



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB

CENTRO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO

SOCIOAMBIENTAL

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**

**AMBIENTAIS – PPGCA**

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA IN VITRO DE EXTRATOS DE

*Schinopsis brasiliensis* E *Euphorbia trigona* CONTRA

MICROORGANISMOS FITOPATOGÊNICOS DE INTERESSE NA

AGRICULTURA

Poliana Gonçalves Guimarães

Itapetinga – BA

2013

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA IN VITRO DE EXTRATOS DE  
*Schinopsis brasiliensis* E *Euphorbia trigona* CONTRA  
MICRORGANISMOS FITOPATOGÊNICOS DE INTERESSE NA  
AGRICULTURA

Poliana Gonçalves Guimarães

Dissertação apresentada à  
Universidade Estadual do Sudoeste da  
Bahia, como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Ambientais, para obtenção  
do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Ronan Batista  
Co-orientador: Prof. Dr. Quelmo  
Silva de Novaes

Itapetinga - BA  
2013

632.4 Guimarães, Poliana Gonçalves.  
G98a Atividade antimicrobiana in vitro de extratos de *Schinopsis brasiliensis* e *Euphorbia trigona* contra microrganismos fitopatogênicos de interesse na agricultura. / Poliana Gonçalves Guimarães. - Itapetinga: UESB, 2013.  
63f.

Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB – Campus de Itapetinga. Sob a orientação do Prof. D.Sc Ronan Batista e co-orientação do Prof. D.Sc Quelmo Silva de Novaes.

1. Extrato vegetal – Baraúna e Candelabro – Propriedade antimicrobiana. 2. Microrganismos fitopatogênicos – Agricultura. 3. Agricultura - Doenças - Controle. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais. II. Batista, Ronan. III. Novaes, Quelmo Silva de. III. Título.

CDD (21): **632.4**

Catálogo na fonte:  
Adalice Gustavo da Silva – CRB/5-535  
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemática para Desdobramento por Assunto:

1. Extrato vegetal – Baraúna e Candelabro – Propriedade antimicrobiana
2. Microrganismos fitopatogênicos – Agricultura
3. Agricultura - Doenças - Controle

POLIANA GONÇALVES GUIMARÃES

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA IN VITRO DE EXTRATOS DE  
*Schinopsis brasiliensis* E *Euphorbia trigona* CONTRA  
MICROORGANISMOS FITOPATOGÊNICOS DE INTERESSE NA  
AGRICULTURA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Campus de Itapetinga, BA. Área de Concentração: Meio Ambiente e Desenvolvimento.

Aprovada em: 22 / 03 /2013

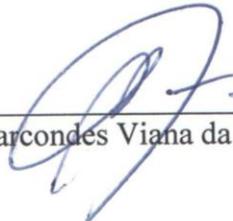
**BANCA EXAMINADORA**



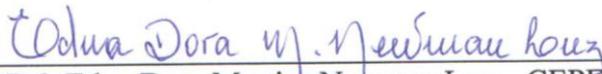
Prof. Dr. Ronan Batista – (UFBA)  
Presidente



Prof. Dr. Quelmo Silva de Novaes – UESB



Prof. Dr. Marcondes Viana da Silva – UESB



Prof.ª. Dr.ª. Edna Dora Martins Newman Luz – CEPEC/CEPLAC

## **DEDICATÓRIA**

Este trabalho é dedicado aos meus pais, Zélio e Dalva, pelo apoio, dedicação, amor e carinho. Eles sempre me deram força para conseguir alcançar meus objetivos.

Aos meus irmãos Marcelo, Leila e Douglas, pelo carinho, amizade e apoio.

Às minhas sobrinhas Yasmin, que me deixa sempre feliz, e Clara que nasceu durante o mestrado e proporcionou-me momentos alegres durante este período tão tenso da minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me dar saúde, paz, discernimento, coragem e, sobretudo, tranquilidade para conseguir levar à frente este projeto;

Aos meus familiares, que estiveram em meu convívio durante este trabalho;

Ao professor Ronan Batista, por ter assumido minha orientação, dando-me a oportunidade de concretização deste estudo e o rumo certo para as minhas pesquisas;

Ao professor Quelmo Silva de Novaes, que aceitou a co-orientação, proporcionando-me oportunidades de aprender novas metodologias de pesquisa. Obrigada pelos conselhos e ensinamentos!

Ao professor Pedro Costa Campos Filho, por sugerir novos rumos para minha pesquisa e me orientar acerca das novas metodologias utilizadas;

À professora Maria Aparecida Castellani, pelas valiosas sugestões durante o exame de qualificação, e ao Professor Avaldo Soares Filho, pela identificação botânica das espécies de plantas e respectivos registros no herbário;

À professora Elineide Barbosa de Souza e ao Laboratório de Fitobacteriologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela doação das bactérias padrões da Coleção de Culturas do Laboratório de Fitobacteriologia (CCLF);

Aos alunos do Laboratório de Fitopatologia, Erlani, Gisele, Rafael, Geraldo e, principalmente, Luana, pelas contribuições durante a realização das pesquisas; e do Laboratório de Pesquisa em Substâncias Bioativas (LAPESB), Natiele, José Lucas, Lívia, Dhierllate e, principalmente, Indiana e Herlle, pela amizade, companhia e auxílio durante a realização do trabalho e durante os dias intermináveis no LAPESB;

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, por ter me dado condições de concluir minha pesquisa;

Ao Colégio Estadual de Malhada de Pedras, principalmente à ex-diretora Dalva Cangussu Gonçalves Guimarães e à atual diretora Núbia Cangussu Gonçalves, pela compreensão e apoio durante esses dois anos de mestrado;

À Célia Farias, pela amizade e correção de alguns pontos da redação;

À tia Luezir, que me abrigou em sua casa nas temporadas em Itapetinga, e Heneile, que me proporcionou isso. Obrigada pelo carinho!

Aos professores do mestrado, por me proporcionar novos conhecimentos:

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

GUIMARÃES, Poliana Gonçalves. **Atividade antimicrobiana in vitro de extratos de *Schinopsis brasiliensis* e *Euphorbia trigona* contra microrganismos fitopatogênicos de interesse na agricultura** Itapetinga - BA: UESB, 2013. 63 p. (Dissertação - Mestrado em Ciências Ambientais)\*

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana in vitro de extratos de *Schinopsis brasiliensis* (Baraúna) e *Euphorbia trigona* (Candelabro) contra microrganismos fitopatogênicos de interesse na agricultura. Foram obtidos extratos etanólicos com folhas, caule e raiz de baraúna, extratos diclometânico e metanólico das partes aéreas de candelabro e extratos metanólico e clorofórmico do látex de candelabro. O fungo *Fusarium solani* (FS) foi cultivado em BDA com os extratos nas concentrações de 0; 0,001; 0,005; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 e 1 mg.mL<sup>-1</sup> (três repetições/tratamento). Para os ensaios antibacterianos, primeiramente foi feita uma avaliação preliminar com a bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*, cultivada em BDA com os extratos nas concentrações de 0; 0,02; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 e 1 mg.mL<sup>-1</sup>. Nas avaliações antibacterianas finais, foram utilizados apenas os extratos de baraúna contra as bactérias padrões da CCLF-UFRPE: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc56), *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Xcv112), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc23), *Ralstonia solanacearum* (Raça 1) (CGH12), *Ralstonia solanacearum* (Raça 2) (B19) e *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac1.12), utilizando a técnica de microdiluição em caldo. Testes de toxicidade com *Artemia salina* e testes bactericidas e bacteriostáticos também foram feitos com esses extratos. Foi observada pouca atividade antifúngica para os extratos de baraúna e candelabro frente ao *Fusarium solani*. Nos ensaios preliminares, foram obtidas CIM de 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> com os extratos da raiz e folha de baraúna. As CIM variaram entre 0,31 e 10 mg.mL<sup>-1</sup> frente às bactérias testadas na técnica de microdiluição. As concentrações de 0,31 mg.mL<sup>-1</sup> foram obtidas com os extratos do caule e da folha de baraúna contra as bactérias CGH12 e Aac1.12, respectivamente. Nenhum dos extratos testados mostrou-se ativo contra a bactéria Pcc23. Todos os extratos de baraúna foram bacteriostáticos e não-tóxicos para *A. salina*, o que demonstra menores impactos ao meio ambiente. Os resultados obtidos indicam o potencial de extratos provenientes de baraúna no desenvolvimento de produtos para o controle alternativo de doenças causadas pelos microrganismos Xcc56, Xcv112, CGH12, B19 e Aac1.12.

**Palavras-chave:** Extratos vegetais, fitopatógenos, baraúna, candelabro

\* Orientador: Ronan Batista, D.Sc. UFBA; Co-orientador: Quelmo Silva de Novaes, D.Sc. UESB.

## ABSTRACT

GUIMARÃES, Poliana Gonçalves. **In vitro antimicrobial activity of extracts *Schinopsis brasiliensis* and *Euphorbia trigona* against phytopathogenic microorganisms of interest in agriculture.** Itapetinga - BA: UESB, 2013. 63p. (Dissertation - Master in Environmental Sciences) \*

The objective of this work was to evaluate the in vitro antimicrobial activity of extracts *Schinopsis brasiliensis* (Baraúna) and *Euphorbia trigona* (candelabrum) against phytopathogenic microorganisms of interest in agriculture. Ethanolic extracts were obtained with leaves, stem and root of baraúna, diclometanic and methanolic extracts of the aerial parts of candelabrum and methanolic and chloroformic extracts of latex candelabrum. *Fusarium solani* was grown on PDA with extracts at concentrations of 0, 0.001, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 and 1 mg.mL<sup>-1</sup> (three replicates / treatment). For antibacterial assays, was first made a preliminary assessment with the bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* grown on PDA with extracts at concentrations of 0, 0.02, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 and 1 mg.mL<sup>-1</sup>. In the final evaluations antibacterial were used only extracts of baraúna against bacteria standards CCLF of UFRPE: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc56), *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Xcv112), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc23), *Ralstonia solanacearum* (Raça 1) (CGH12), *Ralstonia solanacearum* (Raça 2) (B19) and *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac1.12), using the broth microdilution. Toxicity tests with *Artemia salina* and bactericidal and bacteriostatic tests were also done with these extracts. Little antifungal activity was observed for extracts baraúna and candelabrum against *Fusarium solani*. In preliminary tests were obtained MIC of 0.1 mg.mL<sup>-1</sup> with the extracts of the root and leaf baraúna. The MIC varied between 0.31 and 10 mg.mL<sup>-1</sup> against the bacteria tested in microdilution technique. Concentrations of 0.31 mg/mL were obtained with extracts of the stem and leaf of baraúna against the bacteria CGH12 and Aac 1.12, respectively. None of the tested extracts showed activity against bacteria Pcc23. All extracts of baraúna have bacteriostatic and non-toxic to *A. salina*, which demonstrates minor impacts to the environment. The results indicate the potential of extracts from baraúna, in developing products for the alternative control of diseases caused by microorganisms Xcv112, CGH12, Xcc56, B19 and Aac1.12.

Keywords: Plant extracts, phytopathogens, baraúna, candelabrum

\*Advisor: Ronan Batista, D.Sc. UFBA; Co-advisor: Quelmo Silva de Novaes, D.Sc. UESB.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Quadro de análise de variância do experimento com os extratos de *Schinopsis brasiliensis* contra o *Fusarium solani*. .....44
- Tabela 2** - Médias dos diâmetros de colônias de *Fusarium solani*, submetidos a diferentes concentrações de extratos de folha (EEF-SB), caule (EEC-SB) e raiz (EER-SB) de *Schinopsis brasiliensis*. .....45
- Tabela 3** - Quadro da análise de variância do experimento com os extratos de *Euphorbia trigona* contra *Fusarium solani*. .....46
- Tabela 4** - Médias dos diâmetros (em milímetro) das colônias de *Fusarium solani* com os extratos de *Euphorbia trigona* e testemunha. .....46
- Tabela 5** - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM, mg.mL<sup>-1</sup>) dos extratos de *Schinopsis brasiliensis* e *Euphorbia trigona* contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* nas avaliações preliminares em meio de cultura BDA.....47
- Tabela 6** - Concentrações Inibitórias Mínimas dos extratos de *Schinopsis brasiliensis* sobre microrganismos usando a técnica de microdiluição em caldo. ....48

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Mecanismos de resistências dos vegetais. ....	16
<b>Figura 2</b> - Classificação dos metabólitos: primários e secundários. ....	17
<b>Figura 3</b> - Representação clássica dos fatores que interagem para a ocorrência de doenças em plantas. ....	19
<b>Figura 4</b> - <i>Fusarium solani</i> em placa de Petri com meio BDA. ....	20
<b>Figura 5</b> - Podridão de colo e raízes em maracujazeiro causada por <i>Fusarium solani</i> . ....	20
<b>Figura 6</b> - Colônias da bactéria <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> em meio BDA. ....	21
<b>Figura 7</b> - Folha de couve com podridão negra causada por <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> . ....	22
<b>Figura 8</b> - Alface com podridão mole causada por <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> . ....	24
<b>Figura 9</b> - Moko ou murcha bacteriana em bananeira causada pela bactéria <i>Ralstonia solanacearum</i> . ....	25
<b>Figura 10</b> - Locais identificados de ocorrência natural de Baraúna ( <i>Schinopsis brasiliensis</i> ) no Brasil. ....	29
<b>Figura 11</b> - Planta adulta - <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl. ....	29
<b>Figura 12</b> - Substâncias isoladas de partes da <i>Schinopsis brasiliensis</i> . <i>Caule</i> : n-alquil fenóis (1-4), n-alquenil fenóis (5-7), esteroides (8, 9), lignana (10) e outros compostos (11-13). <i>Folha</i> : nor-isoprenoide (14). ....	31
<b>Figura 13</b> - Partes aéreas de <i>Euphorbia trigona</i> Law. ....	32
<b>Figura 14</b> - Substâncias isoladas de <i>Euphorbia trigona</i> : ésteres ingenol piscicida (15-17) e éster ingol (18). ....	33
<b>Figura 15</b> - Fluxograma da obtenção dos extratos de <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl. ....	37
<b>Figura 16</b> - Fluxograma da obtenção dos extratos de <i>Euphorbia trigona</i> Law. ....	37
<b>Figura 17</b> - Medição dos diâmetros das colônias do <i>Fusarium solani</i> . ....	39
<b>Figura 18</b> - Microplaca (contendo 96 micropoços) para técnica da Microdiluição em Caldo. ....	42
<b>Figura 19</b> - Concentração Inibitória Mínima (CIM, mg.mL <sup>-1</sup> ) de extratos etanólicos da raiz (EER-SB), caule (EEC-SB) e folha (EEF-SB) de <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl. contra cepas das bactérias <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (Xcc56), <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vitícola</i> (Xcv112), <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> (Pcc23), <i>Ralstonia solanacearum</i> (Raça 1) (CGH12), <i>Ralstonia solanacearum</i> (Raça 2) (B19) e <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> (Aac1.12). ....	48
<b>Figura 20</b> - Microplaca com a técnica de microdiluição em caldo do extrato etanólico da raiz de <i>S. brasiliensis</i> contra os microrganismos: CGH12- <i>Ralstonia solanacearum</i> (Raça 1), B19- <i>Ralstonia solanacearum</i> (Raça 2), Pcc23- <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> . * ....	61
<b>Figura 21</b> - Microplaca com a técnica de microdiluição em caldo do extrato etanólico da raiz de <i>S. brasiliensis</i> contra os microrganismos: Xcv112- <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vitícola</i> , Xcc56- <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> , Aac1.12 - <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> . * ....	61
<b>Figura 22</b> - Microplaca com a técnica de microdiluição em caldo do extrato etanólico do caule de <i>S. brasiliensis</i> contra os microrganismos: Aac1.12 - <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> , CGH12 - <i>Ralstonia solanacearum</i> (Raça 1), Xcc56- <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> . * ....	62

<b>Figura 23</b> - Microplaca com a técnica de microdiluição em caldo do extrato etanólico do caule de <i>S. brasiliensis</i> contra os microrganismos: Pcc23- <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> B19- <i>Ralstonia solanacearum</i> (Raça 2), Xcv112 - <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> .*	62
<b>Figura 24</b> - Microplaca com a técnica de microdiluição em caldo do extrato etanólico da folha de <i>S. brasiliensis</i> contra os microrganismos: Aac1.12 - <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> , CGH12 - <i>Ralstonia solanacearum</i> (Raça 1), Xcc56- <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> . *	63
<b>Figura 25</b> - Microplaca com a técnica de microdiluição em caldo do extrato etanólico da folha de <i>S. brasiliensis</i> contra os microrganismos: Pcc23- <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> B19- <i>Ralstonia solanacearum</i> (Raça 2), Xcv112 - <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> .*	63

## LISTA DE ABREVIATURAS

UV	- Ultravioleta
CIM	- Concentração Inibitória Mínima
EEF-SB	- Extrato etanólico da folha de <i>Schinopsis brasiliensis</i>
EEC-SB	- Extrato etanólico do caule de <i>Schinopsis brasiliensis</i>
EER-SB	- Extrato etanólico da raiz de <i>Schinopsis brasiliensis</i>
EDPA-ET	- Extrato diclorometânico das partes aéreas de <i>Euphorbia trigona</i>
EMPA-ET	- Extrato metanólico das partes aéreas de <i>Euphorbia trigona</i>
EML-ET	- Extrato metanólico do látex de <i>Euphorbia trigona</i>
ECL-ET	- Extrato clorofórmico do látex de <i>Euphorbia trigona</i>
BDA	- Batata-dextrose-ágar
UFC/mL	- Unidades Formadoras de Colônias por mililitro
Xcc56	- <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
Xcv112	- <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i>
Pcc23	- <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>
CGH12	- <i>Ralstonia solanacearum</i> (Raça 1)
B19	- <i>Ralstonia solanacearum</i> (Raça 2)
Aac1.12	- <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>
μL	- Microlitro
mL	- Mililitro
g/L	- Grama por litro
mg/L	- Miligrama por litro
mg.mL <sup>-1</sup>	- Miligrama por mililitro
DMSO	- Dimetilsulfóxido
EtOH	- Etanol
MetOH	- Metanol
CHCl <sub>3</sub>	- Clorofórmio
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	- Diclorometano

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA .....	2
AGRADECIMENTOS .....	5
RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
SUMÁRIO .....	12
1. INTRODUÇÃO .....	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO .....	14
2.1. Plantas Medicinais .....	14
2.2. Mecanismos de defesa das plantas .....	15
2.3. Metabolismo secundário .....	17
2.4. Doenças causadas por fitopatógenos na agricultura.....	18
2.4.1. <i>Fusarium solani</i> (Mart.).....	19
2.4.2. <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> .....	21
2.4.3. <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> ( <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> ) .....	23
2.4.4. <i>Ralstonia solanacearum</i> ( <i>Pseudomonas solanacearum</i> ) .....	24
2.4.5. <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> ( <i>Acidovorax citrulli</i> ).....	25
2.5. Uso dos produtos naturais no controle de fitopatógenos.....	26
2.6. Espécies vegetais com potencial uso no controle de fitopatógenos .....	28
2.6.1. <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl.....	28
2.6.1.1 Trabalhos realizados sobre <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl.....	30
2.6.2. <i>Euphorbia trigona</i> Law. ....	32
2.6.2.1 Trabalhos realizados sobre <i>Euphorbia trigona</i> Law. ....	33
3. OBJETIVOS DO TRABALHO.....	35
3.1. Geral.....	35
3.2. Específicos.....	35
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	36
4.1. Local e período experimental .....	36
4.2. Coleta do material vegetal .....	36
4.3. Preparação dos extratos .....	36
4.4. Avaliação dos extratos contra fitopatógenos .....	38

4.4.1. Ensaio contra fungo .....	38
4.4.1.1. Preparo do isolado de <i>Fusarium solani</i> .....	38
4.4.1.2. Obtenção de diferentes concentrações dos extratos .....	38
4.4.1.3. Inoculação do fungo .....	38
4.4.1.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) .....	39
4.4.1.5. Procedimentos estatísticos .....	39
4.4.2. Ensaio contra bactérias .....	40
4.4.2.1. Avaliação preliminar contra <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> .....	40
4.4.2.1.1. Obtenção de diferentes concentrações dos extratos .....	40
4.4.2.1.2. Inoculação da bactéria .....	40
4.4.2.1.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) .....	40
4.4.2.2. Avaliações finais contra outras bactérias .....	40
4.4.2.2.1. Bactérias padrões .....	40
4.4.2.2.2. Técnica de Microdiluição em Caldo .....	41
4.4.2.2.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) .....	42
4.4.2.2.4. Teste bactericida/bacteriostático .....	42
4.4.3. Bioensaio de toxidade contra <i>Artemia salina</i> .....	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	44
6. CONCLUSÕES .....	51
7. REFERÊNCIAS .....	52
8. APÊNDICES .....	61

## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil e no mundo são utilizados pesticidas para o controle de doenças de plantas. O uso destes produtos em curto prazo tem um efeito positivo para o produtor, mas sua utilização em longo prazo acarreta diversos prejuízos para sociedade e meio ambiente, como a poluição dos solos e da água, resíduos de agrotóxicos nos alimentos, surgimento de patógenos resistentes, má qualidade de vida dos agricultores, entre outros (KIMATI et al., 1997; STANGARLIN et al., 1999).

Buscando diminuir estes prejuízos causados pelos pesticidas, alternativas vem sendo pesquisadas para o controle de fitopatógenos. Uma delas é a exploração da atividade biológica de metabólitos secundários presentes em extratos vegetais brutos e óleos essenciais de plantas medicinais da flora nativa (DI PIERO et al., 2010).

*Schinopsis brasiliensis* (baraúna) e *Euphorbia trigona* (candelabro) são espécies vegetais com potencial uso no controle de fitopatógenos. A literatura relata a atividade antibacteriana de extratos de baraúna contra cepas resistentes de *Staphylococcus aureus* (SARAIVA, 2007). Além disso, poucos estudos fitoquímicos foram realizados com esta planta, destacando-se o isolamento de alguns alquil e alquenil-fenóis, dentre outros constituintes, que foram considerados como sendo os principais responsáveis pela ação alergênica desta espécie ao homem (CARDOSO et al., 2005).

Pesquisas com candelabro descrevem seu uso popular como purgativo e como remédio no tratamento de dores de ouvido. Seu látex é conhecido por conter várias di e tri-terpenos e seus ésteres possuem propriedades anti-infecciosas (CATENI et al, 2003; SIMÕES et al., 2004; TADA e SEKI, 1989). Foi descrita também ação fungicida do látex contra os fungos *Aspergillus niger* e *Fusarium graminearum* (VAN DEENEN et al., 2011).

Dessa forma, considerando que extratos da *Schinopsis brasiliensis* apresentaram comprovada ação antibacteriana contra microrganismos patogênicos ao homem, e ainda não foram encontrados trabalhos na literatura que descrevessem a ação desta planta contra microrganismos fitopatogênicos, e que extratos de *E. trigona* foram ativos contra fungos fitopatogênicos, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de *Schinopsis brasiliensis* e *Euphorbia trigona*, contra *Fusarium solani*, causador da podridão do colo e raízes em maracujazeiro; *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, causadora da

podridão negra em crucíferas; *Xanthomonas campestris* pv. *Viticola*, causadora do cancro bacteriano da videira; *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum*, causadora da podridão-mole em hortaliças; *Ralstonia solanacearum*, causadora da murcha bacteriana em bananeiras e pimentões; e *Acidovorax avenae* subsp. *Citrulli*, causadora da mancha bacteriana em melão, para uma possível utilização destas plantas no controle alternativo dessas doenças na agricultura.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. Plantas Medicinais

O emprego de plantas com o intuito medicinal é tão antigo quanto o estudo da medicina. Desde as antigas civilizações em diferentes culturas ao redor do mundo, elas já eram utilizadas para fins terapêuticos. No Brasil, a utilização das mesmas na medicina e em rituais é uma prática comum resultante da forte influência da cultura europeia trazida pelos colonizadores e dos indígenas locais, miscigenados às tradições africanas, oriundas de três séculos de tráfico de escravos (MAIOLI-AZEVEDO e FONSECA-KRUEL, 2007; SARAIVA et al., 2011).

Com a evolução da medicina empírica, muitas plantas foram incorporadas ao acervo de tratamentos para muitas moléstias. Mais de 500 foram descritas com suas características e propriedades, no famoso trabalho “*Materia Medica*” de Dioscórides, publicado no ano 100 d.C. O tratamento com a utilização de ervas atravessou os séculos, sobretudo a partir da influência da medicina Galênica, que se manteve vigente até a Idade Moderna (CORRÊA et al., 2003).

A Revolução Industrial ampliou a produção de vários tipos de produtos, entre eles os medicamentos. Sendo assim, era grande o interesse das indústrias pelas plantas medicinais, para a possível extração de princípios ativos, visando à produção dos medicamentos. Partiu-se então para a síntese desses princípios ativos, que são substâncias ou grupos quimicamente caracterizados, cuja ação farmacológica é conhecida e responsável, total ou parcialmente, pelos efeitos terapêuticos (CORRÊA et al., 2003).

Para muitas comunidades e grupos étnicos, o conhecimento sobre plantas medicinais simboliza, muitas vezes, o único recurso terapêutico. Hoje, ainda se vê nas regiões mais pobres do país, e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, a comercialização dessas plantas em feiras livres e mercados populares, sendo encontradas em quintais de residências. As observações populares sobre a eficácia e o uso delas contribuem de forma relevante para a divulgação das propriedades terapêuticas das plantas, prescritas com frequência, em decorrência dos efeitos medicinais que causam, apesar de seus constituintes químicos não serem elucidados. Esse tipo de cultura medicinal tem despertado o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas do conhecimento

como botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a flora mundial, uma fonte inesgotável da medicina natural (MACIEL et al., 2002).

No domínio popular, o conhecimento das propriedades medicinais das plantas é muito comum, mas este conhecimento não pode ser incorporado à ciência médica oficial sem antes uma pesquisa mais profunda, pois há imprecisão sobre algumas informações como a identificação botânica correta das plantas utilizadas, variabilidade de composição da planta, problemas com o efeito placebo na avaliação da eficácia dos fitoterápicos, entre outros. Essas avaliações são extremamente importantes, levando em consideração a ciência fitoterápica (CORRÊA et al., 2003).

Diversos vegetais têm sido utilizados com fins profiláticos e curativos. Atualmente, muitos trabalhos vêm sendo realizados em busca de novas plantas com atividade antimicrobiana (MICHELIN et al., 2005).

Ao longo dos próximos anos, o estudo de plantas medicinais como agentes antimicrobianos deverá ser centrado para determinar informações específicas sobre a atividade antimicrobiana da planta, evitando estudos em que os pesquisadores utilizam este critério apenas para um complemento a um estudo fitoquímico. O isolamento de compostos ativos deverá ser realizado a partir do conhecimento da atividade da planta (RIOS e RECIO, 2005).

## **2.2. Mecanismos de defesa das plantas**

As plantas, assim como os animais, estão expostas ao ataque de patógenos, mas elas possuem um sistema de defesa desenvolvido através do processo evolutivo, fundamentalmente diferente do sistema de defesa animal. Um simples contato do fitopatógeno com o tecido vegetal é suficiente para desencadear uma série de mecanismos de reconhecimento. Primeiramente, ocorrem modificações fisiológicas e bioquímicas e, posteriormente, em decorrência destas alterações, poderão surgir mudanças morfológicas visíveis (PASCHOLATI e LEITE, 1995a).

Goodman et al. (1986) conceituam resistência como sendo a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou a subsequente atividade do patógeno em seus tecidos.

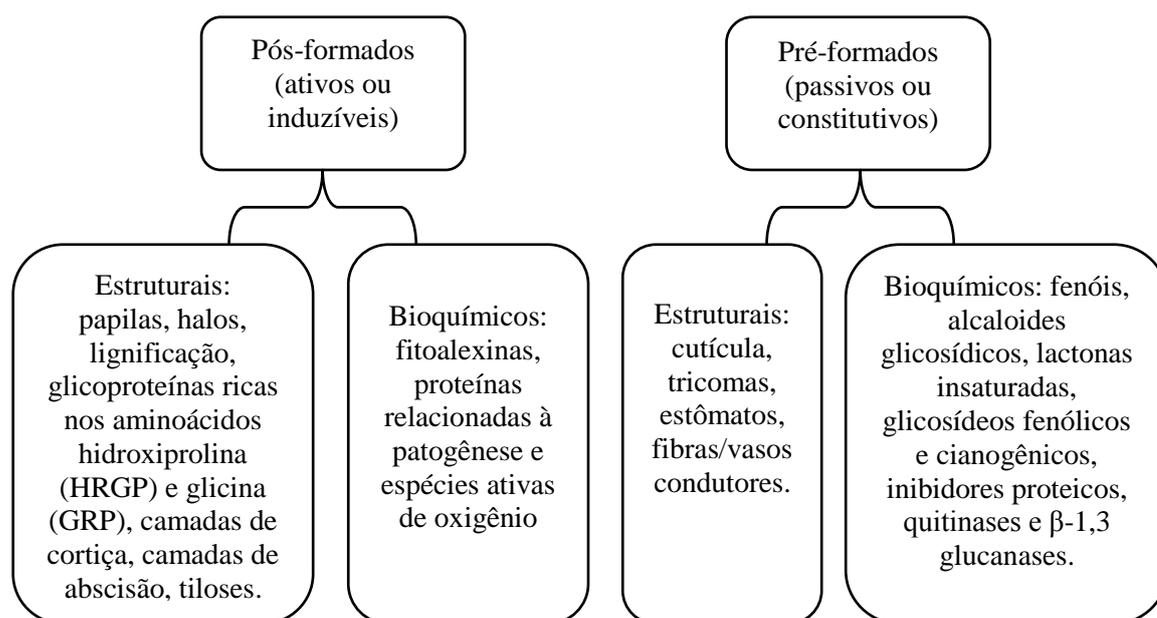
Esta resistência é o sistema de defesa vegetal, caracterizado pela natureza coordenada e dinâmica no momento e local apropriados e com proporção adequada, e ele é multicomponente, no qual o nível de resistência é a somatória de vários mecanismos (PASCHOLATI e LEITE, 1995b). O sistema de defesa inicia-se com o reconhecimento,

pelo hospedeiro, de sinais exógenos provenientes do patógeno, continua com os mecanismos de transdução dos sinais e resulta em uma reprogramação do metabolismo celular da planta, envolvendo mudanças na atividade gênica (WALTERS et al., 2007).

Os mecanismos de defesa de uma planta podem ser estruturais e bioquímicos, ambos pré ou pós-formados em relação à tentativa de entrada do patógeno no hospedeiro. Os mecanismos estruturais são barreiras físicas à penetração e/ou colonização do patógeno, enquanto que os mecanismos bioquímicos englobam substâncias capazes de gerar condições adversas para a sobrevivência do patógeno nos tecidos do hospedeiro ou de inibir o seu desenvolvimento (PASCHOLATI e LEITE, 1995b; SCHWAN-ESTRADA et al., 2008).

Nos mecanismos bioquímicos pré-formados, as substâncias estão presentes nos tecidos saudáveis da planta em altas concentrações, antes do contato com o patógeno, ou podem se converter em substâncias altamente tóxicas com o início da infecção. Diferentemente, nos mecanismos pós-formados, as substâncias encontram-se ausentes ou presentes em pouca quantidade antes da infecção, sendo produzidas ou ativadas em resposta à presença do patógeno (GARCION et al., 2007; PASCHOLATI e LEITE, 1995b).

De maneira geral, os mecanismos de resistência podem ser divididos em pós e pré-formados, conforme Figura 1 (PASCHOLATI e LEITE, 1995b).

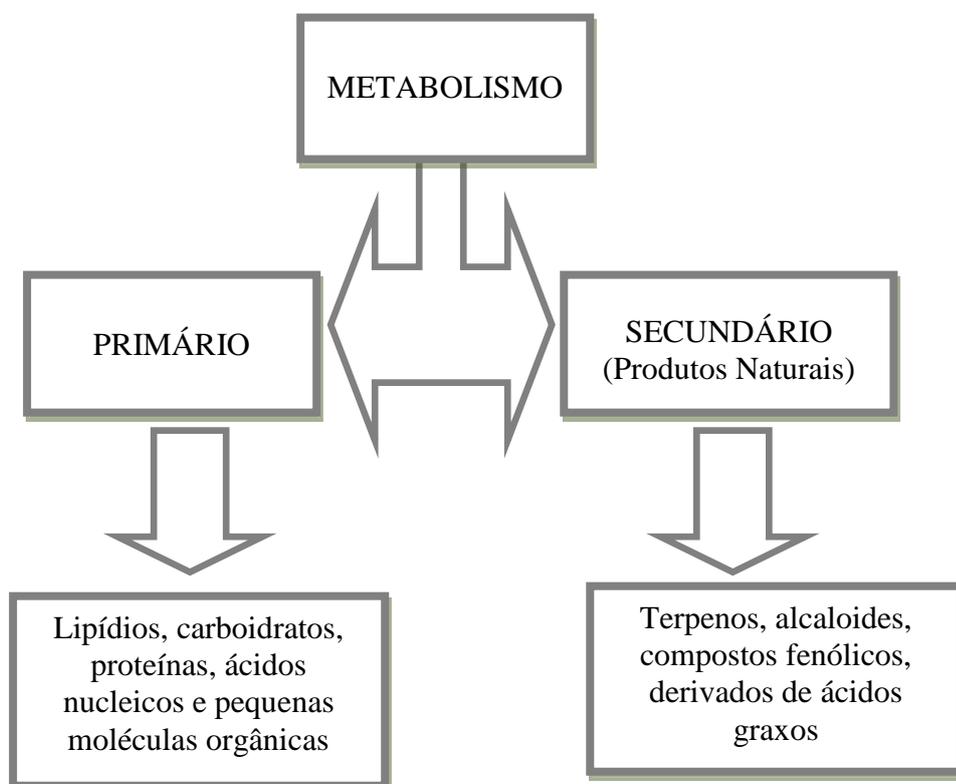


**Figura 1** - Mecanismos de resistências dos vegetais.  
Fonte: PASCHOLATI e LEITE, 1995b.

### 2.3. Metabolismo secundário

Todos os seres vivos possuem atividade metabólica, ou seja, reações químicas que ocorrem no interior das células. Os produtos gerados por essas reações biossintéticas são moléculas orgânicas, com funções e importância biológica diferente, chamados de metabólitos. Eles podem ser classificados em primários ou secundários (EMERY et al., 2010).

Os metabólitos primários são distribuídos por todos os organismos vivos, sendo fundamentais para o bem-estar e a sobrevivência das espécies, são especialmente importantes em funções básicas vitais, como a fotossíntese, respiração, divisão, estocagem, crescimento celular e reprodução. Os metabólitos secundários são compostos pouco abundantes que possuem biossíntese restrita a algumas espécies de organismos vivos, e sua importância biológica não é diretamente relacionada aos mesmos processos metabólicos supracitados, mas que fazem parte, especialmente, da estrutura de defesa e comunicação entre as espécies, dentre eles pode-se citar os terpenos, alcaloides, compostos fenólicos, antocianinas e taninos (EMERY et al., 2010, FUMAGALI et al., 2008) (Figura 2).



**Figura 2** - Classificação dos metabólitos: primários e secundários.

Fonte: EMERY et al., 2010.

Os metabólitos secundários biossintetizados e estocados nas plantas tem uma importante função em sua proteção contra raios UV, atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes e, principalmente, em sua defesa contra os predadores em geral (herbívoros e microrganismos) (SIMÕES et al., 2004).

As fitoalexinas são metabólitos secundários de composição química heterogênea e baixo peso molecular. Elas são produzidas em resposta a estresses químicos, físicos ou biológicos e agem em defesa do vegetal contra o ataque de parasitas, entre eles, os microrganismos. Geralmente apresentam atividade antibacteriana e antifúngica, sendo um fator importante na resistência a doenças de plantas. (LYON e WOOD, 1975; PURKAYASTHA, 1995; SAKAGAMI et al., 1998).

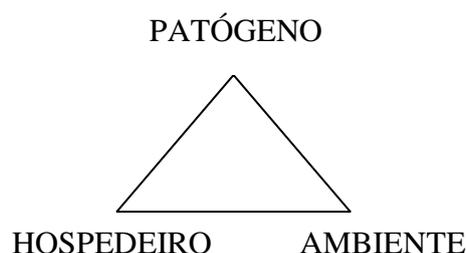
#### **2.4. Doenças causadas por fitopatógenos na agricultura**

Algumas definições consideram que doença é decorrente de alterações fisiológicas acarretadas exclusivamente por agentes infecciosos, dentre eles destacam-se fungos, bactérias, fitoplasmas, vírus e viroides, nematoides, protozoários e plantas parasitas superiores. Outras definições incluem causas de natureza não infecciosa, não parasitária ou abiótica, que incluem condições desfavoráveis do ambiente (temperatura excessivamente baixa ou alta, deficiência ou excesso de umidade, deficiência ou excesso de luz, deficiência de oxigênio, poluição do ar), as deficiências e/ou desequilíbrios nutricionais e o efeito de fatores químicos (KRUGNER, 1995; MICHEREFF, 2001).

Nesse sentido, a representação clássica dos fatores que interagem para ocorrência de doenças em plantas é o triângulo, no qual cada vértice representa um desses fatores (agente causal = patógeno; planta suscetível = hospedeiro; ambiente favorável = ambiente) (Figura 3). A interação destes três fatores é essencial para a ocorrência de doenças em plantas. Entretanto, a severidade das doenças infecciosas poderá ser maior ou menor, dependendo de outros fatores dentro de cada um dos três componentes do triângulo (BEDENDO, 1995; MICHEREFF, 2001; PASCHOLATI e LEITE, 1995b).

As doenças de plantas são importantes para o homem pelo fato de causarem danos às plantas e seus produtos, bem como por influenciarem direta ou indiretamente na lucratividade do empreendimento agrícola. Elas podem limitar os tipos ou variedades de plantas que podem desenvolver em determinada área geográfica, reduzir a quantidade e a qualidade dos produtos vegetais e causar perdas econômicas. Os dados exatos das perdas

e/ou prejuízos, diretos e/ou indiretos, acarretados pelas doenças de plantas torna-se difícil, sendo realizadas diversas estimativas. A Organização Mundial para Alimentação e Agricultura – FAO considerou, no ano de 1993, que as doenças de plantas foram responsáveis, em média, por cerca de 12% das perdas na produção agrícola, as quais variam conforme a cultura e o grau de desenvolvimento do país em que são produzidas (MICHEREFF, 2001).



**Figura 3** - Representação clássica dos fatores que interagem para a ocorrência de doenças em plantas.

Fonte: MICHEREFF, 2001.

#### 2.4.1. *Fusarium solani* (Mart.)

O gênero *Fusarium* compreende um amplo e heterogêneo grupo de fungos importantes para a indústria de alimentos e medicamentos, a medicina e a agricultura.

*Fusarium solani* é um fitopatógeno habitante do solo, importante agente causador de doenças de diversos cultivos, tais como podridão de raiz, de frutos de *Cucurbita* spp., de ervilha, do pé de feijão, do colo e raízes em maracujá, síndrome da morte súbita da soja e podridão seca de batata. Esse fungo é importante devido aos danos econômicos causados no setor agrícola e por sua distribuição cosmopolita (GHINI e NAKAMURA, 2001). Massola Jr. e Bedendo (2005) relatam uma grande epidemia de podridão radicular em mandioca, que causou perdas de 60% em extensas áreas de várzeas na Região Amazônica.

Existem 860 registros de *F. solani* (Figura 4) encontrados para 416 espécies hospedeiras, em vários países da Europa, Ásia, América, África e Oceania, sendo que os principais hospedeiros são *Solanum* spp., *Pinus* spp., e *Phaseolus* spp. (FARR e ROSSMAN, 2010).



**Figura 4** - *Fusarium solani* em placa de Petri com meio BDA.

*Fusarium solani* também causa a podridão do colo e raízes do maracujazeiro (Figura 5), que provoca significativo decréscimo na produtividade e constantes migrações das culturas para regiões livres do patógeno. Os sintomas da doença consistem em leve murcha dos ponteiros, alteração na coloração da folha para um verde-pálido, e posteriormente, murcha drástica, desfolha e morte das plantas, em virtude do completo anelamento necrótico do colo da planta e apodrecimento das raízes. São também observados na região do colo afetado, intumescimento e rachaduras da casca, exibindo uma coloração arroxeada nas bordas das lesões e formando, sob condições de elevada umidade, estruturas de coloração avermelhada e pouco maiores que grãos de areia, que são os peritécios do patógeno, ou seja, a fase teleomórfica do fungo (FISCHER et al., 2005).



**Figura 5** - Podridão de colo e raízes em maracujazeiro, causada por *Fusarium solani*.

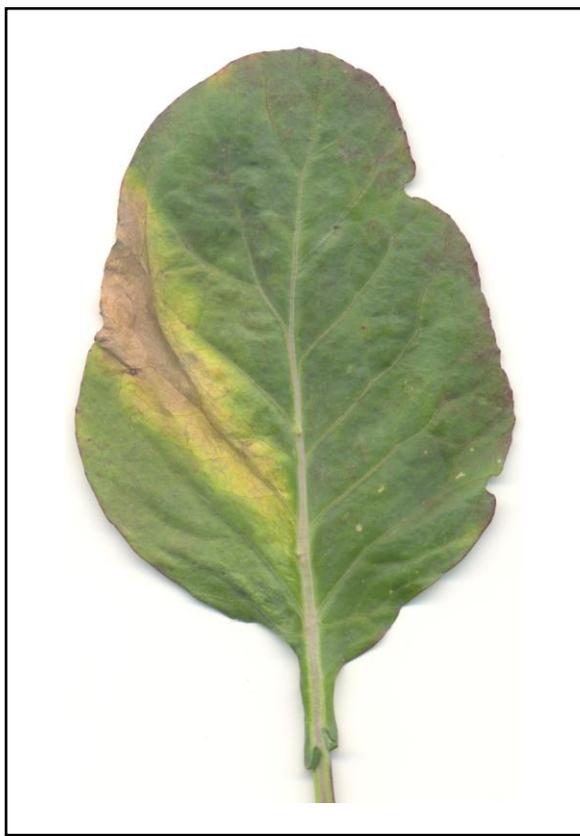
#### 2.4.2. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

*Xanthomonas* é um gênero da família Pseudomonaceae que infecta ampla variedade de plantas incluindo algumas de interesse comercial como a couve, a couve-flor, a couve-de-bruxelas, a alcachofra, o algodão, a ameixa, a berinjela, o brócolis, o maracujá, a mostarda, a nectarina, a pimenta, o pimentão, o rabanete, o repolho, o tomate, a alfafa, o pêssego e outras. Com exceção da bactéria *X. maltophilia*, todos os outros microrganismos desse gênero são fitopatogênicos (GIBBS e SKINNER, 1966; NATIONAL COLLECTION OF PLANT PATHOGENIC BACTÉRIA – NCPPB, 2006; SUTHERLAND, 1993; SWINGS et. al., 1993).

A bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Figura 6) é responsável pela podridão negra (Figura 7), principal doença bacteriana em crucíferas, podendo causar sérios prejuízos à lavoura. No Brasil, sua distribuição é ampla, sendo encontrada praticamente em todas as regiões produtoras, pelo fato da bactéria ser transmitida por sementes e mudas (ANDRADE et. al. 2005; MARINGONI, 2005; RODRIGUES-NETO e MALAVOLTA-JR, 1995;).



**Figura 6** - Colônias da bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em meio BDA.



**Figura 7** - Folha de couve com podridão negra causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

A podridão negra ocorre em todas as regiões produtoras de crucíferas no mundo causando perdas na produção e qualidade das culturas. Atualmente, essa doença tem sido controlada parcialmente pela utilização de cultivares resistentes, entretanto, essa bactéria ainda representa ameaça para a agricultura do país, sendo necessário o desenvolvimento de métodos mais eficientes para o seu controle (ANDRADE et al., 2005). Inquéritos conduzidos entre 2007 e 2008 na região Sul de Moçambique sobre manejo da podridão negra das crucíferas, acompanhados de levantamentos de campo, confirmaram que sobre condições de alta pluviosidade podem ser verificadas perdas de rendimento na ordem dos 100% (BILA et al., 2012).

Essa bactéria sobrevive em sementes, em restos culturais fibrosos de plantas doentes, em plantas daninhas e em plantas hospedeiras, como epífita, sem entrar em contato com o interior do tecido da planta. A disseminação do microrganismo é realizada através de sementes ou de mudas doentes, durante tratos culturais, por respingos de água

de chuva ou de irrigação, seguindo geralmente na direção dos ventos (MARINGONI, 2005).

Os sintomas da doença se iniciam com o escurecimento dos vasos nas margens das folhas. A região afetada aumenta rapidamente das bordas para o centro das folhas, formando áreas cloróticas em forma de “V”, fechando dos bordos para o centro do limbo. A infecção das nervuras progride para o pecíolo e talo, com a descoloração do tecido vascular, deixando as folhas infectadas amarelas e murchas. Em alguns casos, observa-se o subdesenvolvimento e apodrecimento das plantas afetadas (MARINGONI, 2005; MICHEREFF, 2012).

#### **2.4.3. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*)**

Em 1998, Hauben et al. (1998) criaram o gênero *Pectobacterium* com a finalidade de reunir as espécies do gênero *Erwinia*, causadoras de podridão-mole, deixando-as separadas de espécies deste mesmo gênero que causam doenças envolvendo necrose.

A bactéria *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* é capaz de infectar inúmeras espécies vegetais, como alcachofra, alho, cebola, crucíferas, fumo, mandioca, solanáceas, tomateiros, girassol, alface, sempre causando podridão mole. Pode sobreviver durante anos como saprófitas no solo e associada a restos de culturas em decomposição. Os fatores principais que afetam o desenvolvimento da doença são umidade e temperaturas elevadas. A penetração nos tecidos da planta ocorre através de ferimentos causados por tratos culturais, insetos e abrasão. A disseminação é através de água da chuva ou de irrigação, implementos agrícolas nos tratos culturais, insetos e pelo próprio homem (KUROZAWA et al., 2005; KUROZAWA e PAVAN, 2005; MASSOLA Jr. et al., 2005; MASSOLA Jr. e BEDENDO, 2005; MARINGONI, 2005; PAVAN et al., 2005; SANTOS et al., 2005).

Na alface esta bactéria causa a podridão mole e em condições de alta umidade e temperatura. Pela ação das enzimas pectinolíticas produzidas por ela, provoca rápidas decomposições aquosas dos tecidos da planta (PAVAN et al., 2005). O principal sintoma da podridão mole (Figura 8) é o encharcamento dos tecidos sadios da planta hospedeira, deixando-os mole pela ação das enzimas pectinolíticas e, muitas vezes, exibindo secreção de líquido com odor desagradável. A parte afetada da planta apodrece muito rápido (MARINGONI, 2005).



**Figura 8** - Alface com podridão mole causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*.

Fonte: Sally A. Miller, The Ohio State University.

A podridão mole é um fator que tem contribuído bastante para a queda de produtividade em culturas de alface (*Lactucasativa* L.) e couve-chinesa (*Brassica pekinnensis* L.). Silva et al. (2007) observaram que a incidência desta doença variou entre 0 a 22% em alface e 1 a 67% em couve-chinesa, e a prevalência da doença foi de 42,9% em alface e de 100% em couve-chinesa.

#### **2.4.4. *Ralstonia solanacearum* (*Pseudomonas solanacearum*)**

*Ralstonia solanacearum*, causadora da murcha bacteriana (Figura 9), é uma das bactérias fitopatogênicas mais importantes para a agricultura no mundo, sendo capaz de causar danos em 54 famílias botânicas, alcançando cerca de 450 espécies, entre as quais banana, amendoim, gengibre, mamão, batata, tomate, berinjela e pimentão (XU et al., 2009). Foram identificadas cinco raças desta bactéria quanto ao fenótipo e, de acordo com o hospedeiro (PINHEIRO et al., 2011) *R. solanacearum*, pode sobreviver cerca de dois meses em terra firme na ausência de hospedeiro durante o período seco e quatro meses durante o período chuvoso. É disseminada por meio de material de plantio infectado e contatos entre as raízes das plantas e insetos (CORDEIRO et al., 2005).

A murcha bacteriana da bananeira é uma doença vascular sistêmica que pode atingir todos os órgãos da planta desde jovem até adulta. Nas plantas adultas, os principais sintomas externos são a murcha, amarelecimento e necrose das folhas e nos frutos podem ocorrer malformações, rachaduras, amarelecimento precoce e irregular, seca e escurecimento total (CORDEIRO et al., 2005).



**Figura 9** - Moko ou murcha bacteriana em bananeira causada pela bactéria *Ralstonia solanacearum*.

Fonte: <http://www.idaron.ro.gov.br/portal/Gidsv.aspx?pg=Programas&pg2=prgMoko>

#### **2.4.5. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (*Acidovorax citrulli*)**

*Acidovorax citrulli* causa a mancha bacteriana do fruto de cucurbitáceas, incluindo melão, melancia, abóbora e pepino. Perdas econômicas significativas foram relatadas em melancia e melão (BURDMAN e WALCOTT, 2012). A bactéria é transmitida principalmente pelas sementes, que, se estiverem contaminadas, darão origem a mudas contaminadas. No campo, a disseminação pode ser feita por respingos de água e as folhas doentes podem infectar os frutos (KUROZAWA et al., 2005).

Santos e Viana (2000) relataram que a mancha-aquosa do melão, causada por esta bactéria, causou prejuízos elevados na safra de 2000, principalmente no período chuvoso, dizimando integralmente as produções em determinadas lavouras nos municípios de Quixeré (Ceará) e Mossoró (Rio Grande do Norte).

Os sintomas característicos da murcha bacteriana do fruto em cucurbitáceas são pequenas manchas verde-oliva escuro. Inicialmente, surgem pequenas manchas com menos de 1 cm de diâmetro que logo se expandem e tomam todo o fruto em 7 a 10 dias, ao final, o fruto apodrece. Nas folhas surgem manchas pequenas e imperceptíveis e observam-se lesões escuras e encharcadas em períodos de alta umidade (KUROZAWA et al., 2005).

## **2.5. Uso dos produtos naturais no controle de fitopatógenos**

Sabe-se que, em todos os lugares do mundo onde se pratica agricultura comercial, o controle de doenças de plantas é largamente realizado por meio de pesticidas (KIMATI et al., 1997). Embora o uso racional desses produtos tenha um efeito imediato positivo para o produtor, seu emprego em longo prazo acarreta prejuízos para a sociedade e para o meio ambiente devido à poluição causada pelos resíduos, além do surgimento de isolados dos fitopatógenos resistentes às substâncias químicas utilizadas (STANGARLI et al., 1999).

Devido a essa crescente resistência dos microrganismos patogênicos frente aos produtos sintéticos, é intensa a procura por novos agentes antimicrobianos a partir de plantas (AMARAL e BARA, 2005). Problemas com efeitos tóxicos de produtos químicos sintéticos aos organismos não alvos e de poluição do meio ambiente estimularam as pesquisas em torno do potencial de pesticidas de origem vegetal (AMADIOHA, 2000). No Brasil e no mundo estão sendo procuradas alternativas para o desenvolvimento de uma agricultura que seja sustentável e ecologicamente correta (ZADOKS, 1992; KIMATI et al., 1997).

Buscando-se proporcionar a máxima eficiência de controle com o menor impacto ambiental, opções seguras têm sido investigadas, utilizando-se extratos de plantas medicinais ou não para o controle de fitopatógenos. Esses extratos apresentam em sua composição substâncias efetivas contra estes patógenos e são praticamente inofensivas para o meio ambiente, quando comparadas com derivados sintéticos, podendo até superá-los em sua ação antimicrobiana (FAWCETT e SPENCER, 1970; MIGUEL e MIGUEL, 1999; STANGARLIN et al., 1999).

Um dos enfoques da agricultura sustentável é o controle alternativo de doenças de plantas, no qual se incluem a indução de resistência em plantas e o controle biológico (BETTIOL, 1991).

A indução de resistência envolve a ativação de mecanismos ocultos de defesa, existentes nas plantas, em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos (HAMMERSCHMIDT e DANN, 1997). Esses mecanismos de resistência induzidos podem ser estruturais, como papila, lignificação e tilose, ou bioquímicos, como o acúmulo de fitoalexinas e de proteínas relacionadas à patogênese (PASCHOLATI e LEITE, 1995). Moléculas ou agentes de origem abiótica ou biótica, capazes de induzir ou ativar qualquer resposta de defesa nas plantas, são chamadas de elicitores (SMITH, 1996), podendo apresentar-se como oligossacarídeos, glicoproteínas, oligopeptídeos ou ácidos graxos, uma

natureza química variada, demonstrando a não existência de característica estrutural única na determinação da atividade elicitora (STANGARLIN et al., 1999).

O controle biológico é exercido pela ação direta de um microrganismo sobre o outro, que pode ser por meio de antibiose, parasitismo, competição, predação ou hipovirulência (COOK e BAKER, 1983).

Os produtos naturais de origem vegetal e seus equivalentes são importantes fontes de novos defensivos agrícolas para uso no controle de doenças de plantas. Dentre esses produtos, os óleos essenciais e os extratos brutos, caracterizados como metabólitos secundários de plantas e de baixa toxicidade a mamíferos, são amplamente testados no controle de fitopatógenos (SILVA e BASTOS, 2007).

Trabalhos desenvolvidos com extratos brutos e óleos essenciais, obtidos a partir de plantas medicinais da flora nativa, têm indicado o potencial das mesmas no controle de fitopatógenos (DI PIERO et al., 2010). Como exemplo, tem-se o controle *in vitro* dos fungos *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. musae* e *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* por óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *C. citratus* e *Eucalyptus citriodora* (ALVES et al., 2003), o controle de antracnose em frutos de goiaba (*Psidium guajava* L.) por extrato aquoso e óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) (ROZWALKA et al., 2008), o controle do crestamento bacteriano comum do feijoeiro por tinturas de erva cidreira (*Lippia Alba*) e alecrim pimenta (*Lippia sidoides*) e com os óleos essenciais alecrim (*Rosmarinu officinalis*) e de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) (VIGO et al., 2009).

É um desafio e incentivo aos cientistas explorar plantas que sejam fontes de compostos bioativos promissores e com propriedades medicinais, no entanto, apenas no último século, as várias propriedades medicinais de plantas têm sido estudadas cientificamente (HOLETZ et al., 2002; NOVAIS et al., 2003).

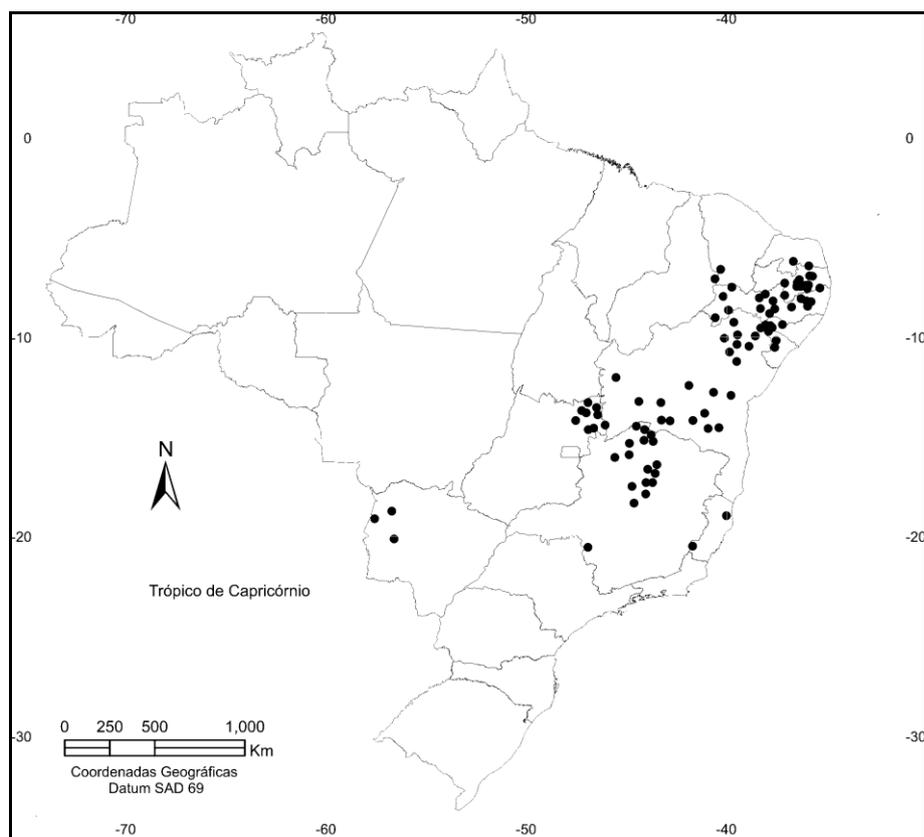
O interesse no uso de extratos vegetais para o controle de pragas vem crescendo cada vez mais, principalmente devido a alguns fatores, como manutenção da biodiversidade local, preservação e qualidade da água, conservação de solos, produção de alimentos livre de resíduos de agrotóxicos e por propiciar melhor qualidade de vida aos agricultores responsáveis pela produção (SILVA, 2007).

## **2.6. Espécies vegetais com potencial uso no controle de fitopatógenos**

### **2.6.1. *Schinopsis brasiliensis* Engl.**

*Schinopsis brasiliensis* pertence à família botânica Anacardiaceae, e é a principal espécie representante do gênero *Schinopsis*, que é nativo do Brasil (SARAIVA, 2007). É uma árvore endêmica, popularmente conhecida por “braúna” e “baraúna” (CARDOSO et al., 2005), característica da caatinga e de grande valor econômico para a região nordestina (Figura 10). Cardoso et al. (2005) relata o enorme uso de sua madeira na fabricação de móveis, construção civil e de cercas, esse uso abusivo contribuiu para que a baraúna fosse considerada pelo Primeiro Relatório Nacional para a Convenção sobre Diversidade Biológica – Brasil como uma espécie ameaçada de extinção (BRASIL, 1998). Por isso, seu corte é proibido (CARVALHO, 2009).

A baraúna (Figura 11) é uma árvore de copa arredondada e densa, de 10 – 12 m de altura, ramos providos de espinhos fortes de até 3,5 cm de comprimento, tronco de 50-60 cm de diâmetro revestido por casca espessa com ritidoma escamoso. As folhas são compostas, imparipinadas, com 9-17 folíolos subcoriáceos e de superfície lustrosa, ovalados e elípticos de 3-4 cm de comprimento por 2 cm de largura. Inflorescência em partículas terminais com flores amareladas e frutos do tipo sâmara (LORENZI, 2008).



**Figura 10** - Locais identificados de ocorrência natural de Baraúna (*Schinopsis brasiliensis*) no Brasil.

Fonte: CARVALHO, 2009.



**Figura 11** - Planta adulta - *Schinopsis brasiliensis* Engl.

### 2.6.1.1 Trabalhos realizados sobre *Schinopsis brasiliensis* Engl.

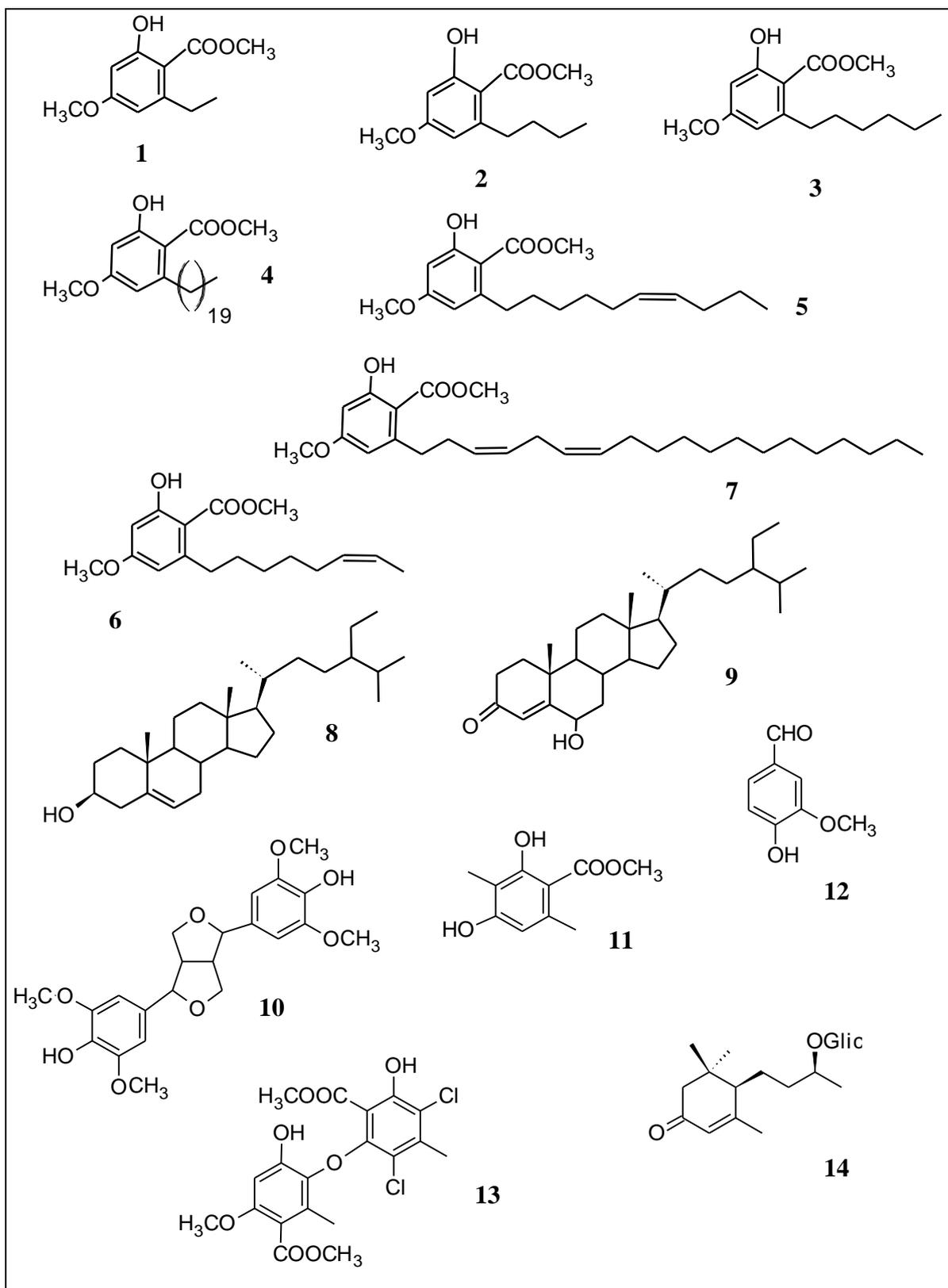
Alguns trabalhos com a baraúna foram encontrados na literatura, dentre eles poucos tratam de sua atividade antimicrobiana e seu estudo fitoquímico. Nas referências acerca das propriedades fitoquímicas da espécie, foi caracterizado o isolamento de vários metabólitos secundários. Do caule, Cardoso et al. (2003, 2006) isolaram n-alquil e n-alquenil fenóis, esteroides, lignana e outros compostos. Da folha, Lima et al. (2009) isolaram um *nor*-isoprenoide (Figura 12).

Segundo Saraiva (2007), a maioria dos estudos sobre baraúna deve-se ao seu caráter alergênico, evidenciado pela intensa dermatite de contato em indivíduos sensíveis. Cardoso et al. (2005) observaram nesta espécie a presença de aquil e alquenil fenóis que explicam esse caráter alergênico da espécie.

Saraiva (2007) relatou que os extratos metanólicos das folhas e flores de *Schinopsis brasiliensis* apresentaram CIM de  $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$  contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. O extrato da casca do caule com acetato de etila obteve CIM de  $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$  contra *S. aureus*.

Em estudos fitoquímicos realizados com esta espécie, foram encontrados ácidos fenólicos, flavonoides, triterpenos, esteroides, proantocianidinas e leucoantocianidinas, entre outros metabólitos com reconhecida atividade antimicrobiana (SARAIVA, 2007).

No trabalho de Chaves et al., (2011), o extrato hidroalcoólico das folhas de *S. brasiliensis* apresentou efeito antimicrobiano frente às bactérias *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *P. aeruginosa* e frente ao fungo *Candida albicans*, com Concentrações Mínimas Inibitórias (CIM) 6,25% para *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *E. coli*; 12,5% para *P. aeruginosa* e 100% para *C. albicans*.



**Figura 12** - Substâncias isoladas de partes da *Schinopsis brasiliensis*. Caule: n-alkil fenóis (1-4), n-alkenil fenóis (5-7), esteroides (8, 9), lignana (10) e outros compostos (11-13). Folha: nor-isoprenoide (14).

Fonte: CARDOSO et al., 2003, 2006; LIMA et al., 2009.

### 2.6.2. *Euphorbia trigona* Law.

*Euphorbia trigona* (Figura 13), da família Euphorbiaceae, é uma planta herbácea, de caules deitados, delgadamente filiformes, ramosos, glabros ou uniformemente crespocerosos; folhas curto-pecioladas, glabras ou esparsamente pubescentes na parte inferior, elípticas ou obovais, um pouco mais agudamente denticuladas no ápice. Cápsulas glabras, tendo cocas com cerdas ásperas junto às carenas agudas; semente parda, tetrágona, aguda, com 5 a 7 sulcos profundos (CORRÊA, 1976).

É de vasta distribuição geográfica, desde a parte ocidental quente da África às ilhas Maurícia e Bourbon, Canárias e Cuba, zona tropical e subtropical da América, do Texas e Luisiana ao Peru, Guianas e todo o Brasil. Popularmente conhecida como "árvore-de-leite africana", "caá-cambuí", "candelabro", "quebra pedra" e "erva de santa maria" (CORRÊA, 1976).

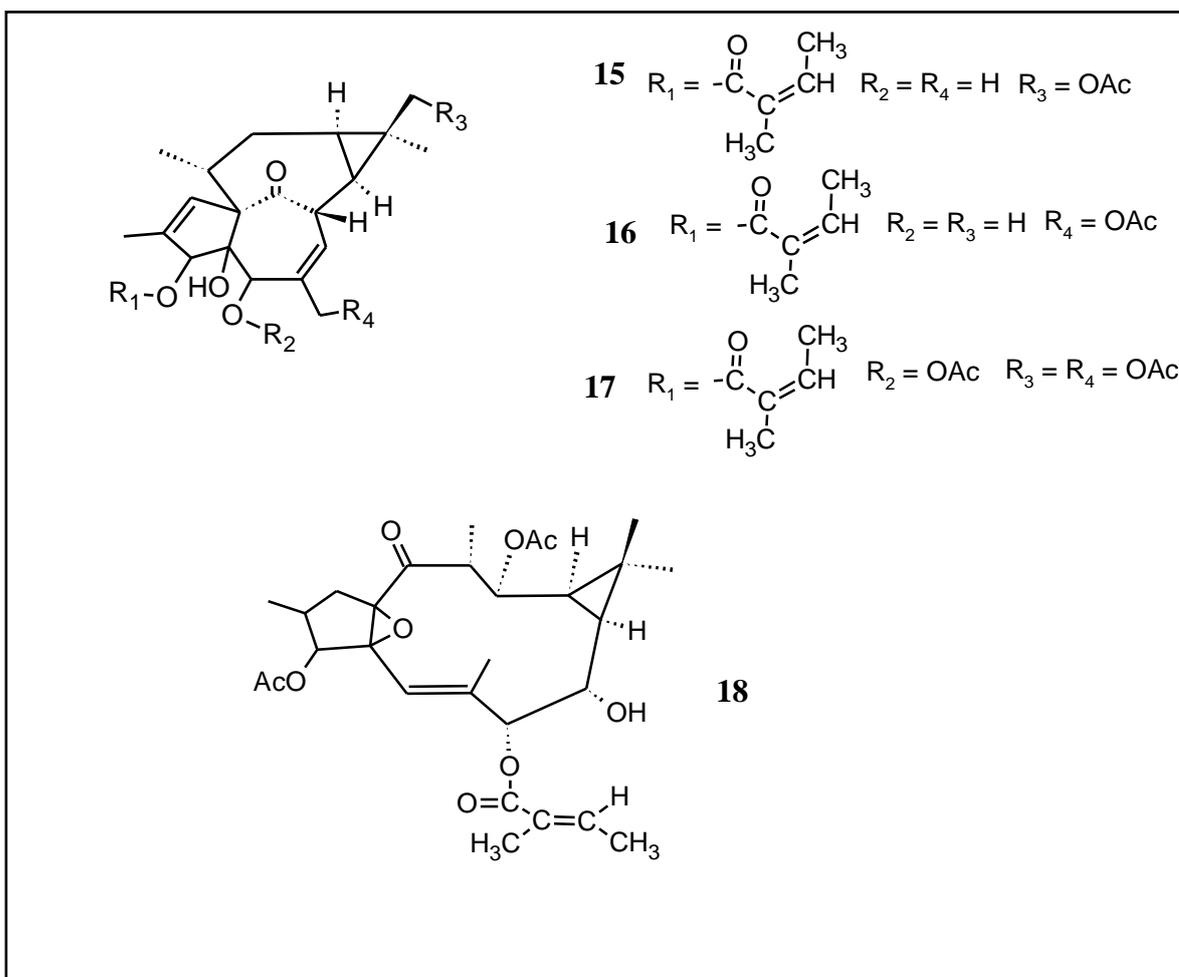
Esta planta é usada popularmente como purgativo e como remédio no tratamento de dores de ouvido. A literatura relata a presença de diterpenos tóxicos, esteroides e triterpenos como seus constituintes químicos (SIMÕES et al., 2004; TADA e SEKI, 1989).



**Figura 13** - Partes aéreas de *Euphorbia trigona* Law.

### 2.6.2.1 Trabalhos realizados sobre *Euphorbia trigona* Law.

Poucos trabalhos acerca do estudo fitoquímico e avaliações antimicrobianas foram encontrados na literatura sobre a *E. trigona*. Tada e Seki (1989) isolaram quatro compostos, sendo três ésteres ingenol piscicida e um éster ingol (Figura 14).



**Figura 14** - Substâncias isoladas de *Euphorbia trigona*: ésteres ingenol piscicida (15-17) e éster ingol (18).

Fonte: TADA e SEKI, 1989.

O látex das plantas do gênero *Euphorbia* é conhecido por conter várias di e tri-terpenos e seus ésteres, que possuem propriedades anti-infecciosas (CATENI et al, 2003).

Nashikkar et al. (2011) observaram que o extrato do látex de *E. trigona* não possui atividade antimicrobiana nas concentrações de 0,02-0,05 mg.mL<sup>-1</sup>, mesmo contra bactérias gram-positivas. Atividade antimicrobiana foi observada apenas quando utilizadas altas concentrações do extrato.

Van Deenen et al. (2011) descreveram que a principal lectina do látex desta planta apresentou potente ação fungicida contra *Aspergillus niger* e *Fusarium graminearum*, com valores de CIM igual a  $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$  e  $0,075 \text{ mg.mL}^{-1}$ , respectivamente.

### 3. OBJETIVOS DO TRABALHO

#### 3.1. Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana de *Schinopsis brasiliensis* (Anacardiaceae) e *Euphorbia trigona* (Euphorbiaceae) contra fitopatógenos de interesse na agricultura.

#### 3.2. Específicos

- Obter diferentes extratos a partir das folhas, caule e raízes de *Schinopsis brasiliensis* e das partes aéreas e látex da *Euphorbia trigona*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana destes extratos in vitro contra microrganismos patogênicos de interesse na agricultura;
- Avaliar a biotoxicidade dos extratos que apresentarem atividade antimicrobiana através do ensaio de toxicidade contra *Artemia salina*;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos diferentes extratos frente ao fungo *Fusarium solani* e às bactérias *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xanthomonas campestris* pv. *vitícola*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Ralstonia solanacearum* e *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*;
- Identificar se os extratos que apresentaram atividade antimicrobiana são bacteriostáticos ou bactericidas.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Local e período experimental

Os experimentos foram realizados no período compreendido entre junho de 2011 e fevereiro de 2013, no Laboratório de Pesquisa em Substâncias Bioativas - LAPESB, localizado no *Campus* de Itapetinga e no Laboratório de Fitopatologia, localizado no *Campus* de Vitória da Conquista, ambos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB.

### 4.2. Coleta do material vegetal

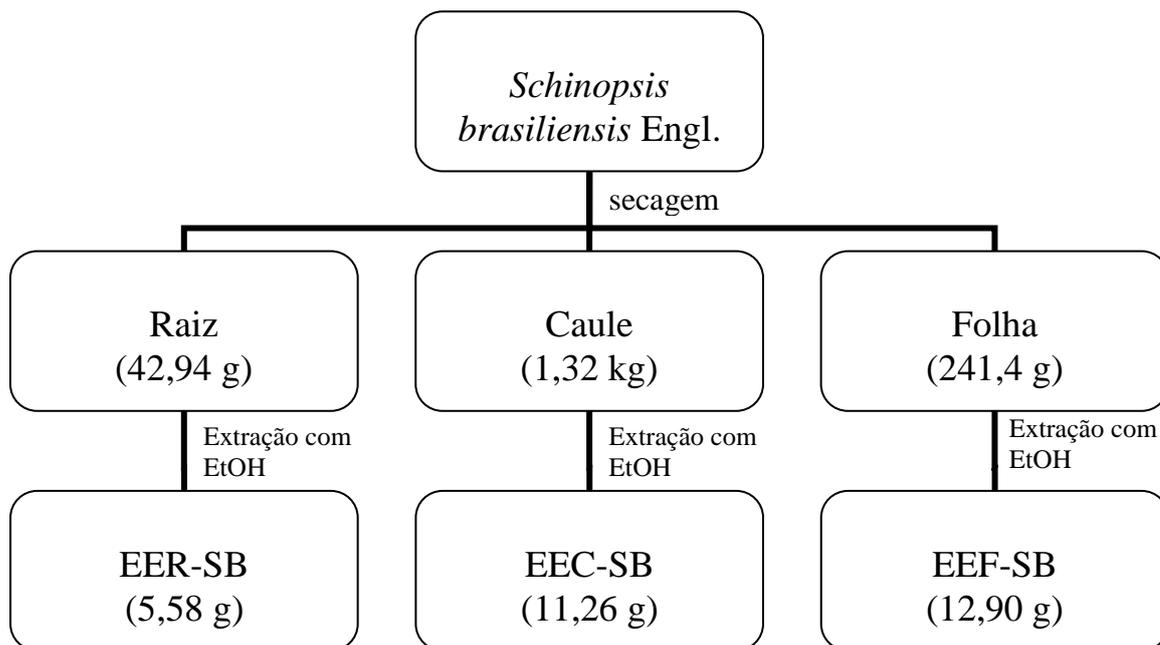
Folhas, cascas do caule e raiz secundária de *Schinopsis brasiliensis* foram coletadas na fazenda Caatinga Grande, município de Malhada de Pedras, região sudoeste da Bahia, no mês de junho de 2011. Fragmentos das partes aéreas e látex de *Euphorbia trigona* foram coletados no Parque Zoológico da Matinha, município de Itapetinga, região sudoeste da Bahia, no mês de agosto de 2012. As exsiccatas foram depositadas no herbário da UESB, campus de Vitória da Conquista, sob registro de n.º HUESBVC 4124 para *S. brasiliensis* e n.º HUESBVC 6388 para *E. trigona*.

### 4.3. Preparação dos extratos

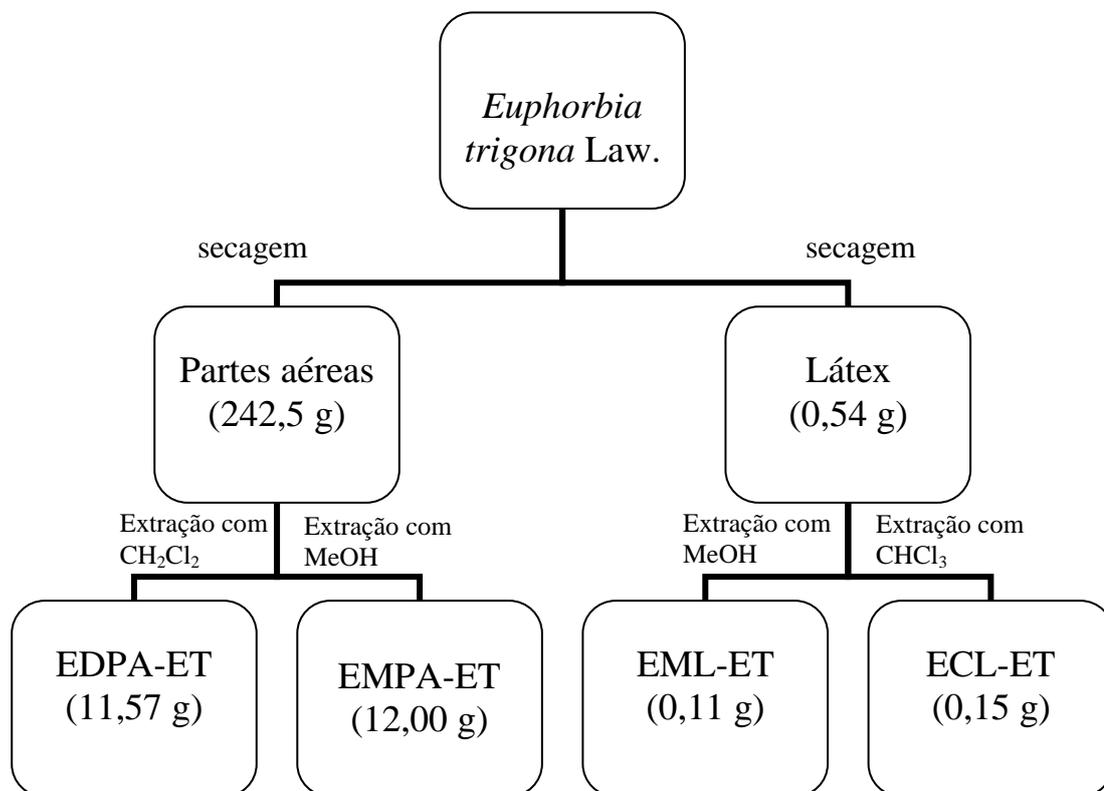
As partes de cada uma das espécies foram separadamente submetidas à secagem em estufa com circulação forçada de ar a 50°C durante 48h. O látex de *E. trigona* foi secado à temperatura ambiente, sob ventilação mecânica.

O material vegetal seco referente às folhas, cascas do caule e raízes secundárias de baraúna foi triturado e separadamente extraído com etanol 96% por maceração, originando, após concentração em rotavapor, os extratos etanólicos das folhas (EEF-SB, 12,90g), caule (EEC-SB, 11,26g) e raiz (EER-SB, 5,58g) (Figura 15).

As partes aéreas de candelabro foram pulverizadas em moinho de bola, e então extraídos com diclorometano e, subsequentemente com metanol, levando à obtenção dos extratos diclorometânico (EDPA-ET, 11,57g) e metanólico (EMPA-ET, 12,00g). O látex seco foi extraído com metanol e, em seguida, com clorofórmio, fornecendo os extratos metanólico (EML-ET, 0,11g) e clorofórmico (ECL-ET, 0,15g) (Figura 16).



**Figura 15** – Fluxograma da obtenção dos extratos de *Schinopsis brasiliensis* Engl.



**Figura 16** - Fluxograma da obtenção dos extratos de *Euphorbia trigona* Law.

#### **4.4. Avaliação dos extratos contra fitopatógenos**

Os extratos obtidos de *S. brasiliensis* Engl. e *E. trigona* Law. (Figuras 15 e 16) foram ensaiados contra o fungo *F. solani* e bactérias do gênero *Xanthomonas*, *Pectobacterium*, *Ralstonia* e *Acidovorax*.

##### **4.4.1. Ensaio contra fungo**

###### **4.4.1.1. Preparo do isolado de *Fusarium solani***

Para a avaliação antifúngica, foi utilizado o fungo *Fusarium solani* isolado de maracujazeiro e mantido no Laboratório de Fitopatologia da UESB, *Campus* de Vitória da Conquista.

As colônias de *Fusarium solani* foram crescidas em placas de petri de 90 mm, contendo 20 mL de meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar). Essas placas foram colocadas em câmara de incubação (BOD) à 25°C, durante sete dias, período necessário para o fungo ocupar todo o diâmetro da placa.

###### **4.4.1.2. Obtenção de diferentes concentrações dos extratos**

Inicialmente foram utilizados apenas os extratos etanólicos da raiz, caule e folhas da baraúna. De cada extrato, foram utilizadas 0,2g diluídas em 5 mL de acetona, completando-se para 20 mL de água destilada e autoclavada, obtendo soluções com concentração de 10 mg.mL<sup>-1</sup> cada.

Para se alcançar as concentrações desejadas de 0,001; 0,005; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 e 1 mg.mL<sup>-1</sup>, foram diluídas proporcionalmente as soluções obtidas dos extratos em meio de cultura sintético BDA (Merck) e colocadas em placas de petri. Para o controle (0 mg.mL<sup>-1</sup>), foi utilizado meio BDA, água destilada e autoclavada e acetona, solvente utilizado para dissolver os extratos.

Para os extratos de *E. trigona*, foram feitos testes apenas com a concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup> para uma avaliação prévia.

###### **4.4.1.3. Inoculação do fungo**

Após a solidificação dos meios de cultura nas placas de petri com as diferentes concentrações citadas anteriormente, discos de 5 mm de diâmetro do micélio de *Fusarium solani*, com 8 dias de idade, foram repicados para o centro de cada placa, as quais foram vedadas com filme plástico e colocadas de forma aleatória na câmara de incubação à temperatura de 25°C.

#### 4.4.1.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação de uma pequena quantidade da substância, necessária para inibir o crescimento do microrganismo-teste, é conhecida como Concentração Inibitória Mínima (CIM) (OSTROSKY et al., 2008). Esta avaliação foi feita através de medições a cada dois dias dos diâmetros das colônias (média de duas medidas diametralmente opostas) (Figura 17), iniciadas após 48 horas de incubação, perdurando sete dias, ou seja, até o momento em que as colônias fúngicas do tratamento controle tomaram completamente a superfície do meio de cultura.

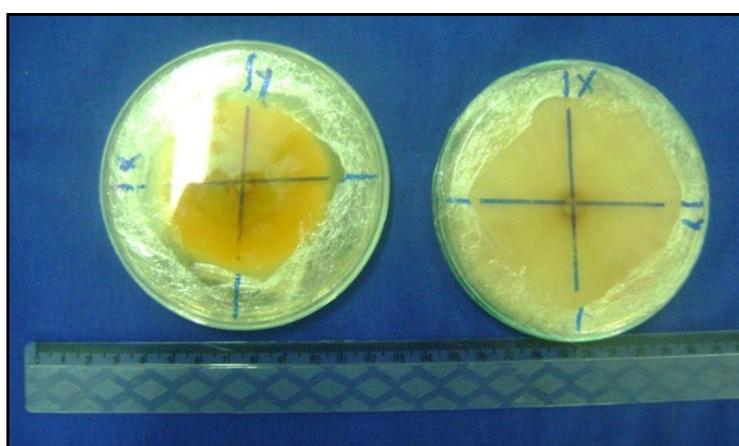


Figura 17 - Medição dos diâmetros das colônias do *Fusarium solani*.

#### 4.4.1.5. Procedimentos estatísticos

Para barafúna, o delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), em um esquema fatorial 3x10, com três extratos (EEF-SB, EEC-SB e EER-SB) e dez concentrações (0; 0,001; 0,005; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 e 1 mg.mL<sup>-1</sup>), com três repetições, sendo cada unidade experimental composta por uma placa de Petri.

Com candelabro, o experimento foi montado utilizando quatro extratos (EDPA-ET, EMPA-ET, EML-ET e ECL-ET) na concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup> e a testemunha, com três repetições, em um delineamento estatístico inteiramente casualizado (DIC).

Para todos os fatores avaliados, realizou-se a análise de variância e a comparação de médias entre tratamentos pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa SISVAR 5.1 (FERREIRA, 2011). Os dados do diâmetro de *Fusarium solani* no experimento com extratos de *S. brasiliensis* foram transformados em  $\sqrt{X}$  para serem normalizados.

#### **4.4.2. Ensaio contra bactérias**

##### **4.4.2.1. Avaliação preliminar contra *X. campestris* pv. *campestris***

Para a avaliação preliminar da atividade antibacteriana dos extratos obtidos, foi utilizada a bactéria *X. campestris* pv. *campestris* isolada de couve e mantida no Laboratório de Fitopatologia da UESB, *Campus* de Vitória da Conquista.

Para o crescimento da bactéria, placas de petri de 20 mL com meios de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) foram incubadas em câmara de incubação (BOD) à 28°C por 48 horas.

##### **4.4.2.1.1. Obtenção de diferentes concentrações dos extratos**

O método de diluição dos extratos e obtenção das diferentes concentrações em meio BDA foi o mesmo utilizado para o ensaio antifúngico. As concentrações utilizadas foram de 0,02; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 e 1 mg.mL<sup>-1</sup>.

##### **4.4.2.1.2. Inoculação da bactéria**

Após a solidificação dos meios de cultura com as diferentes concentrações dos extratos, pipetou-se, para cada placa de Petri, uma alíquota de 0,1 mL de suspensão de bactérias com turbidez correspondente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland, o qual representa uma contagem de bactérias igual a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. A suspensão foi espalhada sobre a superfície do meio de cultura com auxílio da alça de Drigalsky. As placas foram vedadas com filme plástico e colocadas invertidas e de forma aleatória na câmara de incubação à temperatura de 28°C.

##### **4.4.2.1.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

O valor da CIM correspondeu à menor concentração de extrato que inibiu completamente o crescimento do microrganismo, após uma incubação de aproximadamente 80 horas, em comparação com o controle negativo.

#### **4.4.2.2. Avaliações finais contra outras bactérias**

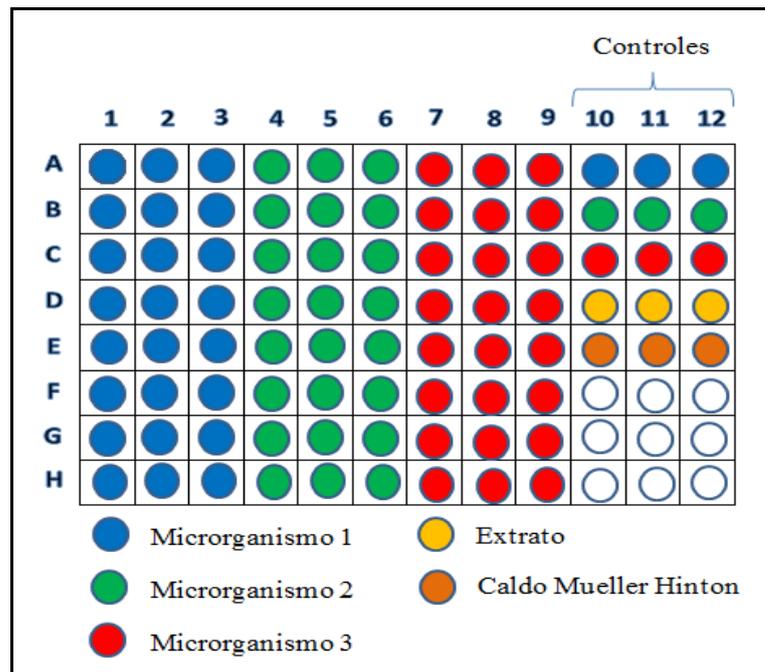
##### **4.4.2.2.1. Bactérias padrões**

Para a avaliação final da atividade antibacteriana dos extratos de *S. brasiliensis*, foram utilizadas as seguintes cepas de bactérias padrões cedidas pela Coleção de Culturas do Laboratório de Fitopatologia – CCLF da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE e as respectivas culturas de onde foram isoladas: *Xanthomonas campestris* pv.

*campestris* (Xcc56) da folha do repolho, *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Xcv112) do ramo da videira, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc23) da folha da alface lisa, *Ralstonia solanacearum* (Raça 1) (CGH12) do caule do pimentão, *Ralstonia solanacearum* (Raça 2) (B19) da banana prata e *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac1.12) do melão amarelo.

#### 4.4.2.2.2. Técnica de Microdiluição em Caldo

Para determinação da atividade antibacteriana (in vitro) dos extratos, através da técnica de microdiluição em caldo, foram utilizadas microplacas estéreis contendo 96 micropoços cada uma. Foram distribuídos 90 µL de caldo Mueller Hinton nos micropoços. Em seguida, foram dispensados 90 µL do extrato obtendo uma primeira concentração de 20 mg.mL<sup>-1</sup> nas cavidades da linha A até a coluna 9 (nove). Seguindo com 8 (oito) diluições seriadas dos extratos de *S. brasiliensis* (EEF-SB, EEC-SB, EER-SB) em caldo Mueller Hinton, retirando 90 µL do micropoço mais concentrado para o sucessor, obtendo assim, concentrações decrescentes (20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,63; 0,31 e 0,16 mg.mL<sup>-1</sup>). Depois de realizadas as diluições seriadas, inoculou-se, em cada micropoço, 10 µL da suspensão bacteriana a ser testada, com turbidez correspondente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland, o qual representa uma contagem de bactérias igual a 1,5 x 10<sup>8</sup> UFC/mL. Em seguida, as microplacas foram incubadas à temperatura ambiente, por 24 horas, e após este período, em cada micropoço, foram adicionados 30 µL de resazurina a 0,01% como indicador de crescimento bacteriano. Após três horas de reincubação, a leitura pelo método visual foi realizada. Os testes foram realizados em triplicata para garantir a eficiência das análises e permitir que os dados fossem reprodutíveis. As colunas 10, 11 e 12 foram utilizadas para os controles negativos dos microrganismos, caldo e extrato (**Figura 18**).



**Figura 18** - Microplaca (contendo 96 micropoços) para técnica da Microdiluição em Caldo.

#### 4.4.2.2.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada após a incubação das microplacas (conforme a técnica de Microdiluição em Caldo descrita anteriormente), por 24 horas, em temperatura ambiente. A CIM corresponde à menor concentração da substância capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano no micropoço. Neste trabalho, utilizou-se uma solução de resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido), 0,01%, pra verificar a presença de crescimento microbiano. As colorações rosa e vermelha, após a adição da solução de resazurina, indicam a presença de células viáveis em crescimento e a coloração azul indica a ausência de crescimento microbiano. Assim, foi possível identificar a CIM de cada extrato testado.

#### 4.4.2.2.4. Teste bactericida/bacteriostático

Para identificar se os extratos ativos são bactericidas ou bacteriostáticos, foram preparadas placas de Petri com ágar Mueller Hinton para um subcultivo de 10 µL de cada micropoço, na qual houve inibição do crescimento bacteriano. Após 24 horas, a leitura pelo método visual foi realizada. Quando ocorre o crescimento de colônias de bactérias é constatado que o extrato é bacteriostático, ou seja, apenas inibe a multiplicação das bactérias, fissão binária, interferindo na síntese proteica, replicação do DNA e outros

aspectos do seu metabolismo, se ocorrer o contrário, o extrato é bactericida, ou seja, há morte das bactérias (PANKEY e SABATH, 2004).

#### **4.4.3. Bioensaio de toxicidade contra *Artemia salina***

Todos os organismos possuem um sistema interno de desintoxicação que, normalmente, é afetado por inúmeros fatores internos ou externos, alterando, assim, a suscetibilidade do organismo a vários contaminantes. Um dos componentes desse sistema é a glutathione S-transferase (GST), que tem sido reconhecida por desempenhar um papel importante na desintoxicação de xenobióticos em vertebrados e invertebrados (BROPHY *et al.*, 1989; GRANT e MATSUMURA, 1988). No trabalho de Papadopoulos *et al.* (2004), foi relatado a presença da enzima GST em três estádios de desenvolvimento (24h, 48h e adultos) do microcrustáceo *Artemia salina*, demonstrando que esse organismo pode ser utilizado na avaliação da toxicidade de xenobióticos contra animais vertebrados e invertebrados.

Portanto, para a detecção preliminar dos compostos bioativos e avaliação da toxicidade dos extratos, foi feito um bioensaio de toxicidade contra *Artemia salina*, que já é amplamente utilizado como marcador para poluição ambiental (BARAHONA e SACHEZ-FORTUM, 1996; NUNES *et al.*, 2006; SANCHEZ-FORTUM *et al.*, 1997; SARABIA *et al.*, 2001).

O bioensaio de toxicidade contra *Artemia salina* foi realizado de acordo o procedimento proposto por Batista *et al.* (2009). Uma solução de sal marinho e água (concentração de 40 g/L) foi preparada. Em um aquário foram colocados 100 mL desta solução com os cistos de *A. salina*, mantendo-os sobre iluminação artificial (27-30°C), durante 48 horas, para eclosão dos mesmos. Soluções com os extratos foram preparadas dissolvendo 50 mg do extrato em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Em triplicata, alíquotas de 12,5; 25 e 50 µL dessa solução foram diluídas em 5 mL de solução de sal marinho já preparada anteriormente, obtendo concentrações de 125, 250 e 500 µg/mL dos extratos de folha, caule e raiz de baráúna, um controle foi feito apenas com DMSO e solução de sal marinho. Larvas de *A. salina* (10-20) foram transferidas para essas concentrações e controle. Após 24 horas, foram contadas as larvas vivas e mortas para calcular a concentração letal (CL50) definida como a concentração de amostra que causa a morte de 50% das larvas.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Num primeiro momento, a avaliação da atividade antimicrobiana de três extratos de baraúna (EER-SB, EEC-SB e EEF-SB) e quatro extratos de candelabro (EDPA-ET, EMPA-ET, EML-ET e ECL-ET) foi realizada contra o fungo *Fusarium solani* e a bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Os resultados dessa avaliação estão representados nas Tabelas 1 a 5.

A análise de variância dos dados do experimento com os extratos de *S. brasiliensis* contra o *F. solani* (Tabela 1) demonstrou que não houve diferença significativa entre os extratos. Entretanto, entre as concentrações testadas e para a interação extrato x concentração, houve efeito significativo, levando à comparação das médias dos efeitos de concentração e concentração dentro de extratos pelo teste Tukey a 5% (Tabela 2).

**Tabela 1** - Quadro de análise de variância do experimento com os extratos de *Schinopsis brasiliensis* contra o *Fusarium solani*.

FV	GL	SQ	QM	F
Extratos	2	0.67605	0.33802	1.5189 ns
Concentrações	9	6.84672	0.76075	3.4184 *
Int. Extratos x Concentrações	18	10.59599	0.58867	2.6452 *
Tratamentos	29	18.11876	0.62478	2.8075 *
Resíduo	60	13.35265	0.22254	
Total	89	31.47141		

\*significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

Analisando as médias dos diâmetros de *F. solani* na análise da interação entre os extratos de *S. brasiliensis* e suas concentrações (Tabela 2), nota-se que não houve diferença significativa em nenhuma das concentrações dos extratos do caule e da folha de *S. brasiliensis* (EEC-SB e EEF-SB). No entanto, com o extrato da raiz de *S. brasiliensis* (EER-SB), a concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup> diferiu estatisticamente do controle (0 mg.mL<sup>-1</sup>).

**Tabela 2** - Médias dos diâmetros de colônias de *Fusarium solani*, submetidos a diferentes concentrações de extratos de folha (EEF-SB), caule (EEC-SB) e raiz (EER-SB) de *Schinopsis brasiliensis*.

CONCENTRAÇÃO (mg.mL <sup>-1</sup> )	EXTRATOS		
	FOLHA (EEF-SB)	CAULE (EEC-SB)	RAIZ (EER-SB)
0	9,1 <sup>1</sup> aA <sup>2</sup>	9,1 aA	9,1 aA
0,001	8,7 aA	8,4 aA	8,8 abA
0,005	8,7 aA	8,8 aA	9,4 aA
0,01	8,9 aAB	9,1 aA	8,2 abB
0,02	8,3 aB	9,4 aA	7,6 bB
0,05	8,3 aB	9,4 aA	8,7 abAB
0,1	9,2 aA	8,5 aA	8,7 abA
0,25	9,0 aA	8,7 aA	9,1 aA
0,5	8,8 aA	8,7 aA	9,0 aA
1	8,4 aA	8,3 aA	7,6 bA
CV%	5,40		

<sup>1</sup> Valores do diâmetro de colônias de *F. solani* transformados em  $\sqrt{X}$  para serem normalizados.

<sup>2</sup> Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Nas concentrações de 0, 0,001; 0,005; 0,1; 0,25; 0,5 e 1 mg.mL<sup>-1</sup>, não houve diferença significativa nos diâmetros medidos para os três diferentes extratos de *S. brasiliensis*. Na concentração de 0,01 mg.mL<sup>-1</sup>, observa-se que o extrato da raiz de *S. brasiliensis* (EER-SB) causou uma maior inibição que o do caule (EEC-SB). Os extratos da raiz e folha (EER-SB e EEF-SB) inibiram mais que o extrato do caule (EEC-SB) na concentração de 0,02 mg.mL<sup>-1</sup>, e o extrato da folha (EEF-SB) inibiu mais que o do caule (EEC-SB) na concentração de 0,05 mg.mL<sup>-1</sup>. Observando os dados do extrato da raiz, podemos notar que nas concentrações 0,02 e 1 mg.mL<sup>-1</sup> houve diferença significativa, ou seja, o fungo foi inibido nessas concentrações. Na concentração de 0,02 mg.mL<sup>-1</sup> é notável que esse resultado pode estar associado a algum erro experimental, pois nas concentrações maiores (0,05; 0,1; 0,25 e 0,5) não foi observada a inibição do crescimento micelial do *Fusarium solani*, voltando a inibir somente na concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup>, que pode ser a real CIM.

No quadro da análise de variância do experimento com os extratos de *E. trigona* contra *F. solani* (Tabela 3), pode-se notar um resultado significativo entre os tratamentos, levando à análise das médias desses tratamentos pelo teste Tukey a 5% (Tabela 4). Mesmo apresentando diferença estatística significativa entre os tratamentos, estes não diferiram da testemunha, ou seja, os extratos de *E. trigona* não inibiram o crescimento do fungo *F. solani*.

**Tabela 3** - Quadro da análise de variância do experimento com os extratos de *Euphorbia trigona* contra *Fusarium solani*.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	1216	304	6.2041 *
Resíduo	10	490	49	
Total	14	1706		

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

**Tabela 4** - Médias dos diâmetros (em milímetro) das colônias de *Fusarium solani* com os extratos de *Euphorbia trigona* e testemunha.

Tratamentos	Médias
ECL-ET	62.67 <sup>1</sup> a <sup>2</sup>
EML-ET	78.67 ab
Testemunha	81.00 ab
EMPA-ET	82.67 b
EDPA-ET	90.00 b
CV%	8.86

<sup>1</sup> Valores (mm) do diâmetro das colônias de *F. solani*.

<sup>2</sup> Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

ECL-ET – Extrato clorofórmico do látex de *Euphorbia trigona*, EML-ET – Extrato metanólico do látex de *Euphorbia trigona*, EMPA-ET -Extrato metanólico das partes aéreas de *Euphorbia trigona*, EDPA-ET – Extrato diclorometânico das partes aéreas de *Euphorbia trigona*.

Observa-se nos resultados das avaliações preliminares contra *X. campestris* pv. *campestris* em meio de cultura BDA (**Tabela 5**) que os extratos de *E. trigona* foi considerado antimicrobiano, no entanto, a concentração, por ser elevada, não é viável para estudos in vivo. Já os extratos de *S. brasiliensis* apresentaram valores de CIM menores contra a bactéria ensaiada e, por isso, foram selecionados para ser testados contra outras bactérias fitopatogênicas, utilizando-se a técnica da microdiluição em caldo.

Segundo Tegos et al. (2002), extratos de plantas podem ser classificados como “antimicrobianos” quando, em testes de sensibilidade, alcançarem valores de CIM menores ou iguais a 1 mg.mL<sup>-1</sup>. Portanto, diante dos resultados apresentados na Tabela 5, conclui-se que todos os extratos de *S. brasiliensis* (EER-SB, EEC-SB, EEF-SB) e o extrato diclorometânico das partes aéreas de *E. trigona* (EDPA-ET) podem ser classificados como antimicrobianos.

**Tabela 5** - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM, mg.mL<sup>-1</sup>) dos extratos de *Schinopsis brasiliensis* e *Euphorbia trigona* contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* nas avaliações preliminares em meio de cultura BDA.

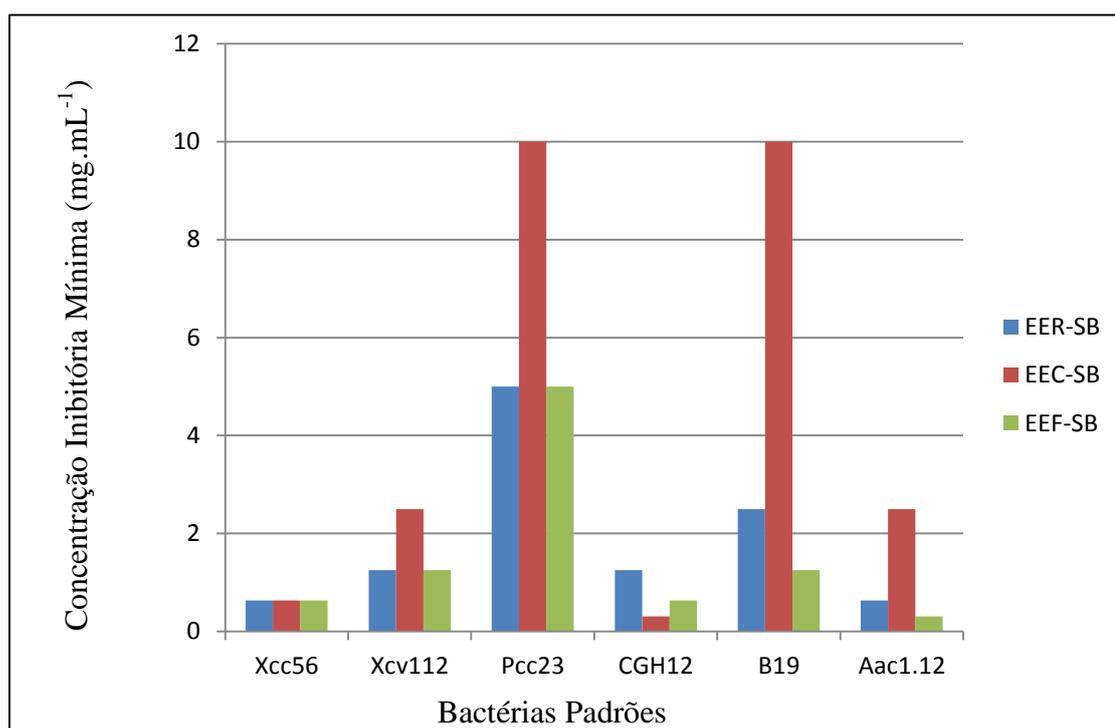
Bactéria	CIM (mg.mL <sup>-1</sup> )						
	Extratos de <i>S. brasiliensis</i>			Extratos de <i>E. trigona</i>			
	EER-SB	EEC-SB	EEF-SB	EDPA-ET	EMPA-ET	EML-ET	ECL-ET
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	0,1	0,25	0,1	1	-	-	-

- ausência de inibição

As Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) dos extratos etanólicos de *S. brasiliensis*, obtidas pelo método de microdiluição em caldo contra outras bactérias, estão apresentadas na Tabela 6. Nota-se que os valores de CIM variaram entre 0,31 e 10 mg.mL<sup>-1</sup> frente aos seis microrganismos testados. Observa-se que o extrato da folha apresentou uma CIM menor contra três dos microrganismos testados, B19, Aac1.12 e Xcc56. Apenas contra a bactéria *R. solanacearum* (Raça1) (CGH12), o extrato do caule foi mais eficiente, apresentando CIM de 0,31 mg.mL<sup>-1</sup>. Os extratos de folha, caule e raízes foram igualmente eficientes contra Xcc56. Dentre as bactérias testadas, a *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc23) foi a mais resistente, apresentando CIM entre 5 e 10 mg.mL<sup>-1</sup> para todos os três extratos ensaiados de *S. brasiliensis*. Dessa forma, segundo os critérios de Tegos et al. (2002), nenhum desses extratos mostrou-se ativo contra essa bactéria. O extrato da raiz apresentou CIM de 0,63 mg.mL<sup>-1</sup> contra as bactérias *X. campestris* pv. *campestris* (Xcc56) e *A. avenae* subsp. *citruilli* (Aac1.12), e de e 1,25 mg.mL<sup>-1</sup> contra as bactérias *X. campestris* pv. *viticola* (Xcv112) e *R. solanacearum* (Raça 1) (CGH12), resultados que demonstram uma boa capacidade de inibição do crescimento bacteriano por parte deste extrato.

**Tabela 6** - Concentrações Inibitórias Mínimas dos extratos de *Schinopsis brasiliensis* sobre microrganismos usando a técnica de microdiluição em caldo.

Bactérias Padrões (CCLF)	CIM (mg.mL <sup>-1</sup> )		
	Extratos etanólicos		
	Raiz	Caule	Folha
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (Xcc56)	0,63	0,63	0,63
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> (Xcv112)	1,25	2,5	1,25
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> (Pcc23)	5	10	5
<i>Ralstonia solanacearum</i> (Raça 1) (CGH12)	1,25	0,31	0,63
<i>Ralstonia solanacearum</i> (Raça 2) (B19)	2,5	10	1,25
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> (Aac1.12)	0,63	2,5	0,31



**Figura 19** - Concentração Inibitória Mínima (CIM, mg.mL<sup>-1</sup>) de extratos etanólicos da raiz (EER-SB), caule (EEC-SB) e folha (EEF-SB) de *Schinopsis brasiliensis* Engl. contra cepas das bactérias *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc56), *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Xcv112), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc23), *Ralstonia solanacearum* (Raça 1) (CGH12), *Ralstonia solanacearum* (Raça 2) (B19) e *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac1.12)

Na Figura 19, pode ser observado o melhor desempenho do extrato da folha de *S. brasiliensis*, sendo o mesmo capaz de inibir o crescimento do microrganismo *A. avenae*

subsp. *citrulli* (Aac1.12) com a CIM de 0,31 mg.mL<sup>-1</sup>. Nota-se também que o extrato do caule foi o que apresentou as maiores CIM contra a maioria das bactérias ensaiadas, excetuando-se *X. campestris* pv. *campestris* (Xcc56) e *R. solanacearum* (Raça 1) (CGH12) contra as quais esse extrato alcançou CIM de 0,63 e 0,31 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

Saraiva et al., (2011) e Chaves et al., (2011) atribuíram a atividade antimicrobiana da barauína à elevada concentração de compostos fenólicos, tais como taninos e flavonoides.

Segundo Aurichio e Bacchi (2003), ao comparar estudos com plantas medicinais, é evidente a dificuldade de avaliação entre os resultados, pois existem inúmeras diferenças que vão desde os aspectos climáticos, exercendo influência na composição química do vegetal, como o estágio do seu desenvolvimento na coleta, parte da planta estudada, preparo do material para estudo, até os protocolos seguidos nos experimentos. Ainda que estudos fitoquímicos prévios já tenham revelado o potencial de uma planta, é essencial reproduzir esses estudos no contexto etno-cultural das comunidades, com isso, os resultados serão evidências seguras e adequadas para afirmação da relação dose-efeito procurado.

Rios e Recio (2005) afirmaram que o principal problema com pesquisas envolvendo plantas e atividade antimicrobiana é a falta de uniformidade nos critérios adotados para o estudo. Isso, muitas vezes, leva a acentuadas contradições entre resultados obtidos por grupos distintos e até mesmo para os mesmos autores, analisando a mesma amostra com diferentes métodos.

Esses problemas supracitados explicam as diferenças de CIM observadas entre as avaliações preliminares e finais contra a bactéria *X. campestris* pv. *campestris*. O extrato testado foi o mesmo, mas as bactérias foram oriundas de regiões e culturas diferentes, os métodos de avaliação e os meios de cultura utilizados também diferiram entre si. No entanto, os dois métodos, apesar de gerarem valores de CIM's diferentes, indicam incontestavelmente a atividade antimicrobiana dos extratos de *S. brasiliensis* contra esse fitopatógeno, principalmente os extratos da raiz e folhas.

Os resultados do teste bactericida/bacteriostático revelaram que os extratos de *S. brasiliensis* apenas inibiram a multiplicação das bactérias, não as mataram, caracterizando-os como bacteriostáticos. Do ponto de vista de sua aplicação ao campo, esse resultado é importante, pois, além de controlar a doença causada pelos fitopatógenos, causa também

um menor impacto ambiental, devido à ausência de resíduos mais tóxicos que ficariam nos produtos agrícolas. A presença de substâncias antibióticas bactericidas poderia prejudicar a biodiversidade local e a saúde dos consumidores desses produtos. Por exemplo, o sulfato de cobre, que também é bacteriostático, é largamente utilizado no controle de fitopatógenos na agricultura e possui baixa toxicidade se comparado aos demais pesticidas (LEGASPI e ZENZ, 1994).

Os resultados dos extratos de *E. trigona*, obtidos neste trabalho, confirmam resultados já relatados por Nashikkar et al. (2011), que mostraram pouca atividade do extrato do látex frente às diversas bactérias. Essa fraca atividade antimicrobiana, observada no presente trabalho para os extratos de *E. trigona* contra *F. solani* e *X. campestris* pv. *campestris*, sugere que esta planta não dispõe de potencial uso para o controle desses fitopatógenos na agricultura.

Na avaliação da toxicidade dos extratos de *S. brasiliensis* pelo bioensaio de toxicidade contra *A. salina*, foi observado que não houve mortes das larvas do microcrustáceo nas maiores concentrações ensaiadas, indicando que esses extratos foram não-tóxicos para *A. salina*. Papadopoulos et al. (2004) relataram presença de glutathione S-transferase (GST) em três estádios de desenvolvimento (24h, 48h e adultos), indicando a utilização deste microcrustáceo como um modelo válido para a avaliação de toxicidade de xenobióticos contra animais vertebrados e invertebrados. Sendo assim, fica evidente o baixo potencial de toxicidade dos extratos de *S. brasiliensis* contra o meio ambiente, já que esses extratos ajudariam na manutenção e preservação do ambiente, produção de alimentos livres de resíduos de agrotóxicos e melhor qualidade de vida aos agricultores responsáveis pela produção.

Para comprovação da atividade antibacteriana desses extratos para uma possível utilização em campo, é necessário testes in vivo. Muitos extratos e óleos vegetais que apresentam efeitos in vitro contra fitopatógenos, quando testados em plantas, não mostram o mesmo efeito, daí a necessidade desses testes para um posterior estudo fitoquímico com vistas à identificação dos componentes ativos dos extratos de *Schinopsis brasiliensis*.

## 6. CONCLUSÕES

- Foram obtidos extratos etanólicos das folhas, caule e raízes de Baraúna (*S. brasiliensis*), bem como extratos metanólicos, clorofórmicos e diclorometânicos das partes aéreas e látex de Candelabro (*E. trigona*);
- Extratos de baraúna e candelabro apresentaram baixa atividade e nenhuma atividade, respectivamente, contra o fungo *Fusarium solani*, e os extratos de candelabro também apresentaram baixa atividade contra a bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, não sendo indicados para utilização no controle de doenças causadas por esses fitopatógenos;
- Os extratos etanólicos da raiz, caule e folha de baraúna podem ser considerados como não-tóxicos ao meio ambiente, oferecendo um menor risco à biodiversidade, à saúde dos consumidores e dos produtores agrícolas. Sendo também indicados para o desenvolvimento de produtos para o controle alternativo de doenças causadas pelas bactérias *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* e *Ralstonia solanacearum* (Raças 1 e 2);

## 7. REFERÊNCIAS

- ALVES, E. S. S. B.; PUPO, M. S.; MARQUES, S. S.; VILCHES, T. T. B.; SANTOS, R. B.; VENTURA, J. A.; FERNANDO, P. M. A Avaliação de óleos essenciais na inibição do crescimento de fungos de fruteiras tropicais. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, n.343, 2003. Suplemento.
- AMADIOHA, A.C. Controlling rice blast in vitro and in vivo with extracts of *Azadirachia indica*. **Crop Protection**, v.19, p.287-290, 2000.
- AMARAL, M. F. Z. J.; BARA, M. T. F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n.2, p. 5-8, 2005.
- ANDRADE, E. A.; FELIX, G. C.; OLIVEIRA, A. C.; NORONHA, E. F.; PEREIRA, J. L.; LIMA, L. H. C.; ROSATO, Y. B.; MELO, J. A. T.; BLOCH JR, C.; MEHTA, A. Expressão diferencial de proteínas de *Xanthomonas campestris pv campestris* na interação com a planta hospedeira *Brassica oleracea*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília, DF: 1 ed, n. 93, 2005, 14 p.
- AURICCHIO, M. T.; BACCHI, E. M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 62, n.1, p. 55 - 61 , 2003.
- BARAHONA, M. V.; SANCHEZ-FORTUN, S. Toxicity of carbamates to the brine shrimp *Artemia salina* and the effect of atropine, BW284c51, iso-OMPA and 2-PAM on carbaryl toxicity. **Environ Pollut**, v.104, p.469-476, 1999.
- BATISTA, R.; BRANDÃO, G. C.; BRAGA, F. C.; OLIVEIRA, A. B. Cytotoxicity of *Wedelia paludosa* D.C. extracts and constituents. **Revista brasileira de farmacognosia**, João Pessoa, v. 19, n. 1A, p. 36-40, jan./mar. 2009.
- BEDENDO, I. P. Ambiente e doença. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3ª ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995, v.1, cap. 18, p.331-341.
- BETTIOL, W. **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. 388p. (EMBRAPA-CNPDA. Documentos, 15).
- BILA, J.; MONDJANA, A. M.; MORTENSEN, C. N.; LUND, O. S. **Podridão negra de repolho em Moçambique: Estratégias para o manejo sustentável da doença**. Copenhaga, Dinamarca: DSHC, 2012. 9 p.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. **Primeiro relatório nacional para a Convenção sobre Diversidade Biológica**: Brasília,1998. 283 p.

BROPHY, P. M.; PAPADOPOULOS, A.; TOURAKI, M.; COLES, B.; KORTING, W.; BARRETT, J. Purification of cytosolic glutathione transferases from *Schistocephalus solidus* (plerocercoid): interaction with anthelmintics and products of lipid peroxidation. **Molecular Biochemical Parasitology**, v. 36, p.187–196, 1989.

BURDMAN, S.; WALCOTT, R. *Acidovorax citrulli*: generating basic and applied knowledge to tackle a global threat to the cucurbit industry. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 8, p. 805–815, 2012.

CATENI, F.; ZILC, J.; FALSONE, G.; BANFAI, E. New cerebrosides from *Euphorbia peplis*: antimicrobial activity evaluation. **Bioorganic and medicinal chemistry letters**, v.13, p. 4345-4350, 2003.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens**. St. Paul: APS Press, 1983. 539p.

CARDOSO, M. P.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. A new alkyl phenol from *Schinopsis brasiliensis*. **Natural Product Research**, v.19, n.5, p.431-433, 2005.

CARDOSO, M. P.; FARIAS, M. T.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. **Estudo Fitoquímico do extrato clorofórmico do caule de *Schinopsis brasiliensis***. In: 26<sup>a</sup> RASBQ, 2003, Poços de Caldas- MG.

CARDOSO, M. P.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. **n- Alquil e n-alquenil fenóis identificados de *Schinopsis brasiliensis* (ANACARDIACEAE)**. In: 29<sup>a</sup> RASBQ, 2006, Águas de Lindóia – SP.

CARVALHO, P. E. R. Braúna-do-Sertão *Schinopsis brasiliensis*. **Comunicado Técnico 222**, Colombo, PR: 1 ed. Embrapa, julho, 2009, 9 p.

CHAVES, T. P.; DANTAS, I. C.; FELISMINO, D. C.; VIEIRA, K. V. M.; CLEMENTINO, E. L. C.; COSTAS, L. S. Atividade antimicrobiana das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engler. **BioFar – revista de biologia e farmácia**, v. 5, n. 2, p. 11-17, 2011.

CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; KIMATI, H. Doenças da bananeira. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A M.; BERGAMIN FILHO, A; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: doenças da plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2, cap.15, p. 99 -117.

CORRÊA, A. D. *et al.* **Plantas medicinais do cultivo á terapêutica**. 6. ed. Petrópolis, RJ: Vozes, 2003.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, v. 6. 1976.

DI PIERO, R. M.; NOVAES, Q. S.; PASCHOLATI, S. F. Effect of *Agaricus brasiliensis* and *Lentinula edodes* mushrooms on the infection of passionflower with *Cowpea aphid-borne* mosaic virus. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 2, p. 269-278, 2010.

EMERY, F. S.; SANTOS, G. B.; BIANCHI, R. C. **A Química na Natureza**. Rio de Janeiro: Ministério da Educação, Outubro, 2010. 70 p. (Coleção Química no Cotidiano; v.1).

HAUBEN, L.; MOORE, E. R. B.; VAUTERIN, L.; STEENACKERS, M.; MERGAERT, J.; VERDONCK, L.; SWINGS, J. Phylogenetic Position of Phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. **Systematic and Applied Microbiology**. v. 21, n. 3, p. 384–397, 1998.

FARR, D.F.; ROSSMAN, A.Y. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, **ARS**, USDA. July, 2010.

FAWCETT, C. H.; SPENCER, D. M. Plant chemotherapy with natural products. **A. Rev. Phytopath**, Palo Alto, v. 18, p. 403-418, 1970.

FERREIRA, D. F. **Sisvar: a computer statistical analysis system**. Ciência e Agrotecnologia (UFLA), v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FISCHER, I. H.; KIMATI, H.; REZENDE, J. A. M. Doenças do maracujazeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005, v.2, cap.53, p.467-474.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. F. P. S.; VIDOTI, G. J.; OLIVEIRA, A. J. B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n.4, p. 627-641, Out./Dez, 2008.

GARCION, C.; LAMOTTE, O.; MÉTRAUX, J. P. Mechanisms of defence to pathogens: biochemistry and physiology. In: WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. **Induced resistance for plant defence – a sustainable approach to crop protection**. Oxford: Blackwell, 2007, p.109-132.

GHINI, R.; NAKAMURA, D. Seleção de antagonistas e nutrientes que induzem supressividade de solos a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em microcosmos e *in vivo*. **Summa Phytopathologica**, v.27, n.3, p. 318-322, 2001.

GIBBS, B. M.; SKINNER, F. A. **Identification Methods for Microbiologists. Part A**. New York: Academic Press, 1966, 145 p.

GOODMAN, R. N.; KIRÁLY, Z.; WOOD, K. R. **The biochemistry and physiology of plant disease**. Columbia, University of Missouri Press, 1986. 433p.

GRANT, D. F.; MATSUMURA, F. Glutathione S-transferase-1 in *Aedes aegypti* larvae: purification and properties. **Insect Biochemistry**, v.18, p.615–622, 1988.

HAMMERSCHMIDT, D.; DANN, E. K. Induced resistance to disease. In: RECHCIGL,N.A.; RECHCIGL,J.E. **Environmentally Safe Approaches to Crop Disease Control**. Boca Raton: CRC. Lewis Publishers, p.177-199, 1997.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infection diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n.7, p. 1027-1031, out., 2002.

KIMATI, H.; GIMENEZ FERNANDES, N.; SOAVE, J.; KUROZAWA, C.; BRIGNANI NETO, F.; BETTIOL, W. **Guia de Fungicidas Agrícolas . Recomendações por Cultura**, 2. ed. Jaboticabal: Grupo Paulista de Fitopatologia, 1997, v.1, 225 p.

KRUGNER, T. L. A natureza da doença. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995, v.1, cap.3, p.34-44.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A.; KRAUSE-SAKATE, R. Doenças das solanáceas. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A M.; BERGAMIN FILHO, A; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: doenças da plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2, cap.65, p. 589-596.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A. Doenças do tomateiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A M.; BERGAMIN FILHO, A; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: doenças da plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2, cap.67, p. 607-626.

LEGASPI, J. A.; ZENZ, C.. Occupational health aspects of pesticides. In: ZENZ, C.; DICKERSON, O. B.; HORVATH JR., E. P. **Occupational Medicine**. New York: Mosby-Year Book Inc.,1994, p. 617-653.

LIMA, L. S.; MOREIRA, B. O.; LIMA, M. V. B.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. **C13-norisoprenoides isolados de espécies endêmicas da caatinga**. In 32<sup>a</sup> RASBQ, 2009, Fortaleza - CE.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras, manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 5. ed. Nova Odessa, SP: Intituto Plantarum, 2008. v. 1.

LYON, F. M.; WOOD, R. K. Production of phaseollin coumesterol and related compounds in bean leaves inoculated with *Pseudomonas* sp. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 70, p. 406-409, 1975.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAIOLI-AZEVEDO, V.; FONSECA-KRUEL, V. S. Plantas medicinais e ritualísticas vendidas em feiras livres no Município do Rio de Janeiro, RJ, Brasil: estudo de caso nas zonas Norte e Sul. **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v.21, n. 2, Abril/Junho, 2007.

MARINGONI, A. C. Doenças das crucíferas. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A M.; BERGAMIN FILHO, A; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: doenças da plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2, cap.31, p.285-291.

MASSOLA Jr., N. S.; JESUS Jr., W. C.; KIMATI, H. Doenças Do alho e da cebola. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A M.; BERGAMIN FILHO, A; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: doenças da plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2, cap.9, p.53-63.

MASSOLA Jr., N. S.; BEDENDO, I. P. Doenças da mandioca. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A M.; BERGAMIN FILHO, A; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: doenças da plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2, cap.51, p.449-455.

MICHELIN, D. C.; MORESCHI, P. E.; LIMA, A. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; PAGANELLI, M. O.; CHAUD, M. V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.4, p. 316-320, Out./Dez. 2005.

MICHEREFF, S.J. **Podridão negra**. In: Del Ponte, E.M. (Ed.) Fitopatologia.net - herbário virtual. Departamento de Fitossanidade. Agronomia, UFRGS. Disponível em: <http://www6.ufrgs.br/agronomia/fitossan/fitopatologia/ficha.php?id=177> Acesso em: 04 de outubro de 2012.

MICHEREFF, S. J. **Fundamentos de fitopatologia**. Recife-PE: UFRPE, 2001.

MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Robe Editorial, 1999.

NASHIKKAR, N.; BEGDE, D.; BUNDALE, S.; PISE, M.; RUDRA, J.; UPADHYAY, A. Inhibition of swarming motility, biofilm formation and virulence factor expression of urinary pathogens by *euphorbia trigona* latex extracts. **International Journal Pharmaceutical Sciences and Research (IJPSR)**, v. 2, n.3, p. 558-556, 2011.

NATIONAL COLLECTION OF PLANT PATHOGENIC BACTÉRIA – NCPPB. Disponível em: <www.ncppb.com>. Acesso em: 2006.

NJEVELDT, R.; NOOD, E. V.; HOORN, D. E. C. V.; BOELEN, P. G.; NORREN, K. V.; LEEAWEN, P. A. M. V. Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**. v.74, p. 418-25, 2001.

NOVAIS, T. S.; COSTA, J. F. O.; DAVID, J. P. L.; DAVID, J. M.; QUEIROZ, L. P.; FRANÇA, F.; GIULIETTI, A. M.; SOARES, M. B. P.; SANTOS, R. R.. Atividade

antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Rev. Bras. Farmacognosia**, v. 13, n. 2, p. 5-8, 2003.

NUNES, B. S.; CARVALHO, F. D.; GUILHERMINO, L. M.; VAN STAPPEN, G. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. **Environ Pollut**, v.144, p.453–462, 2006.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, TELMA M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n.2, p.301-307, Abr./Jun. 2008.

PANKEY, G. A.; SABATH, L. D. Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 6, p. 864-870, 2004.

PAPADOPOULOS, A. I.; LAZARIDOU, E.; MAURIDOU, G.; TOURAKI, M. Glutathione S-transferase in the branchiopod *Artemia salina*. **Marine Biology**, v. 144, p. 295-301, 2004.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: alterações fisiológicas induzidas por fitopatógenos. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995a, v.1, cap. 21, p.393-416.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995b, v.1, cap. 22, p.417-453.

PAVAN, M. A.; KRAUSE-SAKATE, R.; KUROZAWA, C. Doenças da alface. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A M.; BERGAMIN FILHO, A; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: doenças da plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2, cap.6, p.27-33.

PINHEIRO, C. R.; AMORIM, J. A. E.; DINIZ, L. E. C.; SILVA, A. M. F.; TALAMINI, V.; SOUZA JÚNIOR, M. T. Diversidade genética de isolados de *Ralstonia solanacearum* e caracterização molecular quanto a filotipos e sequevares. Brasília. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.6, p.593-602, 2011.

PURKAYASTHA, R.P. Progress in phytoalexin research during the past 50 years. In: DANIEL, M.; PURKAYASTHA, R.P. **Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action**. New York: Marcel Dekker, 1995, p.1-39.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C. **Medicinal plants and antimicrobial activity**. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 80–84, 2005.

RODRIGUES-NETO, J.; MALAVOLTA-Jr., V.A. Doenças causadas por bactérias em crucíferas. **Informe Agropecuário**, Brasília, v.17, n.183, p.56-59, 1995.

ROZWALKA, L. C.; LIMA, M. L. R. Z. C.; MIO, L. L. M.; NAKASHIMA, T. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, v.38, n.2, mar-abr, 2008.

SAKAGAMI, Y.; MIMURA, M.; KAJIMURA, K.; YOKOYAMA, H.; LINUMA, M.; TANAKA, T.; OHYAMA, M. Anti-MRSA activity of sophoraflavanone G and synergism with other antibacterial agents. **Lett Appl Microbiol**, Osaka Prefectural Institute of Public Health, Japan, v. 27, n.2, p. 98-100, 1998.

SANCHEZ-FORTUM, S.; SANZ, F.; SANTA-MARIA, A.; ROS, J. M.; DE VICENTE, M. L. ENCINAS, M. T.; VINAGRE, E.; BARAHANA, M.V. Acute sensitivity of three age classes of *Artemia salina* larvae to seven chlorinated solvents. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicolog**, v. 59, p. 445–454, 1997.

SANTOS, M. M. F. B.; STANGARLIN, J. R.; BECKER, A.; PASCHOLATI, S. F. Doenças da Alcachofra. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: doenças da plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2, cap.5, p.25-26.

SANTOS, A.A.; VIANA, F.M. **Mancha-aquosa do melão**. Fortaleza: Embrapa, 2000. 2p.

SARABIA, R.; DEL RAMO, J.; DIAZ-MAYANS, J.; TORREBLANCA, A. Comparing the acute response to cadmium toxicity of nauplii from different populations of *Artemia*. **Environ Toxicol Chem**, v. 21, p.437–444, 2001.

SARAIVA, A. M., **Estudo farmacognóstico e determinação da atividade biológica de *Caesalpinia pyramidalis* Tull. e *Schinopsis brasiliensis* Engl. frente a cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA Multirresistentes**. 2007. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

SARAIVA, A. M.; CASTRO, R. H. A.; CORDEIRO, R. P.; SOBRINHO, T. J. S. P.; CASTRO, V. T. N. A.; AMORIM, E. L. C.; XAVIER, H. S.; PISCIOTTANOL, M. N. S. *In vitro* evaluation of antioxidant, antimicrobial and toxicity properties of extracts of *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n.14, p. 1724-1731, October, 2011.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. **Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p.227-248.

SILVA, A.M.F.; MARIANO, R. L. R.; MICHEREFF, S. J.; SILVEIRA, E.B.; MEDEIROS, F. H. V. Levantamento da intensidade da podridão mole em alface e couve-chinesa em Pernambuco. **Revista Caatinga**, Mossoró, Brasil, v. 20, n.2, p. 84-93, 2007.

SILVA, C. G. V. **Bioatividade de extratos etanólicos de *croton* sobre *plutella xylostella* (L.) e ação fumigante e composição química de óleos essenciais de *croton grevioides***

(baill.) sobre *zabrotes subfasciatus* (boheman). 2007. 45 f. Dissertação ( Mestrado em Entomologia Agrícola) Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2007.

SILVA, D. M. M. H.; BASTOS, C. N. Atividade Antifúngica de Óleos Essenciais de Espécies de *Piper* Sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n.2, mar – abr, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Florianópolis: Editora UFSC, 2004.

SMITH, C. J. Accumulation of phytoalexins: defense mechanisms and stimulus response system. **The New Phytologist**, v. 132, p. 1-45. 1996.

STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas medicinais e o controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**. Brasília, v.2, n.11. p.16-21, 1999.

SUTHERLAND, I. W. Xanthan. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. *Xanthomonas*. London: Chapman & Hall, 1993. p. 363-388.

SWINGS, J. G.; VAUTERIN, L.; KERSTERS, K. The bacterium *Xanthomonas*. In: SWINGS, J.G., CIVEROLO, E. L. *Xanthomonas*. London: Chapman & Hall, 1993. p. 121-146.

TADA, M.; SEKI, H. Toxic diterpene from *Euphorbia trigona* (saiunkaku: an indoor foliage plant in Japan). **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 53, n. 2, p. 425-430. 1989.

TEGOS, G.; STERMITZ, F. R.; LOMOVSKAYA, O.; LEWIS, K. Multidrug drug inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, n.10, p. 3133-3141, 2002.

VAN DEENEN, N.; PRÜFER, D.; GRONOVER, C. S. A latex lectin from *Euphorbia trigona* is a potent inhibitor of fungal growth. **Biologia Plantarum**, v. 55, n.2, p. 335-339, 2011.

VATTEM, D. A.; SHETTY, K. Biological Functionality of ellagic acid: A review. **Journal of Food Biochemistry**, v. 29, p. 234-266, 2005.

VIGO, S. C.; MARINGONI, A.C.; CAMARA, R. DE C.; LIMA, G. P. P. Ação de tinturas e óleos essenciais de plantas medicinais sobre o crescimento bacteriano comum do feijoeiro e na produção de proteínas de indução de resistência. **Summa Phytopathol**, Botucatu, v. 35, n. 4, p. 293-304, 2009.

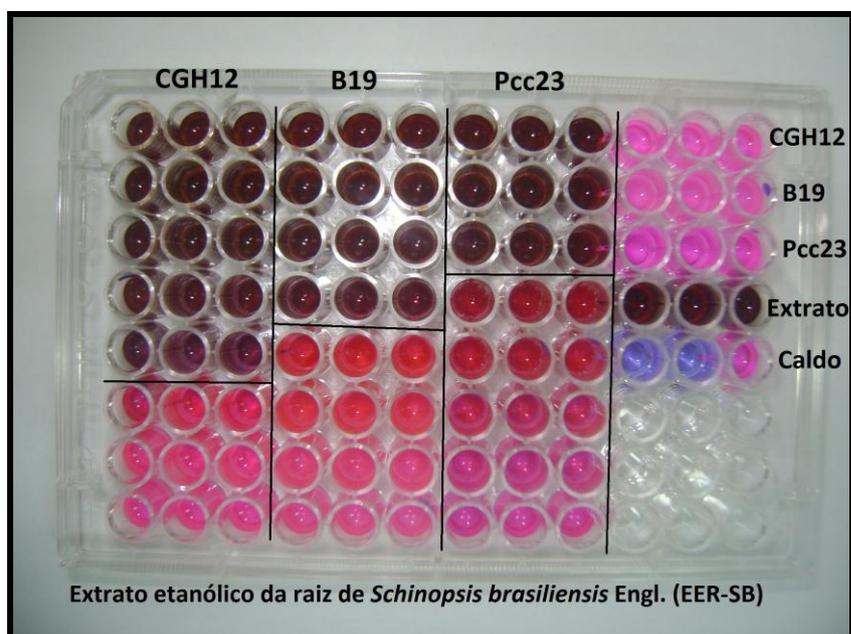
WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. **Induced resistance for plant defence – a sustainable approach to crop protection**. Oxford: Blackwell, 2007. 258p.

XU, J.; PAN, Z. C.; PRIOR, P.; XU, J. S.; ZHANG, Z.; ZHANG, H.; ZHANG, L. Q.; HE, L. Y.; FENG, J. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from China. **European Journal of Plant Pathology**, v.125, p.641-653, 2009.

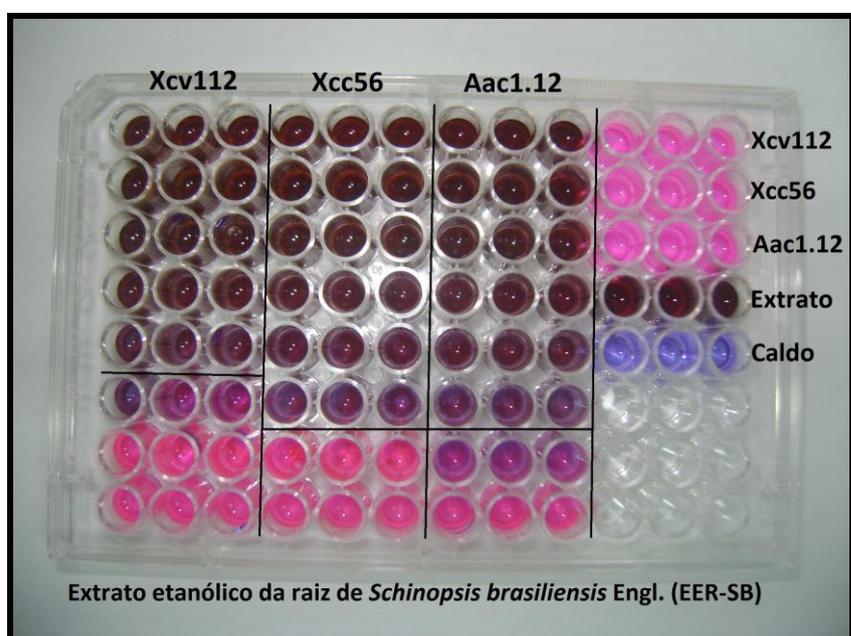
ZADOKS, J. C. The costs of change in plant protection. **Journal of Plant Protection**, v.9, p.151-159, 1992.

ZAIDI-YAHIAOUI, R.; ZAIDI, F.; BESSAI, A. A. Influence of gallic and tannic acids on enzymatic activity and growth of *Pectobacterium chrysanthemi* (*Dickeya chrysanthemi* bv. *chrysanthemi*). **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n.4, p. 482-486, 2008.

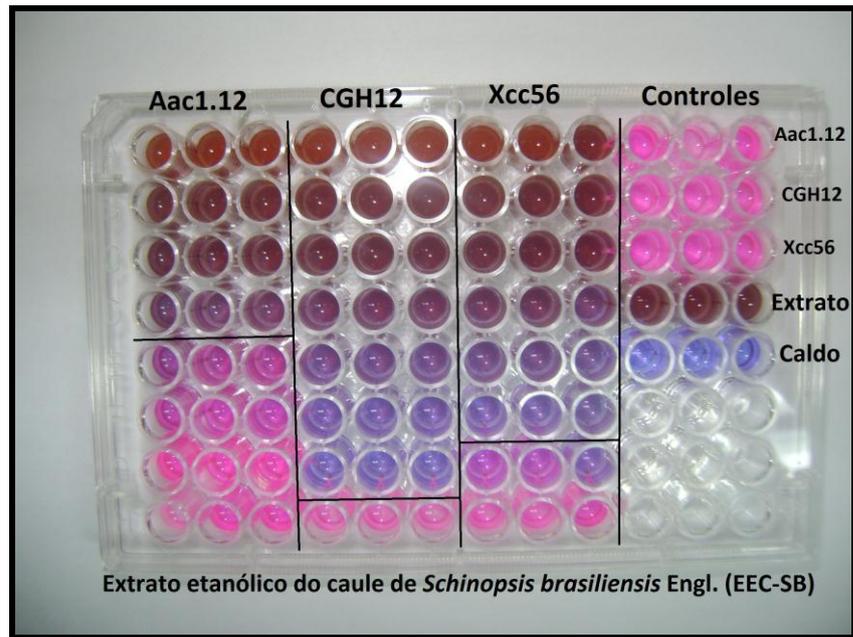
## 8. APÊNDICES



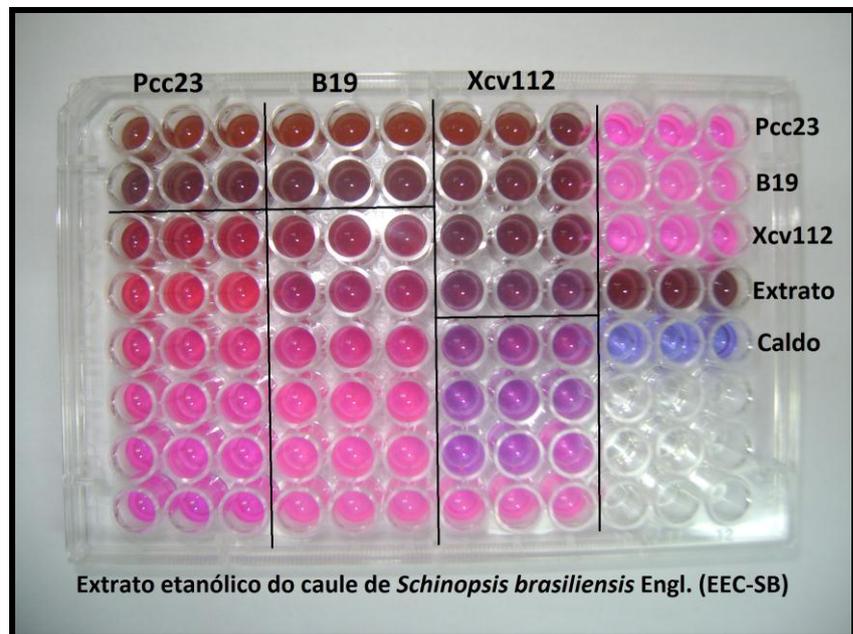
**Figura 20** - Microplaca com a técnica de microdiluição em caldo do extrato etanólico da raiz de *S. brasiliensis* contra os microrganismos: CGH12- *Ralstonia solanacearum* (Raça 1), B19- *Ralstonia solanacearum* (Raça 2), Pcc23- *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*.\*



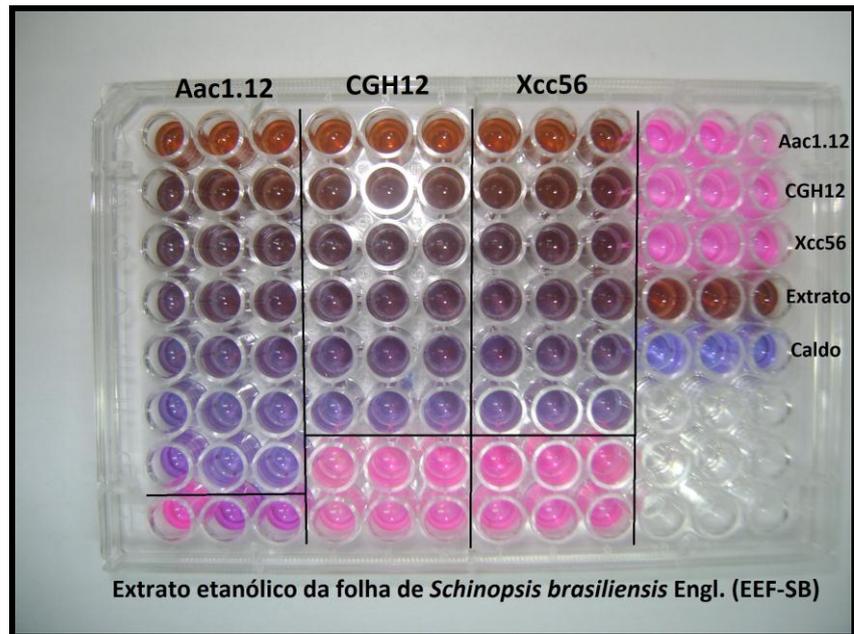
**Figura 21** - Microplaca com a técnica de microdiluição em caldo do extrato etanólico da raiz de *S. brasiliensis* contra os microrganismos: Xcv112- *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, Xcc56- *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, Aac1.12 - *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*.\*



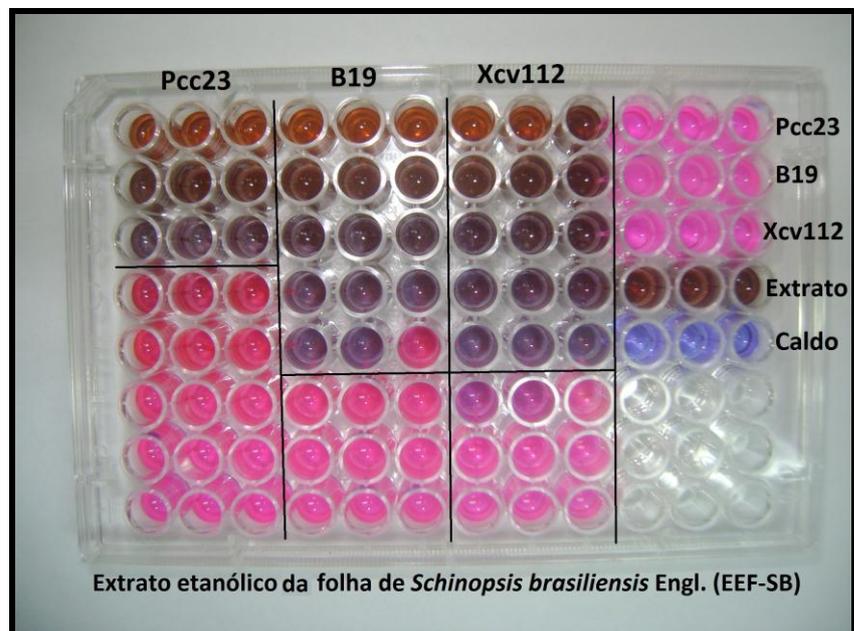
**Figura 22** - Microplaca com a técnica de microdiluição em caldo do extrato etanólico do caule de *S. brasiliensis* contra os microrganismos: Aac1.12 - *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, CGH12 - *Ralstonia solanacearum* (Raça 1), Xcc56- *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.\*



**Figura 23** - Microplaca com a técnica de microdiluição em caldo do extrato etanólico do caule de *S. brasiliensis* contra os microrganismos: Pcc23- *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, B19- *Ralstonia solanacearum* (Raça 2), Xcv112 - *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*.\*



**Figura 24** - Microplaca com a técnica de microdiluição em caldo do extrato etanólico da folha de *S. brasiliensis* contra os microrganismos: Aac1.12 - *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, CGH12 - *Ralstonia solanacearum* (Raça 1), Xcc56- *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. \*



**Figura 25** - Microplaca com a técnica de microdiluição em caldo do extrato etanólico da folha de *S. brasiliensis* contra os microrganismos: Pcc23- *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, B19- *Ralstonia solanacearum* (Raça 2), Xcv112 - *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. \*

\*Cor rosa indica presença de crescimento microbiano e azul ausência.