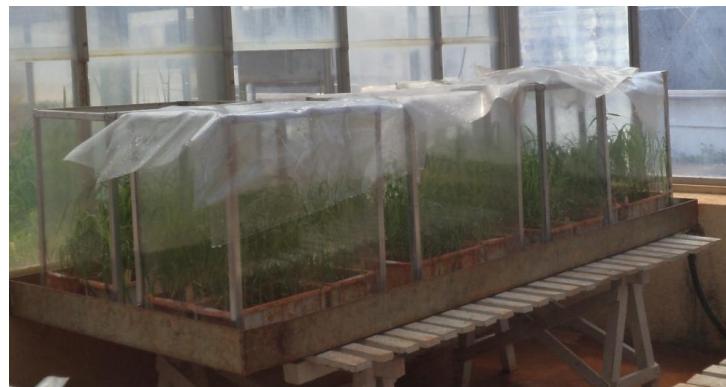


Figura 10. Disposição dos tratamentos após ser inoculados com *M. oryzae*, na casa de vegetação. Fonte: M.C.H.R. 10/04/2014

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abedini, A., Roumy, V., Mahieux, S., Biabiany, M., Standaert-Vitse, A., Rivière, C., Sahpaz, S., Bailleul, F., Neut, C., Hennebelle, T. Rosmarinic Acid and Its Methyl Ester as Antimicrobial Components of the Hydromethanolic Extract of *Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.** 2013, v. 2013, p. 2-11
- Adams, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography, Mass Spectroscopy, 4th ed., Allured: Carol Stream. 2007.
- Alonço, A.S., Santos, A.B., Gomes, A.S., Grutzmancher, A.D., Andrés, A., Prabhu, A.S. cultivo do arroz no Brasil. Sistema de produção 3. 2005.
- Alonso, J.R. Tratado de fitomedicina: Bases clínicas y farmacológicas. Isis: Buenos Aires. 1998.
- Al-Sereiti, M.R., Abu-Amer, K.M., Sen, P.. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. **Indian J Exp Biol.** 1999. v 37: p. 124-130.
- Amadioha, A.C. Controlling rice blast *in vitro* and *in vivo* with extracts of *Azadirachta indica*. **Crop protection**, v. 19, p. 287-290. 2000.
- Amarante, Jr., O. P. de; Caldas, E. P. A.; Brito, N. M.; Santos, T. C. R. dos; Vale, M. L. B. F. Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. **Cad. Pesq.**, 2001. v. 12, p. 116-131.
- Armstrong, J.S. Mitochondrial membrane permeabilization: thesine qua non for cell death. **Bio Essays.** 2006. v 28, p. 253–260.
- Asumaya, H. Morphology, taxonomy, host range, and life cycle of *pyricularia oryzae*. In: INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. **The rice blast disease**. Baltimore: Johns Hopkins. 1969. p. 9-22.

Bahraminejad, S., Abbasi, S., Fazlali, M. In vitro antifungal activity of 63 Iranian plant species against three different plant pathogenic fungi. **African Journal of Biotechnology.** 2011, v. 10 (72), p. 16193-16201.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M.. Effects of essential oils-A review. **Food and chemical toxicology.** 2008, v. 46, p. 446-475.

Barbehenn, R., Cheek, S., Gasperut, A., Lister, E., Maben, R. Phenolic compounds in red oak and sugar maple leaves have prooxidant activities in the mid gut fluids of *Malacosoma disstria* and *Orgyia leucostigma* caterpillars. **J. Chem. Ecol.** 2005. V. 31, p. 969–988.

Barbosa-Filho J.M., Vasconcelos, T.H.C., Alencar, A.A., Batista, L.M., Oliveira, R.A.G., Guedes, D.N., Falcão, H.S., Moura, M.D., Diniz, M.F.F.M., Modesto-Filho, J. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. **Rev. Bras. Farmacogn.** 2005. V. 15, p. 392-413.

Barbosa-Filho, J.M, Medeiros, K.C.P., Diniz, M.F.F.M., Batista, L.M., Athayde-Filho, P.F., Silva, M.S., Cunha, E.V.L., Almeida, J.R.G.S., Quintans-Júnior, L.J. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Ver. Bras. Farmacogn.** 2006. v 16, p. 258-285.

Basile, A., Senatore, F., Gargano, R., Sorbo, S., Del Pezzo, M., Lavitola, A., Ritieni, A., Bruno, M., Spatuzzi, D., Rigano, D., Vuotto, M.L.. Antibacterial and antioxidant activities in *Sideritis itálica* (Miller) Greuter et Burdet essential oils. **J. Ethnopharmacol.** 2006, v. 107, p. 240–248

Bonaldo, S.M.; Pascholati, S.F., Romeiro, R.S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: Cavalcanti, L.S., Di Piero, R.M., Cia, P., Pascholati, S.F., Resende, M.L.V., Romeiro, R.S. Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos: Piracicaba. 2005. FEALQ, p. 11-28.

Borkowski B, Biesiadecka A. Activity of caffeic, chlorogenic and rosmarinic acids (in Polish). **Herba Pol.** 1996, v 42: p. 317-321

Brasil. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 jun. 2003. Seção 1, p. 56.

Brito, N. M. Resíduos de pesticidas organoclorados (OC) e organofosforados (OF) em matriz de coco: metodologia e aplicação. São Paulo,. Dissertação (Mestrado em Química Analítica), Universidade Estadual Paulista, 2001.

Brito, N.M., AmaranteJúnior, O. P., Polese, L., Riberio, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**. 2003. v. 13, p. 129-146.

Bruni, R., Medici, A., Andreotti, E., Fantin, C., Muzzoli, M., Dehesa, M.,. Chemical composition and biological activities of Isphingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. **Food Chem.** 2003, v.85, p. 415–421.

Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods .a review. **International Journal of Food Microbiology**. 2004. v. 94, n. 3, p. 223-253.

Bustanji, Y. & A. Issa. Inhibition of hormone sensitive lipase and pancreatic lipase by *Rosmarinus officinalis* extract and selected phenolic constituents. **Journal of Medicinal Plants and Research**. 2010. v 4(21), p. 2235-2242.

Carson, C.F., Mee, B.J., Riley, T.V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrob. Agents Chemother.** 2002. V 46, p. 1914–1920.

Carvalho-Junior, R. N., Rehder, V. L. G., Sartoratto, A., Santos, A. S., Meireles, M. A. A. Comparison of the global yield and chemical composition of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extracts obtained by hidrodistillation and SFE. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS, 2004, Florianópolis. **Caderno de Resumos do V EBFS**. Florianópolis: EQA/CTC/UFSC,. 81 p.

Carvalho, P.R.S. Extratos vegetais: potencial elicitador de fitoalexinas e atividade antifúngica em antracnose do cajueiro. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Tese (doutorado) Jaboticabal – São Paulo – Brasil, 2010.

Caalcanti, L.S., Brunelli, K.R., Stangarlin, J.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida: In: Caalcanti, L.S., Di Piero, R.M., Cia, P., Pascholati, S.F., Resende, M.L.V., Romeiro, R.S. Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos: Piracicaba. 2005. FEALQ, p. 11-28.

Cavaleiro, C., Pinto, E., Goncalves, M.J., Salgueiro, L. Antifungal activity of Juniperus essential oils against dermatophyte, Aspergillus and Candida strains. **J. Appl. Microbiol.** 2006, v.100, p. 1333–1338

Chung, K.T., Lu, Z. Chou, M.W. Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bactéria. **Food and chemical toxicology**, v. 36, p. 1053-1060, 1998.

Côrtes, M.V.C.B., Silva, L.V.L., Filippi, M.C.C., Lima, D.C.S. e PRABHU, A.S. Potential for using crude extract of *Sarocladium oryzae* for suppression of rice blast. **Tropical Plant Patholgy**. 2014. v. 39, p. 28-34.

Couto, R.O, Conceição, E. C., Chaul, L. T., Oliveira, M.S.E., Alves, S. F., Rezende, K. R., Bara, .M.T. F., Paula, R.J. Validated HPLC-PDA Method For Rosmarinic Acid Quantification in Rosemary. **Lat. Am. J. Pharm.** 2011, v.30, p. 1951-6

Couto, R.O, Conceição, E. C., Chaul, L. T., Oliveira, M.S.E., Martins, F.S. Rezende, K. R., Bara, .M.T. F., Alves, S. F., Paula, R.J. 2012. Spray-dried rosemary extracts: physicochemical and antioxidant properties. **Food chemistry**. V, 131, p. 99-105.

Currie, L.A. Detection and quantification limits: origins and historical overview. **Anal. Chim. Acta**. 1999. v. 391, p. 127-134.,

Davicino, R., M.A. Mattar, Y.A. Casali, S. Graciela, E. Margarita, and B. Micalizzi. Antifungal activity of plant extracts used in folk medicine in Argentina. **Revista Peruana de Biología**. 2007. V. 14, p. 247-251.

David, J.P.L., Nascimento, J.A.P., David, J.M. Produtos fitoterápicos: uma perspectiva de negócio para a indústria, um campo pouco explorado pelos farmacêuticos. **Infarma**. 2004, v. 16, p. 6-71.

Díaz, D.P., Cabrera, A., Alem, D., Larrañaga, P., Ferreira, F. and Dalla, R.M. Antifungal activity of medicinal plant extracts against phytopathogenic fungus *alternaria* spp. **Chilean journal of agricultural research**. 2011. v 7, p 231-239.

Di Pasqua, R., Hoskins, N., Betts, G., Mauriello, G., Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addiction of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. **J. Agric. Food Chem.** 2006., v. 54, p. 2745– 2749.

Di Pasqua, R., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D., Mauriello, G. Membrane toxicity of antimicrobial compoundsfrom essential oils. **J. Agric. Food Chem.** 2007. V 55, p. 4863–4870.

Dolan A, McNicol RJ Staining conidia of *Botrytis cinerea* with Calcofluor white PMS and its effects on growth and pathogenicity to raspberry. **Transactions of the British Mycological Society** .1986, v.87, p. 316-320

Dos Santos, A.B., Stone, F. L., Vieira, N.R.A. A cultura do arroz no Brasil. 2 edição. Embrapa arroz e feijão. 2006.

Duschatzky, C.B., Possetto, M.L., Talarico, L.B., Garcia, C.C., Michis, F., Almeida, N.V., De Lampasona, M.P., Schuff, C., Damonte, E.B. Evaluation of chemical and antiviral properties of essential oilsfrom South American plants. **Antivir. Chem. Chemother.** 2005. V 16, p. 247–251.

Ebbole, J.D. Magnaporthe as a Model for Understanding Host-Pathogen Interactions. **Annu. Rev. Phytopathol.** 2007. v 45, p. 437–56.

Ellis, M.B. 1971. *Dematiaceus* hyphomycetes. Kew: CMI,. 608 P.

Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.
http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/sistemas/sistemas17/cap8_manejo_de_doenças.htm acessado 14/07/2014.

Farmacopeia Brasileira, 5 Edição. v.1 e 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária.: Anvisa, 2010, p. 546.

Farmacopeia Portuguesa VII. Edição official. V. 1. 2002.

FAO. Human vitamin and mineral requirements. Report of a joint FAO/WHO expert consultation. Rome: FAO: WHO, 2004. Disponível em: <http://www.fao.org/agriculture/crops/mapa-tematica-del-sitio/theme/treaties/irc/es/> Acesso em: 23 junho 2014.

FAO. <http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx> Acesso em dezembro, 2014.

Ferraz, S.; Lopes, E. A.; Amora, D. X. Controle de fitonematoídes com o uso de extratos e óleos essenciais de plantas. In: POLTRONIERI, L. S.; ISHIDA, A. K. N. (Ed). Métodos alternativos de controle de insetos-praga, doenças e plantas daninhas. Panorama atual e perspectivas na agricultura. Belém: EMBRAPA Amazônia Oriental, 2008. 308. p.

Fischer, D.C.H. Controle de qualidade de matérias-primas vegetais e produtos fitoterápicos. In: Gil ES, Orlando RM, Matias R, Serrano SHP. Controle físico-químico de qualidade de medicamentos. Campo Grande: Editora Uniderp, 2005.

Francotte, E., Davatz, A., Richert, P. Development and validation of chiral high-performance liquidchromatographic methods for the quantitation of valsartan and of the tosylate of valinebenzyl ester. **J. Chromatogr. B.** 1996. v. 686, p. 77-80.,

Funke, I. and Melzig, M.F. Traditionally used plants in diabetes therapy - phytotherapeutics as inhibitors of α -amylase activity. **Rev Bras Farmacogn.** 2006. v 16, p. 1-5.

Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Astaneh, S.A., Rasool, I.. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. **Food Chemistry**, 2007. v.102, n.3, p.898-904.

Gaedcke, F., Steinhoff, B. *Phytopharmaka*. Stuttgart: Wissenschaftliche, 2000.

Genena, K.A., H. Hense, J.A. Smania & M.A.S. Souza. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*L.) a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**. 2008. v 28 (2), p 463-469.

González, A. G., Herrador, M. A., Asuero, A. G. Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays. **Talanta**. 1999. v. 48, p. 729-736.

González, M.A., Cruz, F.A. Vega, M.J.E. Guía técnica del cultivo de Romero (*Rosmarinus officinalis*). **Centro de investigaciones tecnológicas del Noroeste, S.C.** 2013. p 1-65.

Griffiths, E. Iatrogenic plant disease. **Annual Review of phytopathology**. 1981. v. 19, p. 69-82.

Haloui, M. & Lovedec, L. Experimental diuretic effects of *Rosmarinus officinalis* and *Centaurium erythraea*. **Journal of Ethnopharmacology**. 2000. v 71(3), p. 465 472.

Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V.,. In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi. **J. Antimicrob. Chemother.**.. 2002, v.50, p. 195–199.

Harborne, J.B., Williams, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v.55, p. 481-504, 2000.

Harborne, J.B. (Ed). The flavonoids-advances in research since 1980. London: Chapman and Hall, 1988. Methods in plant biochemistry. Plant phenolics. London: academic, 1989.

Helander, I.M., Alakomi, H.L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G.M., Von Wright, A., Characterization of the action of selected essential oil components on Gramnegative bacteria. **J. Agric. Food Chem.** 1998, v. 46, p. 3590–3595.

Holley, R.A., Dhaval, P., Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiol.** 2005, v. 22, p. 273–292

Horsfall, J.G. Selective chemicals for plant disease control. In: NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (Estados Unidos). **Pest control: strategies for the future.** 1972. Washington, p. 216-225.

Howard, R.J. Cell biology of pathogenesis in: Zeigler, R.S.; Leong, S.A.; Teng, P.S. (Ed). **Rice blast disease.** 1994. Wallingford: CAB International. p 3-22.

Huber, L. Validation of analytical methods: review and strategy. LC/GC International, 1998. p. 96-105.

Hu"snu" Can Baser, K., Demirci, B., Iscan, G., Hashimoto, T., Demirci, F., Noma, Y., Asakawa, Y., The essential oil constituents and antimicrobial activity of *Anthemis aciphylla* BOISS.var. *discoidea* BOISS. **Chem. Pharm. Bull.** 2006. v 54, p. 222–225.

Ihrig, M., Blume, H. Zur Beurteilung von Phytopharmaka aus pharmazeutischer Sicht. **Pharm. Ztg.** v. 137, n.36, p. 2715-2725, 1992.

ISO. International Standards Organization. **ISO 5725:** accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Géneve., Part 1-4, 6. 1994.

Itako, A.T., Schwan-Estrada, K.R.F., Júnior, J.B.T., Stangarlin, J.R., Cruz, S. M.E. Atividade antifúngica e proteção do tomateiro por extratos de plantas medicinais. **Tropical Plant Pathology.** 2008. V 33, p. 241-244.

Itako, A.T., Schwan-Estrada, K.R.F., Júnior, J.B.T., Stangarlin, J.R., Cruz, S. M.E. Controle de *Cladosporium fulvum* em tomateiro por extratos de plantas medicinais. **Arq. Inst. Biol.** 2009. v.76, n.1, p.75-83.

Jamshidi, R., Afzali, Z. and Afzali, D. Chemical Composition of Hydrodistillation Essential Oil of Rosemary in Different Origins in Iran and Comparison with Other Countries. **American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.** 2009. v 5, p. 8-78.

Jordán, M.J., Lax, V., Rota, M.C., Lorán, S., Sotomayor, J.A. Relevance of Carnosic Acid, Carnosol, and Rosmarinic Acid Concentrations in the in Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Rosmarinus officinalis*(L.) Methanolic Extracts. **J. Agric. Food Chem.** 2012, v. 60, p. 9603–9608.

Kato, H. Rice blast control. **The Royal Society of Chemistry**. 2001. p 23-25

Kuhn, O.J., Portz, R.L., Stangarlin, J.R., Montalván, R., Schwan-Estrada, K.R.F., Franzener, G. Efeito do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*) em *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Semina ciências Agrárias**, 2006. v.27, n1, p. 13-20.

Fukumoto, L.R., Mazza, G., Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. **J. Agric. Food Chem.** 2000, v. 48, p. 3597– 3604

Genena, A.K. Extração e caracterização do extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): estudo de sua ação antioxidante. Dissertação (Pós-graduação). Universidade Federal de Santa Catarina. 2007.

Giatong, P., Frederiksen, R.A. Pathogenic variability and citology of monoconidial subcultures of *Pyricularia oryzae*. **Phytopathology**, 1969, v. 59, n.8, p. 1152-1157.

Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, B., Weigand, H., Weis, N., Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. **J. Essen. Oil Res.** 1989, v. 1, p. 119–128.

Kunicka-Styczyn, A., Sikora, M., Kalemba, D. Antimicrobial activity of lavender, tea tree and lemon oils in cosmetic preservative systems. **Journal of Applied Microbiology**. 2009. v. 107, p. 1903–1911.

Lee, Y.H. and Dean, R.A. Camp regulates infection structure formation in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. **The plant cell**. 1993. v.5, n.6, p. 693-700.

Maroto, A., Riu, J., Boqué, R., Rius, F. X. Estimating uncertainties of analytical results using informations from the validation process. **Anal. Chim. Acta**. 1999. v. 391, p. 173-185.

Martínez, M.S., Naranjo, L.P. y Jose, N.R.. Actividad diurética y antipirética de un extracto fluido de *Rosmarinus officinalis* L. en ratas. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**. 2004. v 9, p. 1-6.

Medice, R. Alves, E. Assis, R.T. Júnior, R.G.M. Lopes, E.A.G.L.. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. **Ciênc. agrotec., Lavras**. 2007, v 31, n. 1, p. 83-90

Migliato, K.F., Moreira, R.R.D., Mello, J.C.P., Sacramento, L.V.S., Correa, M.A., Salgado, H.R.N., Controle de qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Rev Bras Farmacogn**. 2007. v .17, p. 94-101.

Mole, S.A., Waterman, P.G. A critical analysis techniques for measuring tannins in ecological studies. **Oecologia**.1987, v. 72, n.1. p 137-147.

Nadales, E.P.; Nogueira, M.F.A.; Baldin, C.; Castanheira, S.; Chalid, M.E.; Grund, E.; Lengeler, K.; Marchegiani, E.; Mehrotra, P. V.; Moretti, M.; Naik, V.; Osse-Ruiz, M.; Oskarsson, T.; Schafer, K.; Wasserstrom, L.; Brakhage, A.A.; Gow, N.A.R.; Kahmann, R.; Lebrun, M.H.; Pérez-Martin, J.; Di Pietro, A.; Talbot, N.J.; Toquin, V.; Walther, A. and Wendland, J. Fungal Genetics and Biology. Review. **Science Direct**. 2014. V, 70. P. 42-67.

NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound/> acesso 23/01/2015.

Nijhuis, A., Knaap, H. C. M. Van der; Jong, S. de; Vandeginste, B. G. M. Strategy for ruggedness tests in chromatographic method validation. **Anal. Chim. Acta**. 1999. v. 391, p. 187-202.

Notteghem, J. L. Cooperative experiment on horizontal resistance to rice blast. In: INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE (Los Baños, Philippines). Blast and

upland rice: report and recommendations from the meeting for international collaboration in upland rice improvement. Los Baños, 1981. p. 43-51.

Novgorodov, S.A., Gudz, T.I.,. Permeability transition pore of the inner mitochondrial membrane can operate in two open states with different selectivities. **J. Bioenerg. Biomembr.** 1996, v. 28, p. 139–146.

Oliveira, B.K. Determinação do ácido rosmariníco em *salvia officinalis* L., Lamiaceae, e avaliação de sua toxicidade e influência na melanogênese. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná. 2010.

Orhan, I.; Aslan, S.; Kartal, M.; Sener, B.; Baser, K. H.C.; Inhibitory effect of Turkish *Rosmarinus officinalis* L. on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes. **Food Chemistry** , 2008. v, 108, p. 663–668.

Pawar, V.C., Thaker, V.S., *In vitro* efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*. **Mycoses**. 2006,.v. 49, p. 316–323

Petersen, M. and Simmonds, M. S. J. Molecules of interest Rosmarinic acid. **Phytochemistry**. 2003. v 62, p. 121-125.

Pintore, G., Usai, M., Bradesi, P., Juliano, C., Boatto, G., Tomi, F., Chessa, M., Cerri, R. and Casanova, J. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. **Flavour Fragr.** 2002. v 17, 15–19.

Pitarokili, D., O. Tzakou & A. Lookis. Composition of the essential oil of spontaneous *Rosmarinus officinalis* from Greece and antifungal activity. **Phytopathogenic**. 2008. V. 19(2), p. 451-454.

Prabhu, A.S., Filippi, M.C.C. Biologia e genética de *Pyricularia grisea*: in: Prabhu, A.S., Filippi, M.C.C. Silva, G.B., Araújo, L.G. Brusone do arroz: controle genético, progresso e perspectivas. Santo Antônio, Goiás. **Embrapa**. 2006, p. 17-55.

Prabhu, A.S., Bedendo, I.P., Filippi, M.C. Principais doenças do arroz no Brasil. 3. Ed. rev atual. Goiânia: **EMBRAPA-CNPQ**. 1995. p,43.

Prabhu, A.S., Filippi, M.C., Silva, G.B., Silva-Lobo, V.L. and Morais, O.P.. An Unprecedented Outbreak of Rice Blast on a Newly Released Cultivar BRS Colosso in Brazil. In: Wang GL and Valent B (Eds.) *Advances in Genetics, Genomics and Control of Rice Blast*. **Springer Science**. 2009 , p. 257-267

Prabhu, A.S., Filippi, M.C., Silva, G.B. Santos, G.R. Resistência de cultivares de arroz a *Rhizoctonia solani* e *Rhizoctonia oryzae*. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, 2002. v. 37, n.5, p 589-595.

Prabhu, A.S. e Filippi, M.C. Ocorrência do mal-do-pé causado por *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis*, uma nova enfermedade em arroz no Brasil. **Fitopatologia brasileira**. 2002. v.27, n.4, p 417-419.

Reis, B.K. Extrato padronizado de ruta graveolens L avaliação de seu potencial no controle da brusone em arroz. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Go, Brasil. 2013..

Ribeiro, A.S. Compatibilidade do arroz com Pyricularia de outras gramíneas. **Pesquisa agropecuária Brasileira**. 1984, v. 16, n. 2, p. 209-212.

Richter, C., Schlegel, J.,. Mitochondrial calcium release induced by prooxidants. **Toxicol. Lett.** 1993, v. 67, p. 119–127.

Rodrigues, E., Schwan-Estrada, K.R.F., Fiori, A.C.G., Stangarlin, J.R., Cruz, M.E.S. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de alface em Sistema de cultivo orgânico contra *Sclerotinia sclerotiorum* pelo extrato de gengibre. 2006. Summa phytopathologica.

Rolim, A., Oishi, T., Maciel, C.P.M., Zague, V., Pinto, C.A.S.O., Kaneko, T.M., Consiglieri, V.O., Velasco, M.V.R. Total flavonoids quantification from O/W emulsion with extract of Brazilian plants. **International Journal of Pharmaceutics**. 2006, v. 308, p. 107–114.

Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglanti, M., Manfredini, S., Radice, M., Bruni, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in food. **Food Chem.** 2005. V 91, p. 621–632.

Sahin, F.; Gulluce, M.; Daferera, D.; Sokmen, A.; Sokmen, M.; Polissiou, M.; I.. **Food Control.** 2003. V. 56, p. 2-9,

Sakagami, H., Satoh, K.,. Prooxidant action of two antioxidants: ascorbic acid and gallic acid. **Anticancer Res.** 1997, v.17, p.221–224.

Sakagami, H., Oi, T., Satoh, K.,. Prevention of oral diseases by polyphenols (Review). **In vivo.** 1999, v. 13, p. 155–172.

Sakihama, Y., Cohen, M.F., Grace, S.C., Yamasaki, H., Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. **Toxicology.** 2002, v.177, p. 67–80.

Sales, A.L. Estudo de extratos vegetais e bagaço de cana-de-açúcar na desinfecção de águas residuárias. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal da Paraíba, Campina Grande, PB. 99p. 2004.

Sagorchev, P.; Lukanov, J.; Beer, A. M. Investigations into the specific effects of rosemary oil at the receptor level. **Phytomedicine.** 2010, v.17, p. 693–697.

Santoro, G.F., Cardoso, M.G., Guimaraes, L.G., Mendonca, L.Z., Soares, M.J.,. *Trypanosoma cruzi*: Activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. **Exp. Parasitol.** 2007a, v.116, p. 283–290.

Santoro, G.F., das Graças Cardoso, M., Guimaraes, L.G., Salgado, A.P., Menna-Barreto, R.F., Soares, M.J., Effect of Oregano (*Origanum vulgare* L.) and Thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. **Parasitol. Res.** 2007b, v. 100, p. 783–790.

Scalbert, A. antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry.** 1991, v.30, p. 3875-3883.

Schelz, Z., Molnar, J., Hohmann, J., Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. **Fitoterapia**. 2006, v. 77, p. 279–285.

Schwan-Estrada, K.R.F.; Stangarlin, J.R. ; Cruz, M.E.S. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**. 2003. v.28, p.554-556,

Schnitzler, P., Koch, C., Reichling, J., Susceptibility of drug resistant clinical HSV-1 strains to essential oils of Ginger, Thyme, Hyssop and Sandalwood. **Antimicrob. Agents Chemother**. 2007. V 51, p. 1859–1862.

Sena, A.P.A., Chaibub, A.A., Côrtes, M.V.C.B, Silva, B.G., Silva-Lobo, V.L., Prabhu, A.S., Filippi, M.C.C., Araújo, L.G. Increased enzymatic activity in rice leaf blast suppression by crude extract of *Epicoccum* sp. **Tropical Plant Pathology**, 2013, v. 38, p. 387-397.

Sester, M., Raveloson, H., Tharreau, D. and Dusserre, J. Conservation agriculture cropping system to limit blast disease in upland rainfed rice. **British Society for Plant Pathology**. 2013. V 63, P. 373–381.

Serrano, M., Martinez-Romero, D., Castillo, S., Guillen, F., Valero, D., The use of natural antifungal compounds improves the beneficial effect of MAP in sweet cherry storage. **Innov. Food Sci. Emerg. Tech.** 2005, v.6, p.115–123

Shelef, L. A., Naglik, O. A., Bogen, D. W. Sensitivity of some common food bornebacteria to the spices sage, rosemary and allspice. **Journal of Food Science**. 1980. v. 45, n. 4, p. 1042-1044.

Sikkema, J., De Bont, J.A .M., Poolman, B.,.Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **J. Biol. Chem.** 1994, v. 269, p. 8022–8028.

Silva, C. M. Controle alternativo do míldio e da antracnose da videira com extrato aquoso de cinamomo (*Melia azedarach* L.) dissertação (mestrado). Universidade Estadual do Centro-oeste, Unicentro-PR, 2011.

Silva, M.S.A., Silva, M.A.R., Higino, J.S., Pereira, V.M.S, Carvalho, A. A.T. Atividade antimicrobiana e antiaderente in vitro do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. Sobre bactérias orais planctônicas. **Rev. Bras. Farmacogn.** 2008, v.18 (2), p. 236-240.

Simões, O.C.M., Schenkel, P. E., Gosmann, G., Mello, P.J.C., Mentz, A. L. Petrovik, R. P. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6 edição. Editora: UFRGS e UFSC. 2007, p 253-

Soliman, F. M., El-Kashory, E. A., Fathy, M. M., Gonaid, M. H. Analysis and biological activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* from Egypt. **Flavour and Fragrance Journal.** 1994. v. 9, n. 1, p. 29-33.

Sonaglio, D., Petrovick, P.R., BASSANI V.L. Padronização de extratos vegetais: extrato hidroalcoólico de *Achyroclines atureoides* (LAM.) DC., compositae (Marcela):comparação entre cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia em papel/ultravioleta. **Cad Farm.** 1986. v 2:p. 55-74.

Soylu, E.M., Soylu, S., Kurt, S.,. Antimicrobial activity of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agente *Phytophthora infestans*. **Mycopathologia.** 2006, v. 161, p. 119–128.

Sozio, P., A. Idnnitelli, L.S. Cerasa, I. Cacciator, C. Cornacchia, F. Cantalamessa & A. Di Stefano. New L-dopa codrugs as potential anti-Parkinson agents. **Archiv der Pharmazie** 2008. v 341(7), p. 412-417.

Stangarlin, J.R., Kuhn, O.J., Schwan-Estrada, K.R.F. Controle de doenças de plantas por extratos de origem vegetal. In: LUZ, W.C. (Ed). **Revisão Anual de Patologia de Plantas.** 2008. v.16, p.265-304.,

Stubberud, K. P.; Astrom, O. Separation of ibuprofen, codeine phosphate, their degradation products and impurities by capillary electrophoresis: II Validation. **J. Chromatogr. A.** 1998. v. 826, p. 95-102.,

Talbot, N.J. Having a blast: exploring the pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. **Trends in Microbiology**, Cambridge, 1995. v. 3, p. 9-16.

Tsai, C. W.; Lin, C. Y.; Wang, Y. J. Carnosic acid induces the NAD(P)H: quinone oxidoreductase expression in rat clone cells through the p38/nuclear factor erythroid-2 related factor pathway. **J. Nutr.** 2010, v. 141, p. 2119–2125.

Turina, A.V., Nolan, M.V., Zygadlo, J.A., Perillo, M.A., Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. **Biophys. Chem.** 2006. V 122, p. 101–113.

Ultee, A., Kets, E.P., Alberda, M., Hoekstra, F.A., Smid, E.J., Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. **Arch. Microbiol.** 2000, v. 174, p. 233–238.

Ultee, A., Bennik, M.H., Moezelaar, R., The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Appl. Environ. Microbiol.** 2002, v. 68, p. 1561–1568.

Velluti, A., Sanchis, V., Ramos, A.J., Egido, J., Marin, S., Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* maize grain. **Int. J. Food Microbiol.** 2003, v.89, p.145–154.

Velluti, A., Sanchis, V., Ramos, A.J., Turon, C., Marin, S., Impact of essential oils on growth rate, zearalenone and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* under different temperature and water activity conditions in maize grain. **J. Appl. Microbiol.** 2004, v.96, p. 716– 724.

Vercesi, A.E., KowalTowski, A.J., Grijalba, M.T., Meinicke, A.R., Castilho, R.F. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. **Biosci. Rep.** 1997. v 17, p. 43–52.

Vogt H.J, Tausch L, Wolbling R.H, Kaiser P.M. Melissen extrakt bei Herpes simplex (eine Plazebo-kontrollierte Doppelblind-Studie). Allgemeinarzt. 1991..v13: p 832- 841

Wang, W., Wu W., Zu Y.G., Fu Y. J. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. **Food Chemistry.** 2008. v. 108, p. 1019–1022.

Xu, J.R.; Xue, C. Time for blast: genomics of *Magnaporthe grisea*. **Molecular plant pathology**. 2002. v.3 n.3, p. 173-176.

Yoon, H.S., Moon, S.C., Kim, N.D., Park, B.S., Jeong, M.H., Yoo, Y.H., Genistein induces apoptosis of RPE-J cells by opening mitochondrial PTP. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 2000., v. 276, p. 151–156.

Zeigler, R.S., Tohme, J., Nelson, R., Levy, M., Correa-Victoria, F.J. Lineage exclusion: a proposal for linking blast population analysis to resistance breeding. In: Zeigler, R.S., Leong, S.A., Teng, P.S. Rice blast disease. Wallingford: CAB International, 1994, p. 267-292.