



# I WORKSHOP INTERNACIONAL POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ESPÉCIES VEGETAIS E DE MICROORGANISMOS

**13 a 15 de abril de 2015**

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Cruz das Almas - Ba

[www.ufrb.edu.br/workshopinternacional](http://www.ufrb.edu.br/workshopinternacional)

## REALIZAÇÃO



universidad  
de león



UEFS  
UNIVERSIDADE ESTADUAL  
DE FEIRA DE SANTANA

**ISBN: 978 85 61346 92 8**

# I WORKSHOP INTERNACIONAL: POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ESPÉCIES VEGETAIS E DE MICROORGANISMOS

## COMISSÕES

### **Coordenadores/Organizadores:**

**Projeto Nº 328/15 Aprovado Edital/CAPES/DPGU/2014**

Ana Cristina Fermino Soares/UFRB  
Franceli da Silva/UFRB  
Angélica Maria Lucchese /UEFS  
Lenaldo Muniz de Oliveira/UEFS  
Pedro Antonio Casquero Luelmo/Universidad de León

### **Comissão Científica**

Ana Cristina Fermino Soares/UFRB  
Angélica Maria Lucchese/UEFS  
Alicia Lorenzana/ULeón  
Cintia Armond/UFRB  
Franceli da Silva/UFRB  
Lenaldo Muniz de Oliveira/UEFS  
Paulo José Lima Juiz/UFRB  
Pedro Antonio Casquero Luelmo/ULeón  
Santiago Gutierrez/ULeón

### **Comissão Organizadora do Evento**

Ana Cristina Fermino Soares/UFRB  
Franceli da Silva/UFRB  
Fabiane Ribeiro Viana/UFRB  
Flávia Sabina da Silva Souza/UFRB  
Yumi de Oliveira Fujiki/UFRB  
Angélica Maria Lucchese/UEFS  
Lenaldo Muniz de Oliveira/UEFS  
Pedro Antonio Casquero Luelmo/Universidad de León

## SUMÁRIO

### CIÊNCIAS AGRÁRIAS

- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO METANÓLICO DE *Hyptis martiusii* FRENTE À BACTÉRIAS DE INTERESSE AGRÍCOLA \_\_\_\_\_ 6 a 13
- CARACTERIZAÇÃO DE FRUTOS DE CAMAPÚ EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO (*Physalis angulata* L.) \_\_\_\_\_ 14 a 18
- CONTROL BIOLÓGICO EN CONDICIONES DE LABORATORIO DE *Xylotrechus arvicola* (Coleoptera: Cerambycidae), INSECTO PLAGA EN EL CULTIVO DE LA VID (*Vitis vinifera*) \_\_\_\_\_ 19 a 29
- DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE LINHAGENS ELITES DE MAMONEIRA POR MEIO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES \_\_\_\_\_ 30 a 37
- DIVERSIDADE GENÉTICA DE *DIOSCOREA* SPP UTILIZANDO MARCADORES ISSR \_\_\_\_\_ 38 a 45
- EFECTOS DE *Trichoderma* spp. EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE HONGOS FITOPATÓGENOS DE ALUBIA (*Phaseolus vulgaris* L.) \_\_\_\_\_ 46 a 55
- FUNGOS E OOMICETO CAUSADORES DE DOENÇAS EM ORQUÍDEAS NO SUL DA BAHIA \_\_\_\_\_ 56 a 66
- ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia organoides* H.B.K NO CONTROLE DE *Aspergillus niger* \_\_\_\_\_ 67 a 77
- QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE CATEQUINA E EPICATEQUINA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA CASCA DA RAÍZ DA *Mimosa tenuiflora* (WILLD.) POIRET POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDOS DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS (CLAE-DAD) \_\_\_\_\_ 78 a 88
- TEOR DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia organoides* H.B.K. EM DIFERENTES TEMPOS DE EXTRAÇÃO \_\_\_\_\_ 89 a 98
- ASPECTOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS DO GÊNERO *Lippia* COM ÊNFASE NA ESPÉCIE *L. thymoides* MART. & SCHAUER \_\_\_\_\_ 99 a 106
- Atividade antifúngica de extrato hidroalcoólico de folhas de pimenta jamaica (*Pimenta dioica*), aroeira (*Schinus molle*) e goiaba (*Psidium guajava*) contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* \_\_\_\_\_ 107 a 116
- AVALIAÇÃO DE PREPARADO HOMEOPÁTICO NO CONTROLE DA TIRIRICA (*Cyperus rotundus* L.) \_\_\_\_\_ 117 a 123
- COMPARAÇÃO DE 18 LINHAGENS ELITES DE MAMONEIRA POR MARCADOR MOLECULAR ISSR PARA IDENTIFICAÇÃO DE DIVERGENTES E COMO FONTES DE HIBRIDAÇÕES \_\_\_\_\_ 124 a 133
- CONTROLE DA PODRIDÃO VERMELHA E COLONIZAÇÃO DE PLANTAS DE SISAL POR *Penicillium citrinum* \_\_\_\_\_ 134 a 143
- Controle do *Aspergillus niger* e da podridão vermelha do sisal com extrato aquoso de pau de rato (*Caesalpinia pyramidalis*) \_\_\_\_\_ 144 a 154

- CONTROLE DO MAL-DO-PANAMÁ EM BANANEIRA COM *Trichoderma* spp. E DIFERENTES PERÍODOS DE INOCULAÇÃO\_\_\_\_\_155 a 164
- ENRAIZAMENTO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth. (LAMIACEAE)\_\_\_\_\_165 a 174
- EXTRATO AQUOSO DE SISAL NO CONTROLE DE *Meloidogyne javanica* NO TOMATEIRO\_\_\_\_\_175 a 184
- FUNGOS ENDOFÍTICOS DE RAÍZES DE SISAL NO MUNICÍPIO DE CONCEIÇÃO DO COITÉ, BAHIA, BRASIL\_\_\_\_\_185 a 195
- IMPACTOS DO USO DA BIOTECNOLOGIA NA AGRICULTURA\_\_\_\_\_196 a 201
- INFECTIVIDADE EM BANANEIRA DE *Radopholus similis* SUBMETIDO AO RESÍDUO LÍQUIDO DO DESFIBRAMENTO DE FOLHAS DE SISAL\_\_\_\_\_202 a 211
- O USO DO SISAL PARA PRODUÇÃO DE ETANOL NO NORDESTE BRASILEIRO\_\_212 a 217
- POTENCIAL E UTILIZAÇÃO DE PLANTAS COM ATIVIDADE INSETICIDA\_\_\_\_\_218 a 223
- POTENCIALIDADE DE *Trichoderma* spp. EM PROMOVER O CRESCIMENTO DE TOMATEIRO E CONTROLAR *Meloidogyne incognita*\_\_\_\_\_224 a 232
- PRODUÇÃO DE BIOMASSA E ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia thymoides* Mart. & Schauer EM CONDIÇÕES DE CULTIVO NO SEMIÁRIDO BAIANO\_\_\_\_\_233 a 241
- Prospecting plant growth promoting diazotrophic and drought tolerant rhizobacteria isolated from the semi-arid region of Bahia, Brazil\_\_\_\_\_242 a 251
- Qualidade microbiológica do coentro (*Coriandrum sativum* L.) proveniente de sistemas de cultivo convencional\_\_\_\_\_252 a 258
- RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL E TOLERANTES A SECA ISOLADAS DE ESPÉCIES DE CACTACEAS\_\_\_\_\_259 a 268
- USO DA ARENA DE QUATRO ESCOLHAS NA ATRATIVIDADE DE *Acanthoscelides obtectus* (SAY) (COLEOPTERA: BRUCHIDAE) EM FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris*)\_\_\_\_\_269 a 277
- USO DE RESÍDUO DE SISAL NO CONTROLE DE *Fusarium oxysporum* F. SP. *cupense* EM BANANEIRA\_\_\_\_\_278 a 288

## CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA DOS EXTRATOS DE *Lippia thymoides* NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE TOMATE\_\_\_\_\_290 a 299
- COLETA DE GERMOPLASMA DA ESPÉCIE *Lippia origanoides* H.B.K.\_\_\_\_\_300 a 307
- DESCOLORAÇÃO DO CORANTE ALARANJADO G POR LEVEDURAS ISOLADAS DE VEGETAÇÃO SOBRE ROCHA DO RECÔNCAVO BAIANO\_\_\_\_\_308 a 315
- DESENHO DE PRIMERS SSRs PARA MAMONEIRA\_\_\_\_\_316 a 325



- PRODUÇÃO DE CELULASE EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO RESÍDUO LIGNOCELULÓSICO DE SISAL (*Agave sisalana*) \_\_\_\_\_ 326 a 335
- TOLERÂNCIA À SALINIDADE EM PLANTAS DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.) POR BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS \_\_\_\_\_ 336 a 346
- XYLANASE PRODUCTION USING PEACH PALM (*Bactris gaspaes* Kunt.) WASTE ON SOLID STATE FERMENTATION AND SUBMERGED FERMENTATION \_\_\_\_\_ 347 a 356

## MULTIDISCIPLINAR

- ANÁLISE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM EXTRATOS METANÓLICOS DE FOLHAS DE *Physalis angulata* SUBMETIDAS A TRATAMENTO COM NIM \_\_\_\_\_ 358 a 366
- ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DAS FRAÇÕES CLOROFÓRMICA E HIDROMETANÓLICA DO EXTRATO DA RAIZ DE *Cereus jamacaru* DC. (Cactaceae) \_\_\_\_\_ 367 a 377
- ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Polygala boliviensis* \_\_\_\_\_ 378 a 387
- CARACTERIZAÇÃO EM PROGÊNIES MEIO-IRMÃO DE *Jatropha curcas* L. QUANTO AO CARÁTER TEOR DE ÓLEO NA SEMENTE E MARCADORES RAPD \_\_\_\_\_ 388 a 397
- CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE EXTRATOS DE *Asemeia ovata* (POLYGALACEAE) \_\_\_\_\_ 398 a 406
- DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE (+)-CATEQUINA EM EXTRATOS DE *Vitis* SPP. POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDOS DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS (CLAE-DAD) \_\_\_\_\_ 407 a 417
- EFEITO DO OSMOCONDICIONAMENTO NAS SEMENTES E DO PERÍODO DE COLHEITA DE *Physalis angulata* L. NO TEOR DE FISALINAS EM EXTRATO ETANÓLICO DAS PARTES AÉREAS \_\_\_\_\_ 418 a 427
- ESTUDO FITOQUÍMICO E TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS EM ACESSOS DE ABACAXIZEIROS SILVESTRES \_\_\_\_\_ 428 a 438
- IDENTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES COM POTENCIAL INIBIDOR PARA A ENOIL-ACP-REDUTASE DE *Plasmodium falciparum* POR TRIAGEM VIRTUAL \_\_\_\_\_ 439 a 449
- ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro* DE EXTRATOS DE *Schinopsis brasiliensis* CONTRA MICRORGANISMOS FITOPATOGÊNICOS DE INTERESSE NA AGRICULTURA \_\_\_\_\_ 450 a 460
- POTENCIAL DE *Martianthus leucocephalus* (MART. EX BENTH.) J.F.B. PARA A FITORREMEDIAÇÃO DE COBRE E DE ZINCO \_\_\_\_\_ 461 a 466
- VARIABILIDAD GENÉTICA DE LAS POBLACIONES CANTÁBRICAS DE *Gentiana lutea* L. VAR. *Aurantiaca* (M. LAINZ) M. LAINZ. UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES ISSR \_\_\_\_\_ 467 a 477

# Ciências Agrárias

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO METANÓLICO DE *Hyptis martiusii* FRENTE À BACTÉRIAS DE INTERESSE AGRÍCOLA**

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO METANÓLICO DE *Hyptis martiusii* FRENTE À BACTÉRIAS DE INTERESSE AGRÍCOLA

Projeto de mestrado realizado no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS

Uiliane Soares dos Santos<sup>1</sup>, Meridiana Araújo Gonçalves Lima<sup>2</sup>, Catarina Oliveira Dourado<sup>3</sup>, Maziele Dias de Souza<sup>4</sup>, Evelyn Sophia Silva Costa<sup>5</sup>, Lenaldo Muniz de Oliveira<sup>6</sup>, Ana Valéria Vieira de Souza<sup>7</sup>, Ana Rosa Peixoto<sup>8</sup>, Angélica Maria Lucchese<sup>9</sup>

- 1- Mestranda em Recursos Genéticos Vegetais - Departamento de Biologia, UEFS. uilianesoares@hotmail.com
- 2- Doutoranda em Fitopatologia - Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE. meridiana.araujo@gmail.com
- 3- Graduanda em Engenharia Agrônômica - Universidade da Bahia, UNEB. cat.dourado@gmail.com
- 4- Graduanda em Ciências Biológicas - Universidade de Pernambuco, UPE. maziele\_@hotmail.com
- 5- Graduanda em Ciências Biológicas - Universidade de Pernambuco, UPE. evelyn.sophia@hotmail.com
- 6- Prof. Dr./Orientador Departamento de agronomia, UEFS. lenaldo.uefs@gmail.com.
- 7- Pesquisadora da Embrapa Semiárido. ana.souza@embrapa.br.
- 8- Profa. Dra. Universidade do Estado da Bahia, UNEB. anarosapeixoto@gmail.com
- 9- Profa. Dra. Departamento de Ciências Exatas , UEFS. angelica.lucchese@hotmail.com

### Introdução:

A agricultura brasileira ocupa uma posição de destaque no abastecimento de produtos de origem vegetal (CASTRO *et al.*, 2006). Dados apontam que entre os anos de 1994 a 2011, a cadeia de valor agropecuária (insumos, agropecuária, agroindústria e distribuição) respondeu, em média, por cerca de 24% do PIB do brasileiro (LOPES *et al.*, 2014), esse setor é de extrema importância para a economia do país, visto que o Brasil é um dos líderes mundiais na produção e exportação de vários produtos agropecuários (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2015).

Porém problemas fitossanitários podem comprometer a agricultura, entre os quais destacam-se as doenças causadas por vírus, fungos e bactérias que causam prejuízos imensuráveis para os agricultores (LIMA; MOREIRA, 2002). A bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, por exemplo, causadora do cancro bacteriano da videira, é responsável por atacar plantas de *Vitis vinifera* da variedade Red Globe, como também dos cultivares, Perlette, Itália, Festival, Brasil, Ribier, Piratininga, Patrícia, Catalunha e Benitaka (MALAVOLTA JÚNIOR *et al.*, 2003). O diagnóstico do cancro bacteriano da videira é feito com base nos sintomas observados nas folhas, cachos e caules (LIMA *et al.*, 1999; MALAVOLTA JÚNIOR *et al.*, 1999). Os sintomas manifestam-se, inicialmente, nas folhas, como pontos necróticos e pode-se evoluir causando crestamento e morte de extensas áreas do limbo foliar. Nas nervuras e pecíolos das folhas, ramos e ráquis dos frutos, formam-se manchas escuras alongadas, que evoluem para fissuras longitudinais de coloração negra, conhecidas como cancrios. Devido a esses sintomas essa bactéria fitopatogênica causa perdas significativas de parrerais de uva, comprometendo a

viticultura brasileira (NAYUDU, 1972; NASCIMENTO *et al.*, 2000; LOPES, 2006; LIMA *et al.*, 2009).

Outra bactéria fitopatogênica de elevado interesse agrícola mundial é a *Ralstonia solanacearum*, causadora da murcha bacteriana, é considerada uma espécie heterogênia ou um complexo de espécie, devido a grande variabilidade em relação a gama de hospedeiro, distribuição geográfica, virulência, transmissibilidade por insetos, propriedades fisiológicas e adaptação a diferentes temperaturas. Atualmente a bactéria é classificada em quatro níveis taxonômicos: espécie, filotipo, seque e clone. Esta caracteriza-se por ser uma bactéria sistêmica e capaz de causar danos em 54 famílias botânicas, atingindo cerca de 450 espécies, entre as quais banana, amendoim, gengibre, mamão, batata, berinjela, pimentão e tomate (XU *et al.*, 2009). *R. solanacearum* pode ser disseminada por meio de material de plantio infectado, ferimentos e contatos entre as raízes das plantas e insetos vetores (CORDEIRO *et al.*, 2005), através da invasão dos vasos xilemáticos, espalha-se rapidamente para as partes aéreas da planta hospedeira via sistema vascular. A disfunção vascular proveniente da colonização extensiva, causa murcha e conseqüentemente morte do vegetal (TANS-KERSTER *et al.*, 2004).

Após o surgimento de uma fitobacteriose no campo é impossível curar a planta infectada, não existindo até o momento medidas adequadas de controle curativo para o cancro bacteriano e a murcha bacteriana. No Brasil não há antibióticos registrados para o controle químico de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* e *R. solanacearum*, fazendo-se necessário o estudo de fontes alternativas para o manejo dessas doenças. Sistemas de cultivo mais sustentáveis e menos dependentes do uso de agroquímicos têm sido desenvolvidos objetivando a minimização dos impactos no ambiente e ao homem por meio da utilização de métodos alternativos no combate a patógenos causadores de doenças em plantas (BRUM, 2012). Dentre esses métodos alternativos, pode-se destacar o uso de subprodutos de plantas medicinais e aromáticas, essas são detentoras de substâncias bioativas com elevado potencial terapêutico de extrema importância para a produção de medicamentos e biopesticidas no controle de patógenos causadores de doenças (VIZZOTO, 2010; SANTOS *et al.*, 2007).

Nesse enfoque os extratos vegetais surgem como potenciais produtos alternativos que podem ser incorporados ao manejo de fitopatógenos, uma vez que sua ação pode ser tóxica direta, ou indireta por meio da ativação de mecanismos de defesa nas culturas tratadas (VENTUROSOSO, 2011). Os extratos vegetais são, normalmente, misturas complexas constituídas por diversas classes de produtos naturais e diferentes grupos funcionais, são compostos extremamente importantes nos estudos farmacológicos, químicos e agrônômicos (BARRETO JUNIOR *et al.*, 2005). Estudos relatam o seu elevado potencial antimicrobiano frente a diversos fitopatógenos (VIGO-SCHULTZ *et al.*, 2005; KANE *et al.*, 2002; TYLKOWSKA; DORNA, 2001).

O gênero *Hyptis* destaca-se por apresentar atividades biológicas importantes, como anestésico, antiespasmódico, anti-inflamatório (BOTREL, 2009), antifúngica (MARTINS *et al.*, 2011) e antibacteriana (LUCCHESI *et al.*, 2005). Espécies do gênero *Hyptis* são amplamente utilizadas na medicina popular, por possuírem características terapêuticas importantes, há relatos de seu uso para tratamentos de distúrbios gastrointestinal, antisséptico para a pele, infecções dos olhos, no tratamento de reumatismo e dores musculares (FRAGOSO-SERRANO *et al.*, 2005). Dentre as espécies com atividades biológicas pertencentes a esse gênero pode-se citar a espécie *Hyptis martiusii* Benth.,

conhecida popularmente como Cidreira-do-campo, esta apresenta atividade citotóxica (ARAÚJO *et al.*, 2006), inseticida contra o mosquito *Culex quinquefasciatus*, agente transmissor da filariose (COSTA *et al.*, 2005), como também potencial antimicrobiano (COUTINHO *et al.*, 2008).

Diante do exposto o presente trabalho teve como objetivo avaliar a ação antimicrobiana do extrato metanólico da espécie *Hyptis martiusii* Benth. sobre as bactérias fitopatogênicas *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* e *Ralstonia solanacearum*.

### **Métodos:**

As folhas de *Hyptis martiusii* foram coletadas no mês de Junho de 2014, na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Bahia, Brasil, localizada a 12°16'00" de latitude sul e 38°58'00" de longitude oeste. As folhas foram secas em temperatura ambiente durante 7 dias. Para a obtenção do extrato metanólico bruto, após secagem, as folhas foram pulverizadas em moinho de facas. O material pulverizado foi submetido à extração, três vezes consecutivas, por maceração com metanol em recipientes de vidro. Os extratos brutos foram concentrados em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, em temperaturas de 40-42°C.

Os ensaios antimicrobianos foram realizados no Laboratório de Fitopatologia da UNEB, Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais (DTCS), Campus III, Juazeiro, BA.

O isolado *Ralstonia solanacearum*, caracterizado molecularmente como Filotipo II, foi obtido de uma área de produção de tomateiro, no projeto de irrigação Maria Tereza em Petrolina-PE. O isolado foi previamente selecionado de quatro isolados testados através de plantas de tomateiro da variedade Santa Clara com 21 dias. E o isolado de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, foi proveniente da coleção de culturas bacterianas do Laboratório de Fitopatologia da UNEB, que se encontrava preservado em água destilada esterilizada (ADE) à temperatura de 25°C.

Para a obtenção dos inóculos bacterianos, a bactéria *R. solanacearum* foi cultivada em meio TZC modificado (tetracloroeto de trifetil tetrazólio) por 48 horas à 28°C, em que as colônias características da bactéria (brancas mucoides com centro róseo) foram transferidas para meio NYDA (ágar nutritivo-dextrose-extrato de levedura). E a bactéria *X. campestris* pv. *viticola* foi cultivada em meio NYDA solidificado. As suspensões bacterianas das bactérias foram feitas com adição de água destilada e esterilizada (ADE) e a concentração foi ajustada em fotocolorímetro para  $5 \times 10^{-8}$  UFC/ ml.

Para a realização dos ensaios da atividade antimicrobiana dos extratos, a metodologia empregada foi difusão em ágar pelo método de discos, baseado na técnica descrita por Bauer *et al.* (1966) com adaptações. Foram utilizados discos de papel filtro com 5,5 mm de diâmetro. O inóculo foi semeado, com auxílio de uma alça de Drigalski, em toda a superfície de meio NYDA em placa de Petri. Em seguida foram adicionados discos de papel filtro impregnados com 10 mL do extrato da planta testada. O extrato metanólico foi previamente dissolvidos em ADE, utilizando Tween 20 como emulsificante, em diferentes concentrações 125, 250, 500 e 1000 µg/mL. Como controles negativos foram utilizados discos embebidos apenas com Tween e com ADE e como controle positivo discos com oxiclureto de cobre (antibiótico) na concentração de 50 mg/mL. As placas foram incubadas a 30 °C, por 48 horas para *X. campestris* e 72 horas para *R. solanacearum*, em

estufa bacteriológica. As avaliações foram realizadas medindo-se o diâmetro do halo de inibição (mm) formado ao redor de cada disco com o auxílio de um paquímetro, o diâmetro do disco (5,5 mm) foi descontado. Os testes foram realizados em duplicata.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com tratamentos distribuídos em esquema fatorial 2 (bactérias) x 4 (concentrações), com 5 repetições e 2 discos por repetição. Os dados obtidos foram submetidos a verificação da normalidade dos resíduos e da homogeneidade das variâncias para constatar a necessidade da transformação. Em seguida foram submetidos à análise de variância as suas médias comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## Resultados e discussão:

De acordo com a tabela 1, não houve diferença estatística significativa entre as concentrações testadas do extrato de *H. martiusii* para a bactéria *Ralstonia solanacearum*. Entretanto todas as concentrações formaram halo de inibição frente à bactéria, mesmo quando submetida a menor concentração testada (125 µg/mL), porém para a bactéria *Xanthomonas campestris* essa concentração não foi capaz de formar halo de inibição.

**Tabela 1.** Médias do diâmetro do halo de inibição (mm) das bactérias *Xanthomonas campestris* e *Ralstonia solanacearum*, submetidas a diferentes concentrações do extrato metanólico de *H. martiusii*

Bactérias	Controle			Concentrações			
	ADE	Tween	Oxi. de cobre	125	250	500	1000
Xcv	0*	0°	0''	0 Bc	1,6 Abc *o''	3 Ab *o''	5 Aa *o''
Rs	0*	0°	3,37''	1,4 Aa *o''	2,6 Aa *o	3 Aa *o	2,6 Ba *o

CV: 39,5 F: 3,514 W: 0,921

Médias seguidas da mesma letra maiúscula e minúscula na linha, não diferiram entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. W; F: estatísticas dos testes de Shapiro Wilk e Levene, respectivamente, indicam resíduo com distribuição normal e variância a 0,01 de significância. Médias seguidas por \* ° '' diferem dos controles ADE, Tween, Oxi. de cobre, respectivamente pelo teste de Dunnet a 5 % de probabilidade.

Xcv: *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*; Rs: *Ralstonia solanacearum*; ADE: Água destilada esterilizada; Tween: Emulsificante; Oxi. de cobre: Oxidocloreto de cobre (antibiótico).

O extrato de *H. martiusii* quando testado com *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* apresentou diferença estatística significativa entre as concentrações testadas, em que, na menor concentração testada não houve formação de halo e quando submetida a concentração mais elevada (1000 µg/mL) houve a formação do maior halo de inibição (5mm).

Esses resultados são similares aos encontrados por Guimarães (2013), que estudando os extratos etanólicos da raiz, caule e folha de baraúna concluiu que os extratos apresentaram atividade antimicrobiana frente aos fitopatógenos *Xanthomonas campestris*



pv. *campestris*, *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* e *Ralstonia solanacearum* (Raças 1 e 2).

Oliveira *et al.* (2010), trabalhando com óleo, extratos vegetais e sais sobre bactérias fitopatogênicas, obtiveram a inibição do crescimento de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Doidge e *X. campestris* pv. *campestris* Pammel com extratos de hortelã. O crescimento dessas bactérias, e de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Jones, também foi inibido com extratos de alho.

A ação da atividade antimicrobiana do extrato metanólico de *H. martiusii* frente à *Xanthomonas campestris* mostrou-se superior quando comparado com o antibiótico oxiclreto de cobre. No entanto para a bactéria *R. solanacearum* o oxiclreto de cobre apresentou inibição do crescimento da bactéria, demonstrado pela média do halo (3,37mm) que apresentou diferença estatística significativa apenas para a menor concentração testada (125 µg/mL). É válido ressaltar que produtos a base de cobre têm sido utilizados pelos produtores de uva no Submédio do Vale do São Francisco no controle do cancro bacteriano, visto que, no Brasil ainda não há produtos registrados junto ao Ministério da Agricultura e do Abastecimento para o controle desta doença (LIMA, 2001).

Extratos metanólicos e etanólicos de *Emblica officinalis*, *Acacia nilotica*, *Carum copticum*, *Pedaliium Murex*, *Hyptis suaveolens*, *Millingtonia hortensis* e *Eupatorium odoratum* apresentaram atividade inibitória significativa contra as bactérias fitopatogênicas de interesse agrícola *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, e *Erwinia carotovora*. Quando comparados com o antibiótico testado, os extratos que mostraram maior atividade foram os metanólicos de *Emblica officinalis*, *Acacia nilotica* e *Carum copticum* com resultados altamente significativos (KAVITHA; SATISH, 2011).

### **Conclusão:**

O extrato metanólico das folhas de *Hyptis martiusii* apresenta atividade antibacteriana *in vitro* para as bactérias *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* e *Ralstonia solanacearum*. Porém estudos mais elaborados são necessários, a fim de encontrar a concentração inibitória mínima do extrato estudado, assim como a realização de testes *in vivo*.

**Palavras-chave:** Extratos vegetais. Cidreira-do-campo. Biopesticidas. Fitopatógenos.

**Agência Financiadora:** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

### **Referências:**

- ARAÚJO, E.C.; LIMA, M. A.; MONTENEGRO, R. C.; NOGUEIRA, M.; COSTALOTUFO, L. V.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R. Cytotoxic abietane diterpenes from *Hyptis martiusii* Benth. **Z Naturforsch C**, v. 61, p. 177-183, 2006.
- BARRETO JUNIOR, A. G. *et al.* Cromatografia de troca-iônica aplicada ao isolamento da fração ácida do óleo de copaíba (*Copaifera multijuga*) e da sacaca (*Croton cajucara*). **Revista Química Nova**. v. 28, n. 4, p. 719-722. 2005.



BAUER, A. W.; KIRBY, E. M. Antibiotic Susceptibility Testing by Standardized Single Disk Method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.

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

BRUM, R. B. C. S. Efeito de óleos essenciais no controle de fungos fitopatogênicos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, Tocantins, 2012.

CASTRO, D. P.; CARDOSO, M. G.; MORAES, J. C.; SANTOS, N. M.; BALIZA, D.P. Não preferência de *Spodoptera frugiperda* (Lepdoptera: Noctuidae) por óleos essenciais de *Achillea millefolium*, e *Thymus vulgaris* l. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, p. 27-32, 2006.

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 das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, cap.15, p. 99 -117. 2005.

LOPES, M. A.; MARTIN NETO, L.; CASTIGLIONI, V. B. R.; STUMPF JÚNIOR, W. **Visão 2014-2034: o futuro do desenvolvimento tecnológico da agricultura brasileira: síntese /** Embrapa. – Brasília, DF : Embrapa, 2014. 53 p.

COSTA, J.G.M. *et al.* Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzygium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Rev. bras. farmacogn.**, v. 15, n. 4, p. 304-309, 2005.

COUTINHO, H. D. M. et al. In vitro anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA strains. **Rev. bras. farmacogn.**, v. 18, p. 670-675, 2008.

FRAGOSO-SERRANO, M.; GIBBONS, S.; PEREDA-MIRANDA, R. Antistaphylococcal and cytotoxic compounds from *Hyptis pectinata*. **Planta Médica**, v. 71, p. 278-280, 2005.

GUIMARÃES, P. G. Atividade antimicrobiana in vitro de extratos de *Schinopsis brasiliensis* E *Euphorbia trigona* contra microrganismos fitopatogênicos de interesse na agricultura. Dissertação de mestrado. UESB, Itapetinga, Bahia, 2013.

KANE, P. V.; KSHISARGAR, C. R.; JADHAV, A. C.; PAWAR, N. B. In vitro evaluation of some plant extracts against *Rhizoctonia solani* from chickpea. **Journal of Maharashtra Agricultural Universities**, Mumbai, v.27, p.101-102, 2002.

KAVITHA, H.U.; SATISH, S. Eco- friendly management of plant pathogens by some medicinal plant extracts . **Journal of Agricultural Technology**, v, 7, p. 449-461, 2011.

LIMA, M. F.; FERREIRA, M. A. S. V.; DIANESE, J. C. Situação do cancro bacteriano da videira causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* no Submédio Vale São Francisco. **Fitopatologia Brasileira**. v.24, p.250. 1999.

LIMA, M.F.; LOPES, D.B.; TAVARES, S.C.C.H.; TESSMANN, D.J.; MELO, N.F. Doenças e alternativas de controle. In: SOARES, J.M.; LEÃO, P.C.S. (Eds.). **A vitivinicultura no Semiárido brasileiro**. Petrolina, PE: Embrapa Semiárido; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, Cap.13, p.543-596, 2009.

LIMA, M. F.; MOREIRA, W. A. Doenças causadas por bactérias. In: LIMA, M.F.; MOREIRA, W.A. (Eds.). **Uva de mesa: fitossanidade**. Petrolina, PE: Embrapa Semi-Árido; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p.27-34, 2002.

LOPES, D. B. Manejo sustentável de fitobacteriose: cancro bacteriano da videira (*Xanthomonas campestris* pv. *viticola*). In: XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2006, Salvador. Anais Fitopatologia Brasileira. Brasília, SBF, v.31, p.83-85. 2006.

LUCCHESI, A. M. ; OLIVEIRA, L. S. ; RODRIGUES, O. S. ; MOREIRA, J. S. ; ZAIM, C. Y. H. ; ZAIM, M. H. ; QUEIROZ, L. P. ; GIULIETTI, A. M. ; UETANABARO, A. P. T. ; CONCEICAO, T. A.. Óleos essenciais do gênero *Hyptis* da região do semi-árido da Bahia.

In: III Simpósio Brasileiro de Óleos Essencias, 2005, Campinas. Livro de Resumos do III Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais. Campinas: Instituto Agrômico de Campinas, p. 118, 2005.

MALAVOLTA JÚNIOR, V.A.; ALMEIDA, I. M. G.; SUGIMORI, M. H.; RIBEIRO, I. J. A.; RODRIGUES NETO, J.; PIRES, E. J. P. NOGUEIRA, E. M. C. Ocorrência de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em videira no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, SP, v.25, p.262-264, 1999.

MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; SUGIMORI, M. H.; ALMEIDA, J. M. G.; RIBEIRO, I. J. A. Resistência de Variedade de Videira a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.70, n.3, p. 373-376, 2003.

MARTINS, S. A. G.; Oliveira, R. A.; BAIÁ, A. D. B.; SILVA, I. L. S. S. Utilização de extrato vegetal aquoso *in vitro* de salva do marajó (*Hyptis crenata*) em sementes de pepino (*Cucumis sativus* L.). Anais do IX Seminário Anual de Iniciação Científica, 2011.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Exportação**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/exportacao>>. Acesso em 17 de março em 2015.

NAYUDU, M. V. *Pseudomonas viticola* sp. nov., incitant of a new bacterial disease of grape. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v. 73, p. 183-186, 1972.

NASCIMENTO, A. R. P.; MASHIMA, C. H.; LIMA, M. F. **Cancro bacteriano**: nova doença da videira no Submédio São Francisco. Petrolina: Embrapa Semi-árido, 2000. 22 p.

OLIVEIRA, W. J. SANTANA, W.S.; FÉLIX, K. C. S.; SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R. Ação de óleo e extratos vegetais e sais sobre bactérias fitopatogênicas importantes em Pernambuco. In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – JEPEX. UFRPE: Recife, 2010. Disponível em: <<http://www.sigeventos.com.br/jepex/inscricao/resumos/0001/R0353-1.PDF>>. Acesso em: 18 mar. 2015.

SANTOS, F. S.; SOUZA, P. E.; RESENDE, M. L.V.; POZZA, E. A.; MIRANDA, J. C.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; MANERBA, F. C. Efeito de Extratos Vegetais no Progresso de Doenças Foliares do Cafeeiro Orgânico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 59-63, 2007.

TANS-KERSTER, J.; BROWN, D.; ALLEN, C. Swimming motility, a virulence trait of *Ralstonia solanacearum*, is regulated by FlhDc and the plant host environment. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 17, p. 686-695, 2004.

TYLKOWSKA, K.; DORNA, H. Effects of cinnamom, garlic, greater celandine, ginger and chosen fungicides on the growther of pathogenic fungi isolated from onin, cabbage and carrot seeds. **Phytopathologia Polonica**, Skierniewice, v. 21, p. 25-34, 2001.

VENTUROSO, L. R., BACCHI, L.M.A., GAVASSONI, W.L., CONUS, L.A., PONTIM, B.C.A., SOUZA, F.R. Inibição do crescimento *in vitro* de fitopatógenos sob diferentes concentrações de extratos de plantas medicinais. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.78, n.1, p.89-95, 2011.

VIGO-SCHULTZ, S. C.; MARINGONI, A. C.; DEZORDI, C. Atividade de extratos alcoólicos de plantas medicinais *in vitro* sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, p. 007, 2005.

VIZZOTO, M.; KROLOW, A. C., WEBER, G. E. B. **Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. 16 p.

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.

**CARACTERIZAÇÃO DE FRUTOS DE CAMAPÚ EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO (*Physalis angulata* L.)**

## CARACTERIZAÇÃO DE FRUTOS DE CAMAPÚ EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO (*Physalis angulata* L.)

Romeu da Silva Leite<sup>1</sup>; Tamara Torres Tanan<sup>2</sup>; Marilza Neves do Nascimento<sup>3</sup>  
Lenaldo Muniz de Oliveira<sup>4</sup>; Adriana Rodrigues Passos<sup>5</sup>

1 Aluno do Curso de Graduação em Agronomia, bolsista PIBIC/CNPq, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), email: leiteromeu@hotmail.com

2 Aluna do Curso de Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais, UEFS, email: tamara.tanan@yahoo.com.br

3 Professora Doutora do Departamento de Ciências Biológicas, UEFS, email: marilzaagro@hotmail.com

4 Professor Doutor do Departamento de Ciências Biológicas, UEFS, email: lenaldo.uefs@gmail.com

5 Professora Doutora do Departamento de Ciências Biológicas, UEFS, email: adrianarpassos@yahoo.com.br

### Introdução

A espécie *Physalis angulata* apresenta frutos com sabor adocicado e levemente ácido, com alto teor de vitaminas A, C, fósforo e ferro, flavonóides e fitoesteróides, nutrientes essenciais e de micronutrientes como minerais e fibras. Além do elevado valor nutracêutico, a facilidade de cultivo e elevado valor de mercado dos frutos são atrativos para a incorporação dessa espécie pelos pequenos produtores (HARBONE & WILLIAMS, 2000; VELASQUEZ et al., 2007).

Para se obter sucesso com a introdução de um cultivo, é necessário assegurar a qualidade dos frutos, que pode ser compreendida pela avaliação de diferentes características individuais internas (aroma, pH, teor de sólidos solúveis, açúcares, proteínas e outros nutrientes) e externas (tamanho, formato, cor, etc.) dos mesmos (BERTONCELLI et al., 2012). Várias alterações ocorrem ao longo da maturação do fruto e influenciam na qualidade dos mesmos. Entre as transformações mais importantes incluem-se as sofridas pelos carboidratos que tem um papel crítico na vida útil da fruta e no desenvolvimento de qualidades como textura e adoçamento (COELHO, 1994; CANTILLANO, 2005).

Os frutos das espécies nativas além de oferecer um elevado valor nutricional, podem possuir alto potencial biotecnológico, ainda pouco explorado comercialmente. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar as características físicas e bioquímicas dos frutos de *P. angulata* em três níveis de maturação.

### Metodologia

O experimento foi realizado nos meses de abril a julho de 2013, na Unidade Experimental Horto Florestal (UNEHF), pertencente à Universidade Estadual de Feira de Santana, localizada no município de Feira de Santana - BA.

Os frutos de *P. angulata* foram coletados aleatoriamente de plantas cultivadas em campo e posteriormente foram separados e classificados em três estádios de maturação de acordo com a coloração do cálice descritos como: fruto totalmente verde (1), fruto verde-amarronzado (2), fruto marrom palha (3) (Figura 1).



**Figura 1.** Coloração do cálice de *Physalis angulata* em diferentes níveis de maturação. 1 – fruto totalmente verde, 2 – fruto verde-amarronzado, 3 – fruto marrom palha.

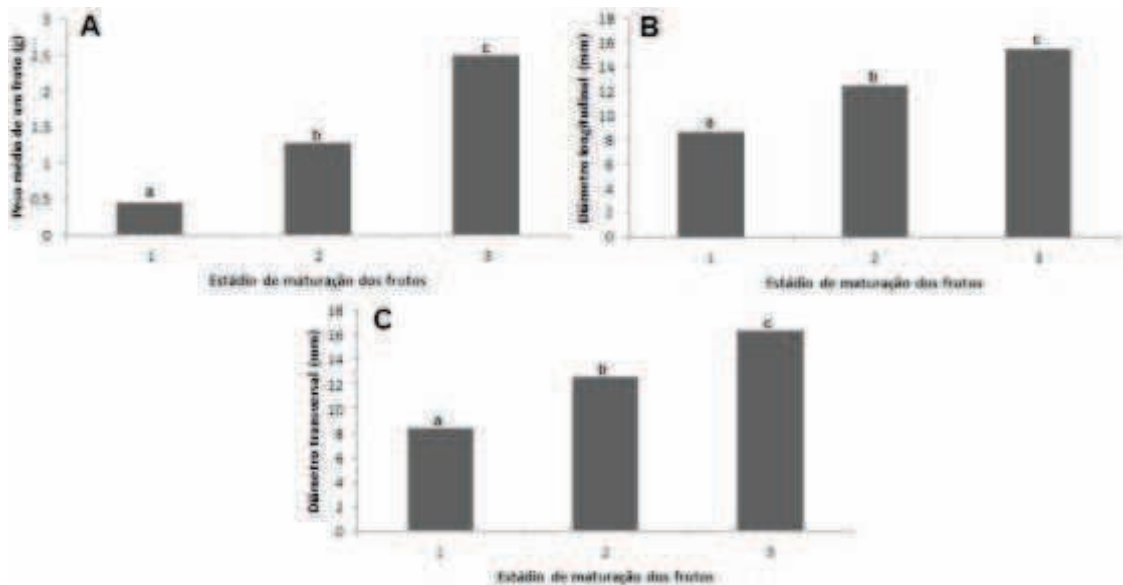
Destes frutos foi realizada a caracterização biométrica, avaliando o peso médio dos frutos, utilizando balança analítica de precisão; diâmetro longitudinal (mm) e transversal (mm), medidos através de paquímetro digital com 0,01 de precisão. Na caracterização bioquímica dos frutos seguiu-se as metodologias descritas por YEMM & WILLIS (1954) para quantificação de açúcares solúveis totais pelo método da antrona, e MILLER (1959), para açúcares redutores pelo método do dinitrosalicilato (DNS). As concentrações de sacarose foram determinadas pela diferença entre os teores de açúcares solúveis totais e açúcares redutores, multiplicada pelo fator 0,95, segundo Martim (2003).

Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias, comparadas através do teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

## **Resultados e discussão**

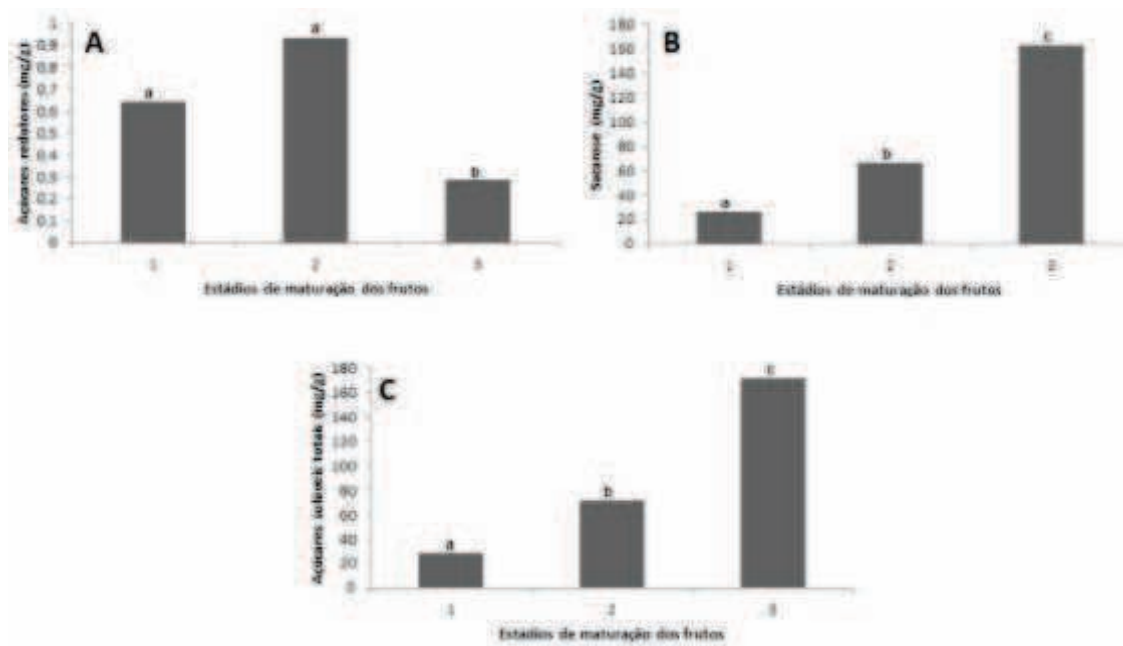
Houve aumento do peso do fruto no decorrer dos estádios de maturação, apresentando peso médio de 2,5g, resultado inferior ao encontrado por Oliveira et al (2011) (Figura 2A). De acordo com Costa et al. (2004), a massa do fruto está relacionada diretamente com o seu grau de desenvolvimento e maturação do fruto, sendo que frutos maduros apresentam valores superiores aos verdes (LEMOS, 2006).

As variáveis diâmetro transversal e longitudinal apresentaram diferenças entre os estádios analisados, mostrando maiores valores para o estágio de fruto marrom palha, seguido por fruto verde-amarronzado e fruto totalmente verde (Figura 2B e C). Dessa maneira, os diâmetros longitudinal e transversal, devem ser analisados conjuntamente, uma vez que definem o formato do fruto, sendo importante para aqueles comercializados *in natura*, como os frutos de camapú.



**Figura 2.** Peso médio (A), diâmetro longitudinal (B) e diâmetro transversal (C) dos frutos de *Physalis angulata* em três estádios de maturação: 1 – fruto totalmente verde, 2 – fruto verde-amarronzado, 3 – fruto marrom palha.

Para os teores de açúcares redutores, glicose e frutose não houve diferença entre os dois primeiros estádios e uma redução no terceiro, (Figura 3A). As concentrações de sacarose apresentaram diferenças significativas entre todos os estádios (Figura 3B). Foi observado um aumento de mais que o dobro ao longo da maturação, sendo superior ao de açúcares redutores. Os teores de açúcares totais foram similares aos teores de sacarose, sendo este o açúcar de maior quantidade nos frutos (Figura 3C)



**Figura 3.** Teor açúcares redutores (A), sacarose (B) e açúcares solúveis totais (C) nos frutos de *Physalis angulata* em três estádios de maturação: 1 – fruto totalmente verde, 2 – fruto verde-amarronzado, 3 – fruto marrom palha.



## Conclusão

Os frutos das espécies de *Physalis angulata* devem ser colhidos ao atingirem o último estágio de maturação, pois nesse os frutos apresentam maior tamanho e teor de açúcares, características mais apreciadas para comercialização. Dessa maneira, apresentando potencial para serem explorados pela indústria alimentícia e farmacêutica.

## Agradecimento

A Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS pela infraestrutura disponibilizada e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia – Fapesb pelo financiamento do projeto.

## REFERÊNCIAS

- BERTONCELLI, D. J. et al. Qualidade de frutos de *Physalis spp.* sob diferentes doses de N. In: Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica SICITE 2012, Curitiba. **Anais...** Curitiba: UTFPR, 2012.
- CANTILLANO, R. F. F. **Sistema de produção de ameixa europeia**. Embrapa Uva e Vinho: Sistema de Produção, n. 7, dez/2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Ameixa/AmeixaEuropeia/index.htm>>. Acesso em: 10 mar. 2015
- CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliça: Fisiologia e Manuseio**. 2 ed. Lavras: UFLA, 2005. 783p.
- COELHO, A.H.R. Qualidade pós-colheita de pêssegos. **Informe Agropecuário**, v. 17, n.180, p.31-39, 1994.
- COSTA, N. P.; LUZ, T. L. B.; BRUNO, R. L. A. Caracterização físico-química de frutos de umbuzeiro (*Spondias tuberosa*) colhidos em quatro estágios de maturação. **Bioscience Journal** (Uberlândia), v. 20, n. 2, p. 65-71, 2004.
- HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 481-504, 2000.
- LEMONS, O. L. **Utilização de biofilmes comestíveis na conservação pós-colheita do pimentão 'Magali R'**. 2006. 115 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, 2006.
- MARTIM, S. A. **Pulverização do cafeeiro com açúcar: potencial de uso em mudas submetidas à deficiência hídrica e na recuperação de plantas atingidas por Glyphosate**. 2003. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. 67p.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 31, p. 426-428, 1959.
- OLIVEIRA, J. A. R. De et al. Caracterização física, físico-química e potencial tecnológico de frutos de camapu (*Physalis angulata* L.). **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. v. 05, n. 02, p. 573-583, 2011
- VELASQUEZ, H.J.C.; GIRALDO, O.H.B.; ARANGO, S.S.P. Estudio preliminar de La resistencia mecánica a la fractura y fuerza de firmeza para fruta de uchuva (*Physalis peruviana* L.). **Revista Facultad Nacional de Agronomía**, Medellín, v.60, n.1, p.3785-3796, 2007.
- YEMM, E. W.; WILLIS, A.J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **The Biochemical Journal**, v.57, p. 508-514, 1954.

**CONTROL BIOLÓGICO EN CONDICIONES DE LABORATORIO  
DE *Xylotrechus arvicola* (Coleoptera: Cerambycidae), INSECTO  
PLAGA EN EL CULTIVO DE LA VID (*Vitis vinifera*)**



# CONTROL BIOLÓGICO EN CONDICIONES DE LABORATORIO DE *Xylotrechus arvicola* (Coleoptera: Cerambycidae), INSECTO PLAGA EN EL CULTIVO DE LA VID (*Vitis vinifera*)

Álvaro Rodríguez<sup>1\*</sup>; Sara Mayo<sup>1</sup>; Óscar González<sup>1</sup>; Paulo H. da Silva<sup>1</sup>; Alicia Lorenzana<sup>1</sup>; Horacio J. Peláez<sup>2</sup>; Pedro A. Casquero<sup>1</sup>

1. Grupo de Ingeniería y Agricultura Sostenible. Instituto de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Biodiversidad. Universidad de León, Av. Portugal 41, 24071 León, España.

2. Freelance. Vicente Aleixandre 24, 47008 Valladolid, España.

E-mail: alrog@unileon.es (A. Rodríguez)

## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1. *Xylotrechus arvicola*.

*Xylotrechus arvicola* (Coleoptera: Cerambycidae) es una de las plagas más destructivas que existen en vid, y se encuentra asociado, por la acción de las larvas de estos, a la propagación de hongos de la madera hacia el interior de la cepa, existiendo o no un alto grado de asociación entre los daños directos (por *X. arvicola*) e indirectos (por el ataque de hongos) especialmente en algunas variedades (Ocete et al., 2002). Debido a su gran capacidad de establecimiento en nuevos viñedos y su capacidad para atacar a plantas de vid que aparentemente se muestran sanas, *X. arvicola* tiene el potencial de causar graves daños económicos a la vid, unos de los principales cultivos de nuestro país.

Los adultos de *X. arvicola* (Figura 1) pueden medir entre 8 y 20 mm de longitud. El tamaño medio de la hembra es mayor que el del macho. Su coloración es parda o negruzca, con bandas pronotales y elitrales claras, generalmente amarillas. Las antenas y las patas son más claras, de color ámbar o rojizo. Las antenas, no sobrepasan 1/3 de la longitud del cuerpo en su conjunto y las patas son más oscuras en los machos que en las hembras, con tonalidades amarillo-rojizas (Moreno et al., 2003). Los huevos (son de color blanquecino o crema bastante homogéneo y alargados, con una longitud media en torno a 1,8 mm y una anchura media de aproximadamente 0,7 mm (Moreno, 2005). Las larvas son ápodas, blancas y troncocónicas, de un tamaño medio de unos 22 mm en el último estadio (Moreno et al., 2003). Las antenas son tri-articuladas y las mandíbulas, robustas de color marrón rojizo con puntas redondeadas. Las pupas son exaratas, de color crema y ligeramente ovaladas, de unos 17,5 mm de tamaño medio (Moreno, 2005).



Figura 1: Imagos de *X. arvicola*. Izquierda (Macho), derecha (Hembra). (Imagen tomada de © M. Hoskovec, www.cerambyx.uochb.cz, 2013).

El ciclo biológico de *X. arvicola* dura como máximo dos años (Vives-Noguera, 2000). La emergencia de adultos se produce entre finales de marzo y finales de julio. El pico de máximo vuelo suele producirse en los meses de mayo y junio. Se mueve, principalmente, entre la vegetación y las flores, pero tiene capacidad para dar vuelos cortos (García Ruiz, 2009). Después de la cópula, pocos días tras la emergencia, realizan la puesta. Los huevos se concentran en rendijas de la madera de plantas leñosas o debajo del ritidoma (Peláez et al. 2002). La localización de la puesta facilita que las larvas emergentes no tengan problemas para introducirse en la madera y realizar galerías hacia el interior de la planta (García Ruiz, 2009).

La fase larvaria tiene una duración media de dos años en condiciones de campo. A medida que las larvas van realizando las galerías las van taponando por detrás con serrín y restos propios. Permanecen alimentándose de la madera en los brazos, el tronco e incluso en algunos casos en la zona del patrón, realizando galerías, en sentido horizontal o vertical, ascendente o descendente, en madera sana o seca (Moreno, 2005). Posteriormente, excavan la cámara pupal, una galería de una anchura mayor que el resto, limpia de serrín y conectada con el exterior (García Ruiz, 2009). En la cámara, la larva se transforma en pupa y permanece hasta convertirse en adulto, desde donde emerge al exterior

## 1.2. Daños provocados por *Xylotrechus arvicola*.

Los síntomas visibles de la presencia de *X. arvicola* en un viñedo son las galerías producidas por las larvas, que se observan en los cortes de poda (Figura 2), y los orificios de emergencia de los adultos, circulares y de unos 5 mm de diámetro (Figura 3). Las galerías pueden estar rellenas de serrín de color blanquecino si son del año, debido a que el insecto ha discurrido por allí recientemente, o bien están ennegrecidas o vacías por el viento o lluvia cuando son galerías viejas (Peláez et al., 2006).



Figura 2: Síntomas de larvas de *X. arvicola* en cortes de poda



Figura 3: Orificio de emergencia de adultos de *X. arvicola*.

Si existe una alta infestación, se puede producir la rotura de brazos y tronco como consecuencia de la pérdida de resistencia mecánica y la muerte precoz de la planta. Si la cepa se ve afectada durante varios años, el desarrollo foliar se vuelve escaso y los sarmientos poco vigorosos y productivos



Figura 4: Cepa afectada por *X. arvicola*, sarmientos poco vigorosos

(Figura 4). (Moreno et al., 2004a).

### **1.3. Control de *Xylotrechus arvicola***

No se conocen posibles métodos de control de *X. arvicola*. Las larvas de *X. arvicola*, por su situación en el interior de la madera, quedan inaccesibles a un control eficaz con insecticidas, así como a la acción mecánica, por la dificultad de localizarlas. Otro problema añadido es el tratamiento sobre los adultos de *X. arvicola*, que se plantea difícil por tener un patrón de emergencia tan escalonado en el tiempo (García Ruiz, 2009). La mayoría de las acciones para el control de *X. arvicola*, se dirigen a la realización de prácticas culturales, como la eliminación del ritidoma de la planta para evitar la puesta y la eliminación en la poda, de la madera que presente síntomas de infestación en las parcelas.

### **1.4. Control biológico de *Xylotrechus arvicola*.**

Ante esta escasez de recursos para el control de *X. arvicola*, puede ser interesante plantear la posibilidad de emplear técnicas de control biológico contra esta plaga.

Una estrategia de control biológico de plagas, suele intentar en primer lugar técnicas inoculativas, buscando encontrar uno o varios enemigos naturales, para que se establezcan y se diseminen, y que a largo plazo consigan mantener poblaciones por debajo de los niveles tolerables. Siempre que la plaga se encuentre determinada en una zona geográfica y que dicha plaga no provoque un alto impacto, se optará por técnicas inoculativas frente a inundativas. La elección de una estrategia u otra no solo depende de la plaga sino también de los organismos a emplear en el control biológico. Así que hay que estudiar, por un lado la fauna auxiliar local, y por otro la posibilidad de encontrar agentes exóticos potencialmente válidos para la estrategia inoculativa (García Ruiz, 2007).

#### **1.4.1. Hongos entomopatógenos.**

*Beauveria bassiana*, hongo entomopatógeno, es utilizado como agente de biocontrol frente a Hemiptera, Coleoptera y Lepidoptera (Rehner y Buckley, 2003; Zimmermann, 2007; Meyling et al., 2009). Provoca la enfermedad conocida como "muscardina blanca", cuando las esporas del hongo entran en contacto con el cuerpo de un insecto hospedador, germinan, penetran en la cutícula, y crecen en el interior, matando al hospedador (Zimmermann, 2007).

*B. bassiana* es el hongo más comúnmente utilizado para el control de plagas de insectos, y forma la base de un gran número de plaguicidas disponibles. *B. bassiana* (cepa GHA) se registró en 1995 como bioplaguicida (EPA, 2006a) y ha sido utilizado hasta el día de hoy frente a una gran variedad de insectos.

Al aplicar el caldo las esporas alcanzan al insecto. Cuando entran en contacto con él germinan de forma que el tubo germinativo emite o exuda compuestos capaces de destruir la quitina y demás sustancias que permiten el acceso del micelio del hongo entomopatógeno al hemocele del insecto parasitado. Una vez que el hongo consigue entrar en el interior del insecto crece y se desarrolla con rapidez de forma que el hospedante muere y el hongo se reproduce cubriendo todo o parte del insecto por un tenue fieltro blanquecino y produciendo numerosísimas esporas que de alcanzar a otro insecto hospedante reproducirán el ciclo anterior. Normalmente parasitan al

insecto hospedante en todos sus estados, desde huevo hasta adulto, y el tiempo que tardan en surtir su efecto, muerte del insecto, varía con el número de esporas que se adhieren al insecto y con la cepa de que se trate, en general, suele oscilar entre 2 y 15 días (De Liñan, 2013).

#### **1.4.2. Insecticidas biológicos (Derivados naturales)**

*Spinosad*, subproducto de origen natural, con capacidad insecticida obtenido a partir de la fermentación de la bacteria de la familia de los Actinomyces, *Saccharopolyspora spinosa*, y es una mezcla de los metabolitos espinosin A y espinosin D:

Es un compuesto natural, insecticida biológico, que activa los receptores acetilcolina-nicotínicos de las células nerviosas postsinápticas, produciendo temblores y posterior parálisis del insecto. También tiene efectos sobre los receptores del ácido g-aminobutírico pero esta actividad no es insecticida. Su persistencia es de 1 a 2 semanas. En el suelo se degrada rápidamente por la luz solar y por los microorganismos. En condiciones aerobias su vida media oscila entre 9,4 y 17,3 días para espinosin A y 14'5 días para espinosin D. La posibilidad de que alcance las capas profundas del suelo es muy baja. Espinosin A es inmóvil; de espinosin D no se sabe, por ser muy insoluble en agua, pero es lógico que también lo sea. En el agua su vida media es de 161 días para espinosin A y 250 días para espinosin D. La degradación fotolítica en el agua de espinosin A y espinosin D tiene una vida media de 1-2 días. En las plantas se degrada principalmente por fotólisis con una vida media de 1,6 a 16 días (De Liñan, 2013).

Debido a su rápida degradación, baja toxicidad en humanos y bajas dosis de uso, el *Spinosad* ha sido clasificado por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos como un material de reducido riesgo ambiental y toxicológico, destacando su potencial de uso en estrategias de MIP (Sparks et al., 2001).

#### **1.4.3. Insecticidas biológicos (Inhibidores de la embriogénesis)**

El 2-1-metil-2-4-fenoxi-fenoxi-etoxi-piridina, Piriproxifen, es un derivado de la piridina con actividad insecticida por contacto e ingestión; se comporta como una hormona juvenil actuando sobre el crecimiento de los insectos. Afecta a la fisiología de la morfogénesis, reproducción y embriogénesis de los insectos. Las hembras adultas tratadas ponen huevos con tan alto contenido de hormona juvenil que los embriones no serán viables (De Liñan, 2013).

Piriproxifen, causa la muerte de estados inmaduros del insecto de 2 a 10 días después de aplicación (Nauen et al., 2008).

En las larvas y pupas tratadas interfiere la metamorfosis normal adquiriendo los individuos afectados características intermedias entre larva y pupa o entre pupa y adulto que les llevan, con mayor o menor rapidez, a la muerte. Los adultos se ven afectados en aspectos que se relacionan con la reproducción, así, en algunos casos, se producen malformaciones de los órganos genitales y fallos del apareamiento, en otros. Las hembras quedan estériles o, al menos, disminuye la viabilidad de los huevos que ponen. Además de los efectos anteriores, también se producen interferencias con la fisiología endocrina de la diapausa con lo que los insectos se ven expuestos a condiciones ambientales desfavorables. Posee elevada



persistencia lo que aumenta la posibilidad de que entre en contacto con el insecto o de que sea ingerido por él. En el suelo es prácticamente inmóvil; no contamina las aguas subterráneas. Se degrada completamente con una vida media de 3,5-15,6 días, y ni él ni sus metabolitos se acumulan en el medio natural (De Liñan, 2013).

El objetivo de este trabajo fue evaluar en condiciones de laboratorio, mediante distintos tipos de aplicación con Torre Potter, el efecto de diferentes materias activas de origen biológico sobre las fases de huevo, larva neonata y adulto, estadios en los que *X. arvicola* es accesible.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS.

### 2.1. Materias activas

Para el control de *X. arvicola* en el cultivo de la vid se han testado diferentes materias activas de origen biológico con diferente modo de acción sobre distintos estadios de *X. arvicola*: huevos, larvas neonatas (<24h) y adultos, que son los estadios más susceptibles de la plaga que se pueden observar en campo, porque tanto las larvas durante la mayor parte de su ciclo, como las pupas, se desarrollan dentro de la madera y el acceso a las mismas conllevaría la destrucción de la planta.

Todas las materias activas fueron diluidas o suspendidas en agua destilada. Las materias activas evaluadas en los ensayos, el nombre comercial, formulación, casa comercial y máxima dosis comercial, se describen en la Tabla 1.

Tabla 1: Materias activas evaluadas, nombre comercial, formulación, casa comercial, y máxima dosis comercial.

Materia Activa	Nombre Comercial	Formulación (% i.a.)	Casa Comercial	Máxima Dosis Comercial
Spinosad	SPINTOR® 480 CC	48% (p/v)	Dow Science Ibérica S.A.	25 ml/hl
<i>B. bassiana</i>	BASSI® WP	22% (p/p)	Massó S.A.	125 g/hl
Piriproxifen	ATOMINAL® 10 EC	10% (p/v)	Massó S.A.	75 cm <sup>3</sup> /hl

En todos los ensayos se utilizó agua destilada como tratamiento de control.

### 2.2. Insectos: Adultos, huevos y larvas neonatas de *X. arvicola*

Todos los estadios de *X. arvicola*, (adultos, larvas neonatas y huevos) previo a los ensayos, se mantuvieron en una cámara con condiciones ambientales controladas de temperatura ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ), humedad ( $60 \pm 5\%$ ), y sometidos a un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, con una intensidad luminosa de 1000 lux.

### 2.3. Diseño de los tratamientos

Para las aplicaciones de los tratamientos se utilizó una Torre Potter de carga manual (Burkard Scientific Limited, Po Box 55 Uxbridge, Middx, UB8 2RT, U.K.) (Potter, 1952) con compresor de aire. El volumen de disolución de insecticida empleado en cada pulverización fue 1 ml y se aplicó sobre placas de Petri de 50 mm de diámetro a una presión de 40 kPa, lo que produce un depósito de  $0,004 \pm 0,0004$  ml de caldo/cm<sup>2</sup>, equivalente a 400 liltros de caldo por hectárea.

Antes de comenzar los tratamientos se calibraba la Torre Potter mediante 10 repeticiones para comprobar que el residuo medio ( $X$ ) estuviese comprendido entre:  $1,5 \text{ mg/cm}^2 \leq (X) \leq 2,0 \text{ mg/cm}^2$

Si el residuo es menor de  $1,5 \pm 0,2 \text{ mg/cm}^2$ , no sería suficiente el volumen de caldo/cm<sup>2</sup>. Si el residuo fuera mayor de  $2,0 \pm 0,2 \text{ mg/cm}^2$ , tendríamos problemas de pérdidas de líquido por goteo (Mead-Briggs et al., 2000).

Es por ello que el residuo del volumen de la disolución de insecticida se ajustó de manera que se mantuviese la proporción de materia activa máxima recomendada, calculada para un gasto de 400 l de caldo por hectárea. Para todos los insecticidas, se utilizó como líquido transportador agua destilada (Figura 5).



Figura 5: Pulverización de insecticida sobre placa Petri

Las condiciones controladas posteriores a todos los tratamientos en Torre Potter sobre los distintos estadios de *X. arvicola* (adultos, huevos y larvas neonatas), durante el periodo de exposición de los insectos a las materias activas fueron temperatura ambiente ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ), humedad relativa ( $60 \pm 5\%$ ), fotoperiodo 16:8 h (Luz : Oscuridad) y una intensidad luminosa superior a 1000 lux.

### 2.3.1. Aplicación sobre huevos y larvas de *X. arvicola*

Los huevos de *X. arvicola* que se iban a utilizar en los ensayos, se obtenían a partir de los emparejamientos de los adultos capturados, y eran transferidos a placas de Petri. Se hicieron en las tapas de las placas Petri, 4 agujeros de 5 mm de diámetro ( $20 \text{ mm}^2$ ), para evitar el efecto de cámara letal. A continuación, se trataron las placas Petri que contenían los huevos de *X. arvicola*, con las materias activas (*Spinosad*, *Beauveria bassiana* y Piriproxifen). Para el ensayo sobre huevos se colocaron 20 huevos por placa, por 5 repeticiones en cada tratamiento y para el ensayo sobre larvas se colocaron 10 larvas por placa, por 5 repeticiones en cada tratamiento. En cada tratamiento hubo un testigo que fue tratado con agua destilada. Una vez tratadas las placas con los huevos de *X. arvicola*, se realizaban conteos diarios, hasta el séptimo día después de la aplicación, anotando la inhibición de huevos y la mortalidad larvaria que se iba produciendo.

### 2.3.2. Aplicación sobre adultos de *X. arvicola*

Siguiendo la metodología descrita en los dos estadios inmaduros anteriores de *X. arvicola*, se perforaron las tapas de las placas Petri. A continuación, se trataron las placas con las materias activas (*Spinosad*, *Beauveria bassiana*), descartando la utilización de Piriproxifen por ser una materia activa que ha demostrado mejores resultados en estadios inmaduros de insectos (Siddall, 1976; Dhadialla et al., 1998). Se colocaron 4 adultos por placa, por 2 repeticiones en cada tratamiento. En cada tratamiento hubo un testigo que fue tratado con agua destilada.

Una vez tratadas las placas, se dejaban secar al aire libre durante un periodo de 1 hora, para más tarde colocar los insectos. Se realizaron conteos diarios, hasta el

séptimo día después de la aplicación, anotando la mortalidad que se iba produciendo.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La eficacia de las materias activas ha sido diferente según el estadio de desarrollo (huevos, larvas y adultos) de *X. arvicola*. La variación observada en todos los casos se puede explicar en función del tipo de materia activa utilizada y sobre el tipo de estadio de desarrollo del insecto en el que se ha aplicado (Tabla 2).

Tabla 2: Porcentaje de mortalidad según estadio de *X. arvicola* y materia activa aplicada a mayor dosis comercial

Materia Activa	Huevos	Larvas neonatas	Adultos
Spinosad	69.25%	84%	100%
<i>B. bassiana</i>	87.25%	86%	100%
Piriproxifen	87.75%	92%	-
Control	12.25%	18%	12.5%

Spinosad muestran valores aceptables en el control de huevos (69.25%) (Figura 6), y valores altos en el control de larvas, llegando al 84% (Figura 7), siendo destacable el control total (100%) que tiene sobre adultos (Figura 8).



Figura 6: Huevo de *X. arvicola* tras aplicación de Spinosad



Figura 7: Larva de *X. arvicola* tras aplicación de Spinosad

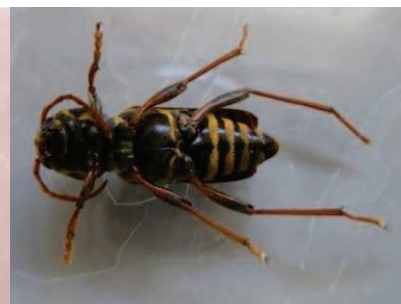


Figura 8: Adulto de *X. arvicola* tras aplicación de Spinosad

*Beauveria bassiana* tiene valores altos en el control de huevos (87.25%) (Figura 9), y larvas (84%) (Figura 10), teniendo un control total (100%) sobre adultos (Figura 11).



Figura 9: Huevo de *X. arvicola* tras aplicación de *Beauveria bassiana*



Figura 10: Larva de *X. arvicola* tras aplicación de *Beauveria bassiana*

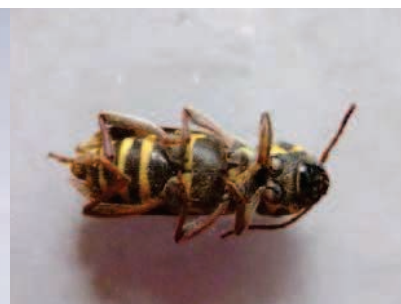


Figura 11: Adulto de *X. arvicola* tras aplicación de *Beauveria bassiana*

De las materias activas evaluadas, el insecticida con capacidad ovicida/larvicida Piriproxifen ejerce el mayor control sobre sobre los estadios inmaduros del insecto, alcanzando una mortalidad del 87.75% en huevos (Figura 12) y del 92% en larvas (Figura 13).

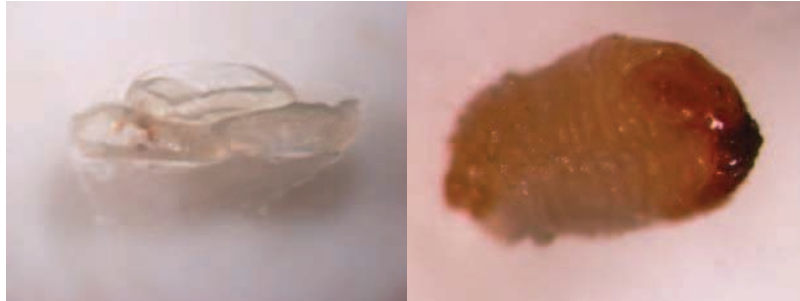


Figura 12: Huevo de *X. arvicola* tras aplicación de *Piriproxifen*      Figura 13: Larva de *X. arvicola* tras aplicación de *Piriproxifen*

El testigo realizado con agua destilada solo obtuvo el control del 12.25% en huevos (Figura 14), del 18% en larvas (Figura 15) y del 12.5% en adultos (Figura 16).



Figura 14: Huevo de *X. arvicola* tras aplicación de agua destilada      Figura 15: Larva de *X. arvicola* tras aplicación de agua destilada      Figura 16: Adulto de *X. arvicola* tras aplicación de agua destilada

#### 4. CONCLUSIONES

Spinosad, insecticida de origen biológico, y *B. bassiana*, hongo entomopatógeno, tras estos resultados obtenidos en laboratorio, pueden considerarse como agentes biológicos eficaces para el control de todos los estadios de *X. arvicola*. El insecticida con actividad ovicida/larvicida también se considera eficaz para el control, limitándose su acción a los estadios inmaduros del insecto.

El control de *X. arvicola* debe ser un manejo integrado que conjugue las labores culturales, la evaluación de los síntomas en el cultivo y la aplicación de organismos como *Beauveria bassiana*, que son eficaces sobre todos los estadios del insecto y a la vez respetuosos con el medio ambiente.

**PALABRAS CLAVE:** *Xylotrechus arvicola*, *Vitis vinifera*, control biológico, *Beauveria Bassiana*, Spinosad, Piriproxifen.



## AGRADECIMIENTOS

Al convenio de colaboración entre la Universidad de León y las empresas vitivinícolas Pago de Carraovejas y Esteban Sánchez Maíllo, para el desarrollo del proyecto de investigación titulado: “*Xylotrechus arvicola*, técnicas de seguimiento y control en el cultivo de la vid”, financiado por el Programa de Desarrollo Rural de Castilla y León – cofinanciado por el Fondo Europeo Agrícola de Desarrollo Rural (FEADER).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**De Liñan, C. 2013.** Vademecum de productos fitosanitarios y nutricionales. Ediciones Agrotécnicas, S.L. 29ª Edición.

**Dhadialla, T.S., Carlson, G.R. y Le, D.P. 1998.** New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Ann. Rev. Entomol.*, 43: 545-569.

**Environmental Protection Agency [EPA]. 2006a.** *Beauveria bassiana* strain GHA (128924) biopesticide fact sheet ([http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet\\_128924.htm](http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet_128924.htm)).

**García Ruiz, E. 2009.** Contribución al Manejo de Plagas en vid: *Xylotrechus arvicola* y *Lobesia botrana* Denis & Schiffermüller (Lepidoptera: Tortricidae). Tesis Doctoral. Universidad de La Rioja.

**García-Ruiz, E., Marco, V. y Pérez-Moreno, I. 2007.** *Xylotrechus arvicola*: Posibilidades de control biológico. *Terralia*, 61: 38-44.

**Mead-Briggs, M.A., Brown, K., Candolfi, M.P., Coulson, M.J.M., Miles, M., Moll, M., Nienstedt, K., Schuld, M., Ufer, A. y McIndoe, E. 2000.** A laboratory test for evaluating the effects of plant protection products on the parasitic wasp, *Aphidius rhopalosiphi* (DeStephani-Peres) (Hymenoptera: Braconidae). En: Guidelines to evaluate side-effects of plant protection products to non-target arthropods. Editores: Candolfi, M.P.J.; Blümel, S.; Forster, R.; Bakker, E.M.; Grimm, C.; Hassan, S.A.; Heimbach, U.; Mead-Briggs, M.A.; Reber, B.; Schmuck, R. y Vogt, H.: 13-21.

**Meyling, N.V., Lubeck, M., Eilenberg, J. y Rehner, S. A. 2009.** Community composition, host range and genetic structure of the fungal entomopathogen *Beauveria* in adjoining agricultural and seminatural habitats. *Mol Ecol* 18: 1282–1293.

**Moreno, C.M. 2005.** *Xylotrechus arvicola* (Olivier 1795) (Coleóptera: Cerambycidae): descripción morfológica, ciclo biológico, incidencia y daños en el cultivo de la vid. Tesis Doctoral. Publicaciones del ITACYL.

**Moreno, C.M., Martín, M.C., Santiago, Y., De Evan, E., Hernández, J.M. y Peláez, H. 2004a.** Presencia de *Xylotrechus arvicola* (Olivier, 1795) (Coleoptera: Cerambycidae) en viñedos de la zona centro de Castilla y León. *Bol. San. Veg. Plagas*, 30: 475-486.

**Moreno, C.M., Martín, M.C., Urbez, J.R., Maraña, R., Moro, S., García, D. y Peláez, H. 2003.** Descripción de dos coleópteros que afectan al viñedo en Castilla y León. *Phytoma*, 147: 34-42.

**Nauen, R., Reckmann, U., Thomzik, J. y Thielert, W. 2008** Biological profile of spirotetramat (Movento) a new two-way systemic (ambimobile) insecticide against sucking pest species. *Bayer CropScience Journal* 61: 245–278.

**Ocete, R., López-Martínez, M.A., Prendes, C., Lorenzo, C.D. y González-Andújar, J.L. 2002.** Relación entre la infestación de *Xylotrechus arvicola* (Coleoptera: Cerambycidae) (Olivier) y la presencia de hongos patógenos en un viñedo de la Denominación de Origen “La Mancha”. *Bol. San. Veg. Plagas*, 28: 97-102.

**Peláez, H., Hernández, J.M., Martín, M.C., Moreno, C.M. y Santiago, Y. 2002.** Determinación de las características del huevo de *Xylotrechus arvicola* (Coleoptera: Cerambycidae, Olivier, 1795). Libro de Actas del X Congreso Ibérico de Entomología, 52.

**Peláez, H., Moreno, C., Santiago, Y., Maraña, R., Urbez, J.R., Lambert, S.M., María, C.M., Evan, E., Barrigón, J. y Prada, P.V. 2006.** *Xylotrechus arvicola*: Un cerambícido en el cultivo de la vid. *Terralia*, 55: 50-60.

**Potter, C. 1952.** An improved laboratory apparatus for applying direct sprays and surface films with data on the electrostatic charge on atomized spray fluids. *Ann. Appl. Biol.*, 1: 1-29.

**Rehner, S.A. y Buckley, E.P. 2003.** Isolation and characterization of microsatellite loci from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Mol Ecol* 3: 409–411.

**Siddall, J.B. 1976.** Insect growth regulators and insect control: a critical appraisal. *Environ Health Perspect* 14: 119–126.

**Sparks, T.C., Crouse, G.D. y Durst, G. 2001.** Natural products as insecticides: the biology, biochemistry and quantitative structure-activity relationships of spinosyns and spinosoids. *Pest Manag Sci* 57: 896–905.

**Vives-Noguera, E. 2000.** Coleoptera, Cerambycidae. En: *Fauna Ibérica*, vol. 12. Ramos M. A. et al. (eds). Museo Nacional de ciencias Naturales. CSIC. Madrid. España.

**Zimmermann, G. 2007.** Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Sci Technol* 17: 553–596.

**DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE LINHAGENS ELITES DE  
MAMONEIRA POR MEIO DE MARCADORES  
MICROSSATÉLITES**

# DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE LINHAGENS ELITES DE MAMONEIRA POR MEIO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

Helison Santos Brasileiro<sup>1</sup>, Simone Alves Silva<sup>2</sup>, Edna Lobo Machado<sup>3</sup>, Karine da Silva Simões<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Engenheiro Agrônomo, Doutorando em Ciências Agrárias pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). Bolsista CAPES. Endereço: Rua F, nº 245, CEP: 44380-000. Cruz das Almas, Ba, Email: [agr.brasileiro81@gmail.com](mailto:agr.brasileiro81@gmail.com)

<sup>2</sup> Engenheira Agrônoma, Doutora. Docente da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). Endereço: Rua Rui Barbosa, 710. CEP:44380-000. Laboratório NBIO/CCAAB, Cruz das Almas, Ba. Email: [sas@ufrb.edu.br](mailto:sas@ufrb.edu.br), [simone.alves@pq.cnpq.br](mailto:simone.alves@pq.cnpq.br).

<sup>3</sup> Bióloga, Doutora. Professora Adjunta da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). Endereço: Rua Rui Barbosa, 710. CEP:44380-000. Cruz das Almas, Ba. Email: [ednalobo@ufrb.edu.br](mailto:ednalobo@ufrb.edu.br).

<sup>4</sup> Engenheira Agrônoma, Doutorando em Ciências Agrárias pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). Bolsista CAPES. Endereço: Avenida Crisogno Fernandes, n 751, Centro, Cruz das Almas, Ba Email: [karinesimoes01@hotmail.com](mailto:karinesimoes01@hotmail.com)

---

## Resumo

O objetivo do trabalho foi identificar linhagens divergentes e verificar o grau de dissimilaridade genética em relação aos seus parentais, por meio de marcadores microssatélites (SSRs). Analisou-se um conjunto de 47 linhagens e cinco parentais, com marcadores SSR e estimou-se a dissimilaridade genética de acordo com a obtenção da matriz de dissimilaridade e do coeficiente de dissimilaridade de Nei e Li; e, para a análise de agrupamento hierárquico utilizou-se o método UPGMA *Unweighted Pair-Group Method Averages*; com obtenção do ponto de corte por meio do pacote NbCluste, metodologia Ward. D e o coeficiente do Pseudo t<sup>2</sup>, com validação dos agrupamentos por meio do coeficiente de correlação cofenético. Linhagens e parentais foram genotipados por meio da utilização de 53 pares de iniciadores SSRs. As análises mostraram Trinta e seis loci microssatélites como polimórficos. Esses loci possibilitam o agrupamento das linhagens em sete grupos distintos, quando utilizado o método de agrupamento ward.d e o coeficiente do pseudot<sup>2</sup>, por meio dos recursos computacionais do programa “R” demonstrando existência de divergência genética entre elas e seus parentais.

## Introdução

A mamoneira (*Ricinus communis* L) pertencente à família Euforbiaceae. Seu centro de diversidade está localizado na Etiópia e no leste da África e é cultivada em muitas regiões tropicais e subtropicais do mundo. As sementes, folhas e caule de mamona são tóxicas quando consumidos por seres humanos e animais, devido à presença de rícino, o principal alcalóide presente na planta (GOVAERTS et al., 2000).

As sementes da mamona apresentam uma concentração muito elevada de óleo, ideal para a produção de biodiesel (mais de 45%) (JEONG; PARK, 2009). O óleo vegetal é solúvel em álcool, apresentando alta viscosidade e exigindo menos aquecimento do que os outros óleos durante a produção de biodiesel (BELTRÃO; CARDOSO, 2004). O óleo da mamona pode originar mais de 400 produtos industrializados, como: cosméticos, próteses utilizadas em cirurgias ortopédicas,

lubrificantes para turbinas de avião, fabricação de corantes, germicidas, desinfetantes, etc. (SANTOS et al., 2007).

Quanto à geração de energia, o óleo de mamona torna-se propício para fazer frente ao Programa Nacional de Biodiesel que, além da inclusão social, almeja reduzir tanto as importações brasileiras de petróleo quanto a queima de combustíveis fósseis. Nesse sentido, destaca-se que além das vantagens sócio econômicas que a cultura da mamona propicia essa oleaginosa apresenta teor de óleo acima das demais (JEONG; PARK, 2009). No entanto, os principais problemas para a exploração racional dessa espécie para produção de biodiesel na região Nordeste estão relacionados ao potencial produtivo de cultivares e a inadequada disponibilidade destas cultivares, principalmente quanto ao elevado teor de óleo e tolerantes a pragas e doenças. Assim como, não há sementes que atendam às necessidades dos agricultores e dos processadores da matéria prima produzida (PALMIERI e MAIA, 2007; BAHIA et al., 2008).

A seleção de novas constituições genéticas, auxiliada por marcadores moleculares tem sido bastante utilizada em várias culturas (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Os microssatélites ou sequências simples repetidas em tandem (SSRs) são marcadores co-dominantes, abundantes nos genomas dos eucariotos, multi-alélicos e com alta reprodutibilidade (POWELL et al., 1996). Essas características fazem desses marcadores ferramentas úteis no melhoramento de plantas. Dessa forma, o objetivo desse trabalho é identificar linhagens divergentes e verificar o grau de dissimilaridade genética em relação aos seus parentais, por meio de marcadores microssatélites (SSRs).

## **Metodologia**

As 47 linhagens elites foram obtidas de uma população formada a partir de hibridações e conduzidas pelo método SSD (*Single Seed Descent*) com posterior seleção após alto grau de homozigose em geração F<sub>6</sub>, pelo Núcleo de Melhoramento Genético e Biotecnologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - NBIO/UFRB, na cidade de Cruz das Almas, Bahia, Brasil.

O DNA foi extraído, das 47 linhagens e seus parentais (BRS Nordestina, Sipeal, EBDA MPA-17, Mirante e Paraguaçu), foram obtidos por meio do protocolo descrito por Doyle & Doyle (1987) com modificações (Tabela 1). Foram coletadas folhas jovens e saudáveis que por sua vez foram encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular do NBIO. As folhas foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1% e enxaguadas com água destilada. Posteriormente, as amostras foram acondicionadas em freezer com temperatura de -30°C até o momento da extração.

Um total de 53 pares de primers foi testado, sendo 23 pares desenvolvidos por Bajay et al. (2009, 2011) e 30 por Machado e Silva (2013). As reações de amplificação foram montadas em um volume final de 25 µL, contendo os seguintes reagentes: 3 µL de DNA genômico (5 ng/µL), 2,5 µL de tampão da enzima 10 X (100 mM Tris-HCl, pH 8,4 e 500 mM KCl), 0,8 µL de dNTP mix (2,5 mM de cada), 0,65 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,5 µL de cada primer (*forward e reverse*, 20 mM), 0,2 µL de Taq DNA polimerase, (5 U/µL - Invitrogen) e água ultra-pura q.s.p. A PCR foi feita em um termociclador Biocycler MJ96+ /MJ96G (Applied Biosystems do Brasil Ltda., São

Paulo, SP) programado para 5 minutos a 94 °C para desnaturação inicial do DNA, seguida por 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto com temperaturas entre 60 e 64 °C a depender do primer e 1 minuto a 72 °C. O ciclo final foi seguido por uma extensão de 10 minutos à 72 °C.

Tabela 1 – Comparação entre os protocolos Doyle & Doyle 1987 e Doyle & Doyle 1987 com modificações.

Doyle & Doyle 1987		Doyle & Doyle 1987 com modificações	
Reagentes	[ ] Final	Reagentes	[ ] Final
CTAB	2%	CTAB	2%
Tris-HCl pH 8,0 (1M)	100mM	Tris-HCl pH 8,0 (1M)	100mM
NaCl	1,4M	NaCl	1,4M
EDTA (0,5M)	20mM	EDTA (0,5M)	20mM
Polyvinylpyrrolidone (PVP)	1%	*Polyvinylpyrrolidone (PVP)	2%
Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)	3%	***Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)	-
2-mercaptoetanol	0,2%	*2-mercaptoetanol	0,8%
**Água destilada q.s.p.		**Água destilada q.s.p.	

\* Reagentes que sofreram alterações em suas concentrações  
 \*\* Completar para o volume desejado  
 \*\*\* Não foi utilizado

Estas 47 linhagens foram avaliadas com marcadores moleculares do tipo SSR por meio da distância genética gerada por esses marcadores entre os indivíduos. Para obtenção da matriz de dissimilaridade, foi utilizado o software PowerMarker V3.25 a partir do coeficiente de dissimilaridade de Nei e Li (1973). Para a análise de agrupamento hierárquico utilizou-se o método UPGMA *Unweighted Pair-Group Method Averages*, (SNEATH e SOKAL, 1973), sendo o dendrograma construído por meio do software STATISTICA 7.1 (STATISTICA, 2002). Para confecção do ponto de corte foram utilizados os recursos computacionais do programa R<sup>®</sup> 3.1.2 (<http://www.r-project.org>) por meio do pacote NbCluste, metodologia Ward.D e o coeficiente do Pseudot2.

A validação dos agrupamentos foi determinada por meio do coeficiente de correlação cofenético (SOKAL; ROHLF, 1962), obtido pelo programa Genes.

## Resultados e Discussão

As matrizes de distância e agrupamento se correlacionaram com um percentual de 97,04% (Tabela 2), o que indica ótima correlação segundo Vaz Patto (2004). O coeficiente de correlação cofenética (CCC) (SOKAL; ROHLF, 1962) obtido no UPGMA foi o máximo, (97,04), em relação aos métodos hierárquicos de Ward (82,74) e vizinho mais próximo (SL) (95,08). Gonçalves et al. (2008), ao trabalhar com quarenta acessos de tomates no banco de germoplasma da UENF, obtiveram CCC maiores no método de agrupamento UPGMA em relação aos métodos de agrupamento SL e Ward. Segundo Mohammad e Prasanna (2003), quanto maior CCC, menor será a distorção provocada ao agrupar os acessos. Portanto, o método



hierárquico UPGMA foi o que melhor explicou a diversidade genética entre os acessos de mamoneira, porque apresentou maior CCC dentre os métodos hierárquicos testados.

O ponto de corte foi traçado, estabelecendo assim a distribuição de sete grupos distintos, sendo eles: **G1**: UFRB11, UFRB50, UFRB13, EBDA MPA 17, UFRB262, Sipeal, Paraguaçu, Nordestina, UFRB227 e UFRB160; **G2**: UFRB14, UFRB15; **G3**: UFRB22, UFRB46, UFRB57, UFRB89, UFRB93, UFRB59, UFRB145, UFRB86, UFRB85, UFRB23, UFRB25, UFRB31, UFRB32, UFRB54, UFRB88, UFRB151; **G4**: UFRB182, UFRB208, UFRB255, UFRB213, UFRB214, UFRB217, UFRB219, UFRB221, UFRB220, UFRB226, UFRB241, UFRB222, UFRB232, UFRB238, UFRB233; **G5**: UFRB242, UFRB254; **G6**: UFRB248 e **G7**: UFRB258, UFRB261, UFRB263, UFRB264, Mirante (Figura 1).

O primeiro grupo (G1) e o grupo sete (G7) ficaram com quatro parentais e um parental respectivamente. A análise de diversidade genética por meio dos marcadores SSR revelou alta dissimilaridade entre o parental Mirante em relação aos demais parentais, corroborando com dados obtidos por Bahia (2008) em dados morfológicos e Cerqueira (2010) com marcadores RAPD. Sendo que as linhagens geneticamente mais próximas dos parentais EBDA MPA 17, Sipeal, Paraguaçu e Nordestina foram: UFRB11, UFRB50, UFRB13, UFRB262, UFRB227 e UFRB160, o que representa aproximadamente 12,8% das linhagens selecionadas, já as linhagens geneticamente mais próximas do parental Mirante, ou seja, que pertencem ao mesmo grupo foram: UFRB258, UFRB261, UFRB263, UFRB264, aproximadamente 8,5% dos selecionados de acordo os caracteres morfo-agronômicos. As demais linhagens estão em uma posição intermediária geneticamente falando em relação a todos os parentais.

Dentre as 47 linhagens avaliadas, as que apresentam maior divergência genética foram: UFRB11, UFRB15, UFRB19, UFRB23, UFRB31, UFRB86, UFRB93, UFRB151, UFRB160, UFRB208, UFRB214, UFRB222, UFRB227, UFRB241, UFRB242, UFRB248, UFRB255, UFRB258, UFRB262 e UFRB264. Essas linhagens serão utilizadas em futuros cruzamentos para que aja um enriquecimento da base genética da mamoneira.

Tabela 2. Coeficiente de correlação cofenético entre as matrizes de distância e agrupamento.

Estatística	Valor
Correlação cofenética (CCC):	0.9704
Graus de liberdade	1324
Valor de t	146.3112
Probabilidade	.0 **
Distorção(%):	1.3748
Estresse(%):	11.7208

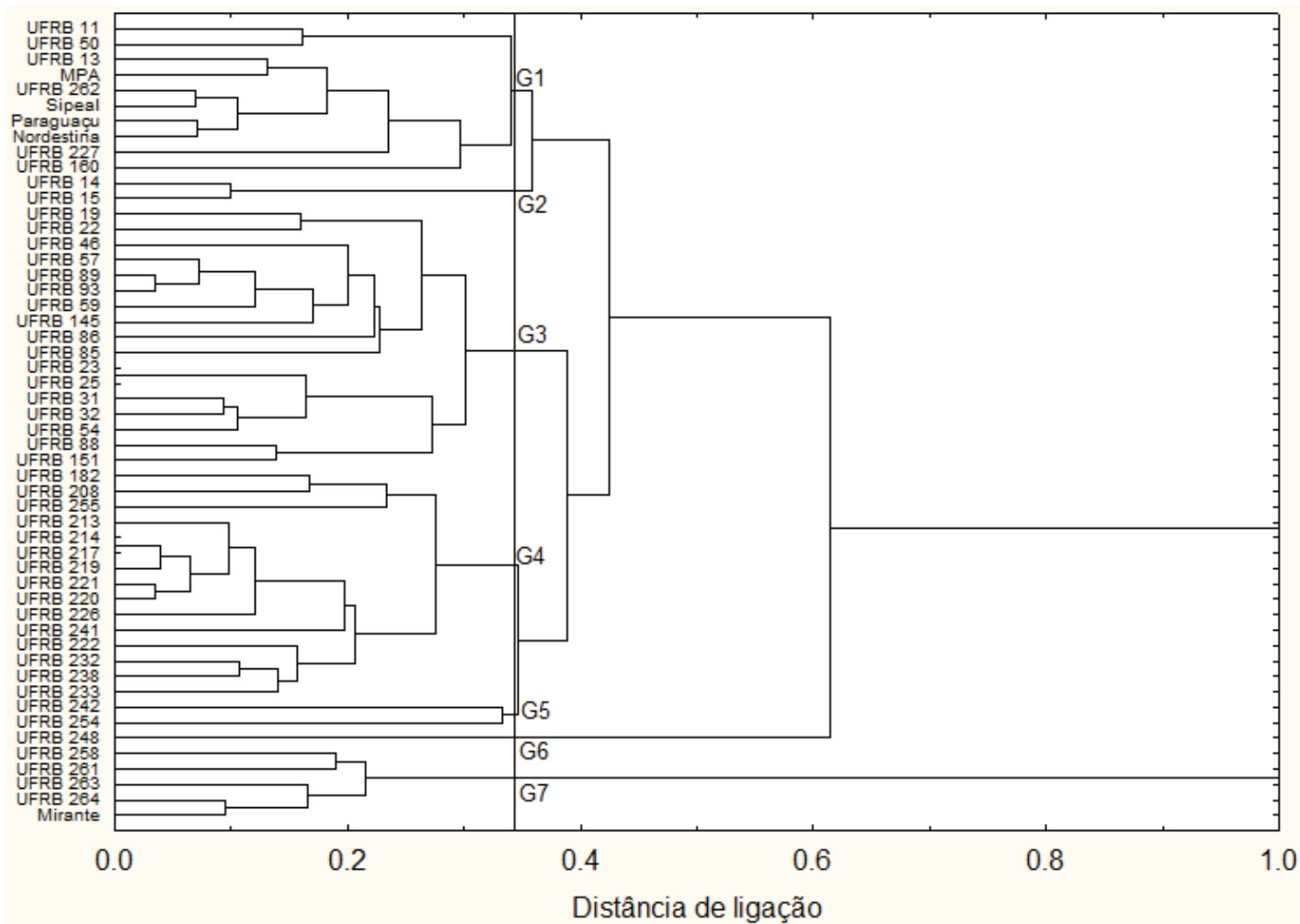


Figura 1. Dendrograma de dissimilaridade genética obtido pelo método UPGMA, com formação de sete grupos distintos pelo método ward.d e coeficiente do pseudot2.

## Conclusão

Existe divergência genética entre as linhagens e seus parentais avaliados, indicando avanços genéticos na maior amplitude de variabilidade genética da população;  
 As linhagens elites encontram-se em elevado grau de homozigose, na geração avançada F6, para a maioria dos locos analisados, permitindo ganhos de seleção e fixação dos genes selecionados;  
 Os marcadores microssatélites foram eficientes para indicar polimorfismo nas linhagens analisadas, com formação de sete grupos.

## Agradecimentos

A ANP (Agência Nacional do Petróleo e Gás Natural e Biocombustíveis) e à Petrobras biocombustível pelo apoio financeiro ao projeto; à Capes (Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior) pela concessão de bolsa de pós-graduação.



## Referências Bibliográficas

- BAHIA, H. F.; SILVA, S. A., FERNANDEZ, L. G., L. C. A. DA S.; M. R. F. C. **Divergência genética entre cinco cultivares de mamoneira.** Pesq. agropec. bras., Brasília, v.43, n.3, p.357-362, 2008.
- BAJAY, M. M. **Desenvolvimento de marcadores microssatélite e caracterização do banco de germoplasma de mamona (*Ricinus communis* L.).** ESALQ-USP. 96 p, São Paulo, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências. Área de Concentração Genética e Melhoramento de Plantas).
- BAJAY, M. M.; ZUCCHI, M. I.; KIIHL, T. A. M.; BATISTA, C. E. A.; MONTEIRO, M.; PINHEIRO, J. B. Development of a novel set of microsatellite markers for castor bean, *Ricinus communis* (Euphorbiaceae). **American Journal of Botany**: e1–e3, 2011.
- BELTRÃO, N. E. de M.; CARDOSO, G. D. **Informações sobre os sistemas de produção utilizados na ricinocultura na região nordeste, em especial o semi-árido e outros aspectos ligados a sua cadeia.** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004. 5 p. (Embrapa Algodão. Comunicado Técnico, 213).
- BRASILEIRO, H. S. **Seleção de linhagens elites de mamoneira por meio de marcadores microssatélites e caracteres teor de óleo e peso de sementes por planta.** Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. Cruz das Almas, BA, 2014. 76f.: Il.
- CERQUEIRA, L. S. **Variabilidade genética e teor de óleo em mamoneira visando ao melhoramento para região de baixa altitude.** Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. Cruz das Almas, BA, 2008. 57f.: il: tab.; graf.
- CRUZ, C.D. Programa Genes - Aplicativo computacional em genética e estatística. 2014. Disponível em: [www.ufv.br/dbq/genes/genes.htm](http://www.ufv.br/dbq/genes/genes.htm)
- DOYLE, J. J. E DOYLE, J. L. 1987. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues. **Phytochem. Bull. Bot. Soc. Amer.** 19: 11-15.
- FERREIRA, M.; GATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** Brasília: Embrapa-CENARGEN. 3 ed. P 220. 1998
- GONÇALVES, L.S.A.; RODRIGUES, R.; AMARAL JÚNIOR, A. T.; KARASAWA, M.; SUDRÉ, C.P. Comparison of multivariate statistical algorithms to cluster tomato heirloom accessions. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v.7, n.4, p.1289-1297, 2008.
- GOVAERTS, R.; FRODIN, D. G.; RADCLIFFE-SMITH, A. **World checklist of Euphorbiaceae (and Pandaceae).** v.2. Euphorbiaceae: Croton to Excoecariopsis. Royal Botanic Gardens, Kew, 2000.
- JEONG, G. T.; PARK, D. H. Optimization of biodiesel production from castor oil using response surface methodology. **Appl Biochem Biotechnol**,v. 156,p.431-441, 2009.
- MACHADO, Edna Lobo ; SILVA, Simone Alves. Desenho e validação de iniciadores microssatélites SSR para mamoneira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** (Online), v. 28, p. 1457-1463, 2013.
- MOHAMMAD, S.A.; PRASANNA, B.M. Analysis of genetic diversity in crop plants-Salient statistical tools and considerations. **Crop Science**, Madison, v.43, p.1235-1248, 2003.
- PALMIERI, D. A.; MAIA, L. C. **Marcadores microssatélite para estudos genéticos em mamona (*Ricinus communis* L.) e pinhão-mansó (*Jatropha curcas* L.).** In:

Congresso Internacional de Agroenergia e Biocombustíveis, Anais. Teresina, PI. p. 138-138, 2007.

POWELL, W.; MACHRAY, G.; PROVAN, J. Polymorphism **revealed by simple sequence repeats**. Trends Plant Sci, 1: 215–222, 1996.

SANTOS, R.F.; KOURI, J.; BARROS, M.A.L.; MARQUES, F.M.; FIRMINO, P.T.; REQUIÃO, L.E.G. Aspectos Econômicos do Agronegócio da Mamona. In: AZEVEDO, D.M.P. ; BELTRÃO, N.E.M. (Ed.). **O Agronegócio da mamona no Brasil**. 2.ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p.22-41,2007.

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification**. San Francisco: W.H. Freeman, 1973. 573p.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, v.11 p.33-40. 1962.

STATSOFT, Inc. (2005). **STATISTICA (data analysis software system)**, version7.1. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).

R Development Core Team. **R' a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing**. Vienna, Áustria. 2004. Disponível em <http://www.rproject.org>.

VAZ PATTO, M. C; SATOVIC, Z.; PÊGO S.; FEVEREIRO P. Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germoplasm using microsatellite markers. **Euphytica** 137:63-67, 2004.

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *DIOSCOREA* SPP UTILIZANDO  
MARCADORES ISSR**

## DIVERSIDADE GENÉTICA DE *DIOSCOREA* SPP UTILIZANDO MARCADORES ISSR<sup>1</sup>

Elaine Costa Cerqueira-Pereira<sup>1</sup>; Camila Nogueira Pestana-Caldas<sup>2</sup>; Ricardo Franco Cunha Moreira<sup>3</sup>, Isabella Santos Oliveira<sup>4</sup>, Helison Santos Brasileiro<sup>5</sup>.

<sup>1</sup>Pesquisadora Bolsista CAPES PNPd, ellainecerqueira@ig.com.br; <sup>2</sup> Aluna do curso de Doutorado em Biotecnologia (UEFS), bolsista CAPES, e-mail: cammilabio@yahoo.com.br; <sup>3</sup> Professor Doutor do centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas (UFRB), Orientador, ricardofcm@ufrb.edu.br; <sup>4</sup>Aluna de Graduação em Engenharia florestal (UFRB), Bolsista PIBIC (FAPESB), engenheira\_isabella@hotmail.com; <sup>5</sup>Aluno do curso de Doutorado em Ciências Agrárias (UFRB), agr.brasileiro81@gmail.com.

### Introdução

A cultura do inhame (*Dioscorea* spp) apresenta importância social e econômica significativa para a Região Nordeste do Brasil, principalmente para os estados da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia e Maranhão, por constituir um bom negócio agrícola em função do alto consumo pela população. As tubéras de inhame possuem excelente qualidade nutritiva e energética, sendo ricas em vitaminas do complexo B (tiamina, riboflavina, niacina, adermanina), carboidratos (amido principalmente), minerais e propriedades medicinais, além de apresentarem baixos teores de gorduras. No Nordeste, constitui alternativa agrícola potencial para ampliar o consumo no mercado interno e atender a demanda do mercado externo, bem como fonte de renda para os pequenos e médios agricultores familiares (Santos et al. 2007).

O gênero *Dioscorea* é o mais amplo da família Dioscoreaceae, apresentando cerca de 600 espécies distribuídas, sobretudo, nos trópicos, com grande importância na alimentação, principalmente na África Ocidental, na Sudeste Asiático, no Caribe e em alguns países da América do Sul. No Brasil, algumas espécies de inhame (*Dioscorea* spp), juntamente com a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), têm uma profunda importância na agricultura de subsistência, sendo utilizadas basicamente como fonte de carboidrato para alimentação humana. Pouco se conhece sobre a diversidade e estrutura genética dessas espécies, como evoluíram nos últimos anos, sobretudo pela escassez de avaliações moleculares (Siqueira, 2011).

Diferentes técnicas de biologia molecular além dos marcadores morfológicos estão disponíveis para a análise da diversidade genética. Entre essas técnicas o marcador molecular ISSR apresenta-se como um método biotecnológico eficiente na caracterização da diversidade genética de *Dioscorea* spp gerando um grande número de fragmentos polimórficos e discriminantes e identificando variações genéticas intra e interespecíficas (MATTIONI et al., 2002).

O objetivo do trabalho foi caracterizar por meio de marcadores ISSR acessos de inhame do Recôncavo Baiano de forma a estudar a diversidade genética entre os acessos avaliados quanto aos caracteres moleculares e estabelecer grupos divergentes através da estatística molecular.

---

<sup>1</sup>Pesquisa Institucional desenvolvida na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, pertencente ao Grupo de Pesquisa Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento de Plantas (NBIO).

## Metodologia

O estudo foi realizado no Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento de Plantas (NBIO) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) no município de Cruz das Almas - Bahia nas coordenadas geográficas 40°39'S e 39°06'23"W, a 220 m de altitude.

Foram avaliados e caracterizados 16 acessos de *Dioscorea* spp. O material vegetal para extração de DNA genômico foram provenientes das localidades de produção comercial da região do Recôncavo da Bahia nas cidades de São Félix, Maragogipe, Cruz das Almas e São Felipe.

Para a caracterização e avaliação dos acessos, foram analisados 15 marcadores moleculares ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*). Para as análises moleculares, o DNA foi extraído das plantas conforme o protocolo de Sharma et al. (2008) com modificações.

As reações de quantificação do DNA foram realizadas em géis de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio (1,0 mg/mL). O tampão utilizado foi o TBE 5x e o tempo de corrida foi de 60 minutos a 90V. O resultado foi avaliado em um fotodocumentador.

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 20 (µL?) com a seguinte mistura de soluções 0,2 µl de Taq-Polimerase (5U/µL- Invitogen); 2 µl de Tampão (10x); 0,6 µl MgCl<sub>2</sub> (1,5mM); 0,8 µl de dNTP (0,1mM); 11 µl de H<sub>2</sub>O Milli-Q e 3 µl de DNA (5ng/µl) em cada tubo).

As amplificações foram realizadas de acordo com o protocolo proposto por Williams et al. (1990) e as amostras amplificadas em termociclador Applied Biosystems ( Veriti 96 well Thermal cycle), empregando-se um programa com um ciclo inicial de 94°C por 1 minuto e 40 ciclos de: 94°C por 30 segundos, 35°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, seguida de uma extensão final de 7 minutos a 72°C. Os produtos resultantes das amplificações foram separadas por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) corado com brometo de etídeo (0,5 mg/mL<sup>-1</sup>) em tampão TBE 1 X (89 mM Tris-borato, 2 mM EDTA) por aproximadamente 1 hora e 30 minutos a 100V. Como padrão de peso molecular foi utilizado o *ladder* 1 Kb (Promega). Os fragmentos foram visualizado e fotodocumentado por meio do Sistema Digital Locus Biotecnologia (Molecular Imagine).

A matriz de dissimilaridade genética foi obtida através do programa Genes (2008). Para medida de distância molecular utilizou-se Jaccard. Agrupamentos hierárquicos das análises a partir das matrizes de distância genética foram obtidos pelos métodos de UPGMA - *Unweighted Pair Group Methodwith ArithmeticMean*. O dendrograma foi obtido através do programa Statistica7.0 (Statsoft, 2007).

## Resultados e Discussão

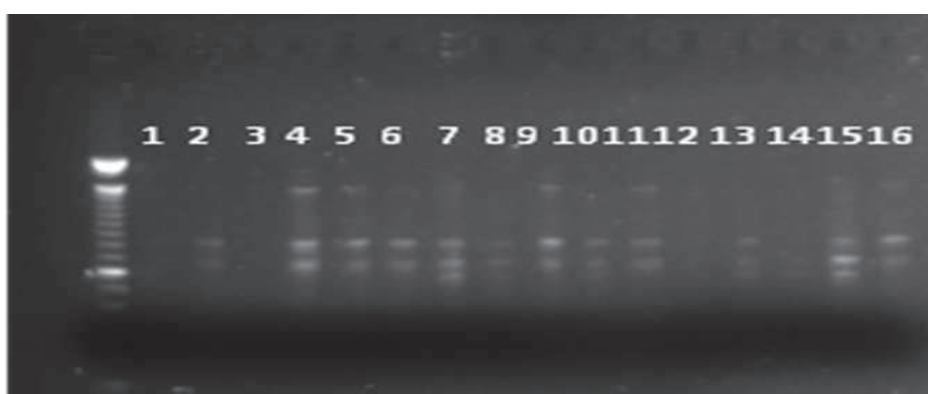
Dos 20 iniciadores arbitrários testados quanto ao padrão de amplificação das amostras, 15 foram considerados satisfatórios, sendo selecionados para a genotipagem em 16 acessos de inhame (Figura 1).

Número	Primer	Sequência 5' ---- 3'	AF (pb)
839	DIGA3'C	GAGAGAGAGAGAGAGAC	500-1400
840	DIGA3'RC	GAGAGAGAGAGAGAGARC	400-1350
842	DIGA3'YC	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	600-1000
843	DIGA5'C	CGAGAGAGAGAGAGAGA	490-1200
845	DIGA5'CY	CYGAGAGAGAGAGAGAGA	400-800
851	DIGT3'YG	GTGTGTGTGTGTGTGTYG	400-900
852	DIGT5'A	AGTGTGTGTGTGTGTGTGT	600-1300
853	DIGT5'C	CGTGTGTGTGTGTGTGTGT	600-1300
855	DIGT5'CY	CYGTGTGTGTGTGTGTGTGT	500-1400
859	TriCAC5'CR	CRCACCACCACCACCAC	500-1300
860	TriCAC5'CY	CYCACCACCACCACCAC	400-1500
861	TriCAG	CAGCAGCAGCAGCAG	500-1400
863	TriCAG3'YC	CAGCAGCAGCAGCAGYC	550-1450
885	TriACC3'RC	ACCACCACCACCACCRC	490-1200
887	TriAGA3'RC	AGAAGAAGAAGAAGARC	200-500

AF: amplitude de fragmentos, pb: pares de bases; R = A ou G; Y = T ou C.

**Figura 1.** Iniciadores ISSR utilizados na genotipagem em 16 acessos de *Dioscorea* spp. Cruz das Almas, Bahia, 2015.

Os fragmentos amplificados variaram de 200 a 1500 pb. As bandas polimórficas mais nítidas foram utilizadas nesse estudo. As Figuras 2 e 3 ilustram o padrão eletroforético obtido com os iniciadores TriCAG e DIGT5'C.



**Figura 2.** Padrão de amplificação do DNA genômico de 16 acessos de *Dioscorea* spp. obtido por meio do iniciador ISSR TriCAG.



**Figura 3.** Padrão de amplificação do DNA genômico de 16 acessos de *Dioscorea* spp obtido por meio do iniciador ISSR DIGT5'C.

Foram gerados 91 fragmentos sendo que 82 foram polimórficos (90,1%). Em média, cada iniciador produziu 5,7 fragmentos, dos quais 5,1 apresentaram polimorfismo (Figura 4). O maior número de bandas polimórficas foi detectado pelos iniciadores DIGA3'C, DIGA3'RC, DIGA5'C, DIGT3'YG, DIGT5'CY, TriCAC5'CY, com número de fragmentos entre 6 e 7 (Figura 4). Zhou et al. (2008) estudando marcadores ISSR em *Dioscorea opposita* Thunb verificaram a formação total de 65 fragmentos amplificados por sete iniciadores, com uma média de 9,29 bandas por primer e a tamanho da banda variou de 50 pb para 850 pb e foram encontrados 54 bandas polimórficas. Nascimento (2013) verificou em *Dioscorea trifida* a formação de 137 bandas ou produtos de amplificação com tamanho variando de 100 a 1300 pb, em um total de 8,56 bandas/loco. O número de bandas polimórficas foi 100 com média de 6,25 bandas polimórficas por loco sendo o nível de polimorfismo foi de 75,8%.



Iniciador	Nº de bandas		Polimorfismo (%)
	Total	Polimórfica	
DIGA3'C	6	6	100
DIGA3'RC	6	6	100
DIGA3'YC	7	5	71,4
DIGA5'C	6	6	100
DIGA5'CY	5	5	100
DIGT3'YG	6	6	100
DIGT5'A	6	5	83,3
DIGT5'C	6	5	83,3
DIGT5'CY	6	6	100
TriCAC5'CR	5	5	100
TriCAC5'CY	8	7	83,3
TriCAG	6	5	83,5
TriCAG3'YC	5	5	100
TriACC3'RC	4	1	83,3
TriACC3'RC	5	5	100
TriAGA3'RC	4	4	100
<b>Total</b>	<b>91</b>	<b>82</b>	
<b>Média</b>	<b>5,7</b>	<b>5,1</b>	<b>93</b>

**Figura 4.** Iniciador ISSR, total de marcadores detectados e número de marcadores polimórficos. Cruz das Almas, Bahia, 2015.

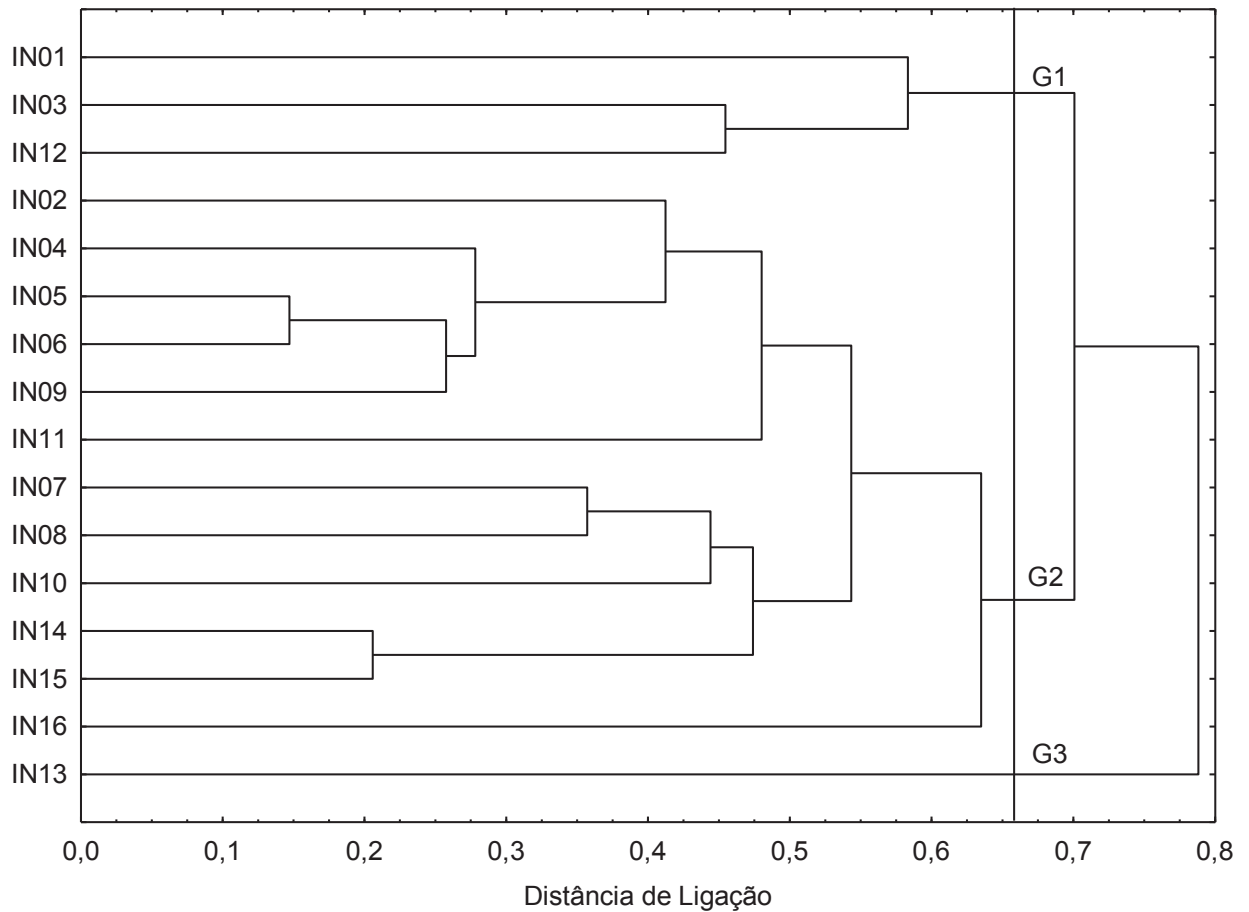
A análise de divergência genética gerou uma matriz de distância genética (Figura 5), mostrando as relações entre os 16 acessos de *Dioscorea* spp. Nessa matriz, verificou-se que os coeficientes de dissimilaridades variaram de 0,1471 entre os acessos IN05 e IN06 até uma distância máxima de 1,00, entre o acesso IN03 e IN13, evidenciando a existência de variabilidade genética entre as plantas.

Acessos	IN01	IN02	IN03	IN04	IN05	IN06	IN07	IN08	IN09	IN10	IN11	IN12	IN13	IN14	IN15
IN02	0.6667														
IN03	0.5000	0.6207													
IN04	0.7692	0.4048	0.6667												
IN05	0.7143	0.3611	0.6296	0.2250											
IN06	0.7000	0.3429	0.6429	0.3000	0.1471										
IN07	0.6842	0.5000	0.6429	0.4419	0.4634	0.3846									
IN08	0.6316	0.5938	0.6500	0.5366	0.4688	0.4516	0.3571								
IN09	0.6818	0.5405	0.5800	0.3095	0.2121	0.3030	0.4286	0.4375							
IN10	0.5000	0.6539	0.7059	0.5807	0.5385	0.5909	0.4762	0.4118	0.6000						
IN11	0.5714	0.5641	0.7333	0.5227	0.4750	0.3684	0.5122	0.5758	0.4706	0.5238					
IN12	0.6667	0.8000	0.4546	0.8529	0.8000	0.7619	0.7826	0.7333	0.7826	0.6875	0.7500				
IN13	0.8889	0.8182	1.0000	0.8500	0.8235	0.8462	0.6667	0.7000	0.8421	0.6000	0.8182	0.8750			
IN14	0.7059	0.6923	0.6833	0.6327	0.6047	0.6154	0.5294	0.5333	0.5714	0.5200	0.6579	0.7727	0.7500		
IN15	0.6250	0.6250	0.6071	0.5577	0.5600	0.4889	0.4048	0.4333	0.5000	0.4231	0.5111	0.7778	0.6429	0.2059	
IN16	0.8947	0.7073	0.7037	0.6383	0.6522	0.6098	0.6585	0.7576	0.5676	0.6786	0.5000	0.8333	0.7000	0.6585	0.5556

**Figura 5.** Matriz de distância genética entre acessos de *Dioscorea* spp estimados a partir de 15 marcadores ISSR. Cruz das Almas - Bahia, 2015.

O dendrograma disposto na Figura 6, obtido a partir da dissimilaridade dos fragmentos gerados nas reações de amplificação possibilitou a separação dos acessos em 3 grupos mostrando que há dissimilaridade genética entre os mesmos. A análise mostra que os acessos IN01, IN03 e o IN12 formam um grupo (G1), o acesso IN13 forma o grupo G3, enquanto que os demais acessos se distribuem no grupo G2. Nascimento (2013) testando 53 acessos de

*Dioscorea trifida* L. com marcadores ISSR observou a formação de quatro grupos distintos. Ele afirma que este marcador é capaz de identificar uma grande variação genética intra e interespecífica, sendo cada vez mais utilizada em estudos de diversidade genética.



**Figura 6.** Dendrograma obtido pelo método UPGMA em 16 acessos de inhame. Cruz das Almas, Bahia, 2015.

### Conclusões

Existe variabilidade genética entre os acessos de *Dioscorea* spp do Recôncavo baiano, demonstrando potencial dos acessos para o programa de melhoramento genético da espécie.

**Palavras-Chave:** variabilidade genética, inhame, Recôncavo Baiano

## **Agradecimentos**

Ao Programa Nacional de Pós-doutorado - PNPd/CAPES pela bolsa concedida e apoio financeiro a realização do trabalho.

## **Referências Bibliográficas**

CRUZ, C. D. **Programa Genes (versão Windows): aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, 2008.

MATTIONI, C.; CASASOLI, M.; GONZALEZ, M. Comparison of ISSR and RAPD markers to characterize three Chilean *Nothofagus* species. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 104, p. 1064 – 1070, 2002.

NASCIMENTO, W. F. **Diversidade de inhame (*Dioscorea trifida* L.) avaliada por marcadores morfológicos, SSR e ISSR**. São Paulo, 2013,113p. Tese de doutorado-Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

SANTOS, E. S. dos; CAZÉ FILHO, J.; LACERDA, J. T. DE; CARVALHO, R. A. Inhame (*Dioscorea* sp.) Tecnologias de Produção e Preservação Ambiental. **Tecnol. & Ciên. Agropec.**, João Pessoa, v.1, n.1, p.31-36, 2007.

SIQUEIRA, M. V. B. M. **Caracterização da diversidade genética de inhame (*Dioscorea alata*) utilizando marcadores microssatélites**. São Paulo, 2011,166p. Tese de doutorado-Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

ZHOU, Y.; ZHOU, CHUNE.; YAO, H.; LIU, Y.; TU, R. Application of ISSR markers in detection of genetic variation among Chinese yam (*Dioscorea opposita* Thunb) cultivars. **Life Science Journal**, v. 5, n.4, p.xxx, 2008.

**EFFECTOS DE *Trichoderma* spp. EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE HONGOS FITOPATÓGENOS DE ALUBIA (*Phaseolus vulgaris* L.)**

## **EFFECTOS DE *Trichoderma* spp. EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE HONGOS FITOPATÓGENOS DE ALUBIA (*Phaseolus vulgaris* L.).**

Sara Mayo<sup>1</sup>; Óscar González<sup>1</sup>, Álvaro Rodríguez<sup>1</sup>; Paulo H. da Silva<sup>1</sup>; Alicia Lorenzana<sup>1</sup>; M<sup>a</sup> Piedad Campelo<sup>1</sup>; Santiago Gutiérrez<sup>2</sup>, Pedro A. Casquero<sup>1\*</sup>

1. Grupo de Ingeniería y Agricultura Sostenible. Instituto de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Biodiversidad. Universidad de León, Av. Portugal 41, 24071 León, España.

2. Área de Microbiología. Escuela Superior y Técnica de Ingeniería Agrícola, Universidad de León, Campus de Ponferrada, Av. Astorga s/n, 24401 Ponferrada, España.

E-mail: pedro-casquero@unileon.es (P.A. Casquero)

### **1. INTRODUCCIÓN.**

#### **1.1. El cultivo de la alubia.**

La alubia o judía grano (*Phaseolus vulgaris* L.) es una de las leguminosas de grano, dedicadas al consumo humano, más importantes, ya que su cultivo se extiende por todos los continentes y por ser una gran fuente de proteínas, vitaminas y minerales. En 2013 se obtuvo una producción de 22.806.139,30 t de alubias. Los principales países productores, en ese año fueron Myanmar, India y Brasil, (FAO, 2015). En lo que se refiere a España, en 2014 la producción obtenida fue de 13.400 t. (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2015).

#### **1.2. Incidencia de los hongos en el cultivo de la alubia.**

El cultivo de la alubia se ve afectado por numerosas micosis (APS, 2015; Index Fungorum, 2015), siendo las más frecuentes en la provincia de León, la fusariosis, las podredumbres blanca y gris y la rhizoctoniosis.

Bajo la denominación de fusariosis se distinguen dos patologías diferentes, la radicular y la vascular. La fusariosis radicular está causada por *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. (Teleomorfo: *Haematonectria haematococca* (Berk. & Broome) Samuels & Rossman). Las razas patógenas en alubia constituyen la forma especial de *F. s. f. sp. phaseoli* (Burkh.) W.C. Snyder & H.N. Hanser presente en todas las regiones productoras de esta leguminosa (Burke y Hall, 2005). El primer síntoma que se observa es la presencia de estrías longitudinales rojas en el cuello de la planta y en la raíz que desembocan en una necrosis general. Posteriormente, las raíces se necrosan y mueren, aunque las plantas pueden sobrevivir por emisión de raíces adventicias a una altura superior a la de la lesión. Los síntomas aéreos son el descenso del vigor y el amarilleamiento general. Esta especie produce importantes pérdidas en el cultivo de judía y también en otros como espárrago, cebolla, patata y otras solanáceas, cucurbitáceas y plantas ornamentales, comportándose en ocasiones como un hongo oportunista en plantas cuyo sistema radicular se encuentre debilitado.

La fusariosis vascular está causada por *Fusarium oxysporum* Schlecht. y los aislados patogénicos en alubia constituyen la forma especial de *F. o. f. sp. phaseoli* J.B. Kendr. & W.C. Snyder. Los síntomas de esta enfermedad son

debidos a la invasión del hongo en los haces vasculares de la planta, lo que hace que la planta libere toxinas y se marchite. Para que se produzca es necesario que exista una vía de acceso como pueden ser heridas o un debilitamiento del sistema radicular originado por otros factores como un exceso de riego. En el interior de la planta el hongo se desarrolla colapsando los haces vasculares que adquieren tonos marrones. Se origina un déficit hídrico y nutritivo en la planta que provoca el decaimiento y la muerte de ésta.

Desde el año 2002, en el Laboratorio de Diagnóstico de Plagas y Enfermedades Vegetales de la Escuela Superior y Técnica de Ingeniería Agraria (E.S.T.I.A.) de la Universidad de León, se ha detectado, de forma relativamente frecuente, la aparición de ataques de podredumbre blanca (Campelo, 2007). Esta enfermedad está causada por la especie *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, hongo polífago ampliamente distribuido. Los daños tienden a ser esporádicos, sin embargo, cuando la enfermedad se generaliza, produce grandes pérdidas en los cultivos. Al principio se observan pequeñas manchas de aspecto húmedo y color claro que aumentan de tamaño rápidamente y, si las condiciones son húmedas, se observa el crecimiento de un tapiz micelial blanco algodonoso sobre las vainas y sobre la superficie y en el interior de los tallos y los pecíolos. Posteriormente, se desarrollan sobre los tallos y vainas y en el interior de los tallos ya secos los esclerocios, estructuras de consistencia muy dura, color negro y que pueden alcanzar hasta 1 cm de diámetro. Estos esclerocios constituyen el principal medio de supervivencia del hongo en el suelo, pudiendo permanecer viable hasta seis-ocho años. Cuando germinan liberan multitud de esporas que son dispersadas por el viento y aterrizan sobre la plantas. Para que se desarrolle la enfermedad estas esporas necesitan dos condiciones: la primera es la presencia de agua durante 16-24 horas y un intervalo de temperatura entre 0 y 25 °C, con un óptimo a 15-20 °C, la segunda es la presencia de tejidos heridos, muertos o senescentes que sirvan como base nutritiva. De aquí que el momento del cultivo en el que se produce la caída de pétalos sea idóneo para que se inicie la infección.

También se ha detectado, en dicho laboratorio de diagnóstico, *Botrytis cinerea* Pers. (Teleomorfo: *Botrytinia fuckeliana* (de Bay) Whetzel) causante de la podredumbre gris. Se trata de una especie polífaga, sin especialización descrita, ampliamente distribuida y cuya infección está muy influida por las condiciones climáticas. En el campo la enfermedad es más frecuente en floración con alta humedad relativa y temperaturas de 17-23 °C. Se ve favorecida también en el caso de cosechas densas cuyos cultivares posean un hábito de crecimiento compacto o con flores que persistan en la vaina después de secarse. En plántulas puede causar la muerte en pre y post-emergencia a partir del ataque a cualquier órgano de la plántula. La infección puede iniciarse directamente, aunque, con frecuencia, se produce a partir de tejidos muertos o senescentes o también a partir de heridas. Una vez establecido, el hongo se extiende fácilmente por los tejidos adyacentes a la zona, afectando a toda la parte aérea. Se presentan lesiones pardas en el tallo que se van extendiendo por los tejidos. Sobre las hojas se desarrollan lesiones pardas y húmedas; con frecuencia en las lesiones se observa el micelio gris del hongo, de ahí el nombre común que recibe esta enfermedad. Los daños pueden ser muy severos durante la formación de las vainas.

El responsable de la rhizoctoniosis se trata de otro hongo denominado *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn. (Teleomorfo: *Thanatephorus cucumeris* (A.B. Frank) Donk). Su incidencia en León durante las primeras fases de cultivo, junto con especies de género *Pythium*, ha sido descrita por Boto y Reinoso (1996). La infección de la planta se produce a través de heridas o por un recubrimiento de un órgano por el micelio, el cual rasga la cutícula y penetra hasta la epidermis. Una vez que la infección ha tenido lugar el hongo se ramifica rápidamente alcanzando las células de los tejidos adyacentes. Es un patógeno más agresivo con temperaturas entre 15 y 18 °C y con el suelo húmedo, acentuándose aún más en la quincena posterior a la siembra. Cuando la temperatura supera los 21 °C las lesiones son menores, al igual que con temperaturas bajas. La enfermedad comienza con la aparición de manchas rojizas en los cotiledones, apareciendo posteriormente pequeñas lesiones marrón-rojizas, alargadas y deprimidas en el hipocotilo y en las raíces. Al aumentar de tamaño estas lesiones se transforman en chancros rojizos, de aspecto áspero y seco, que pueden llegar a rodear el joven tallo. La supervivencia del hongo *R. solani* entre campañas de cultivo se realiza como esclerocios o micelio de forma indefinida, permaneciendo en restos vegetales o en plantas perennes y siendo diseminado, fundamentalmente, por el agua y por los aperos.

A nivel mundial se describe otras micosis, de las cuales no se tiene constancia de importancia en los campos leoneses. Se tratan de alternariosis (*Alternaria alternata* (Fr.) Keissl.), antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Briosi & Cavara), ascochyta (*Ascochyta boltshauseri* Sacc.), macrofomina (*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid), mal del esclerocio (*Sclerotium rolfsii* Sacc.), mancha angular (*Phaeosiriopsis griseola* (Sacc.) Ferraris), mildiu veloso (*Phytophthora* sp Bary), oídio (*Oidium balsamii* Mont.) phoma (*Phoma exigua* Sacc.), podredumbre rosa de la vaina (*Trichothecium roseum* (Pers.) Link.) y roya (*Uromyces appendiculatus* F. Strauss.).

### **1.3. Fungicidas en el control de hongos en el cultivo de la alubia.**

Los fungicidas aplicados sobre la semilla o directamente al suelo pueden ser efectivos sobre los hongos que afectan al cultivo durante la germinación o en un periodo corto después de la misma pues reducen su incidencia y mejoran la emergencia de las plantas (Valenciano *et al.*, 2004). Sin embargo, las aplicaciones con fungicidas dirigidas a evitar los daños producidos por hongos que causan podredumbres radicales y marchitez suelen ser ineficaces y usualmente impracticables debido al gran volumen de suelo al que deberían dirigirse. Con el fin de garantizar una seguridad alimentaria y una producción sostenible a largo plazo se ha reducido el número de productos fitosanitarios de síntesis química autorizados. Por ello se propone dar prioridad a los métodos no químicos.

### **1.4. Agente biológico de control: *Trichoderma* spp.**

Un agente de control biológico se puede definir como un organismo distinto al hombre con capacidad para reducir la población del agente causante de la enfermedad o evitar sus efectos (Hjeljord y Tronsme, 1998). Existen agentes



biológicos formados por bacterias, como *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Bacillus*, y por hongos, como *Gliocladium*, *Trichoderma*, *Ampelomyces*, *Candida* y *Coniothyrium*.

*Trichoderma* (Teleomorfo *Hypocrea*) es un género de hongos asexuales que se encuentra en los suelos. Es un invasor oportunista secundario, de rápido crecimiento, que produce gran cantidad de esporas, produce enzimas capaces de degradar la pared celular (celulasas, quitinasas, glucanasas,...) y es productor de sustancias antibióticas con lo que es un buen agente biológico.

#### **1.4.1. Interacción *Trichoderma* – patógeno.**

El principal mecanismo de biocontrol usado por *Trichoderma* en la confrontación directa con hongos patógenos es el micoparasitismo (Howell, 2003) y la antibiosis (Sivasithamparam y Ghisalberti, 1998). La competencia por nutrientes con el patógeno también es otro de los mecanismos empleados por *Trichoderma* para desplazar al patógeno.

El micoparasitismo consiste en el reconocimiento del hongo, atacarlo y penetrar en él con el fin de conseguir su muerte. Durante este proceso *Trichoderma* secreta enzimas que hidrolizan la pared celular del patógeno liberando oligómeros de ésta (Woo *et al.*, 2006).

*Trichoderma* también produce una gran cantidad de metabolitos secundarios con actividad biológica. Así como antibióticos de producción natural y que podrían inhibir el crecimiento microbiano (Sivasithamparam y Ghisalberti, 1998).

La competencia con el patógeno se establecería por nutrientes, oxígeno, espacio físico, luz,... (Paulitz, 1990). La omnipresencia de *Trichoderma* en suelos naturales y agrícolas de todo el mundo es una prueba de que es un excelente competidor por el espacio y por los recursos nutritivos. Además, muchas especies del género *Trichoderma* muestran gran versatilidad metabólica que les permite crecer utilizando un amplio abanico de fuentes de nitrógeno y carbono. Por otra parte la capacidad de colonizar la rizosfera es un punto clave en este proceso ya que un agente de control biológico que no sea capaz de crecer en la rizosfera no podrá competir por el espacio y los nutrientes (Howell, 2003).

#### **1.4.2. Interacción *Trichoderma* – planta.**

Muchas especies de *Trichoderma* podrían colonizar la superficie de la raíz y causar cambios sustanciales en el metabolismo de la planta (Harman *et al.*, 2004). La interacción física entre *Trichoderma* y la planta se limita a las primeras capas de células de la epidermis y de la corteza de la raíz (Yedidia *et al.*, 1999). Dicha relación sería de simbiosis, mediante la cual el hongo ocupa el nicho nutricional, protegiendo así a la planta de enfermedades.

*Trichoderma* activa la expresión de los genes involucrados en la respuesta de la defensa y promueve el crecimiento de la planta, del sistema radicular y la disponibilidad nutricional (Harman *et al.*, 2004). La planta colonizada por éste reduce la enfermedad causada por uno o más patógenos, bien cuando se inocula

el agente de biocontrol en distintos tiempos o bien en lugares diferentes. Durante la interacción de la planta y *Trichoderma* diversas clases de metabolitos podrían inducir a la resistencia. También hay otros metabolitos secundarios que actúan como desencadenantes de los mecanismos de defensa de la planta frente al patógeno.

*Trichoderma* produce ácidos orgánicos, como ácidos cítrico o fumárico que reducen el pH del suelo y permiten la solubilización de fosfatos, micronutrientes y cationes como hierro, manganeso y magnesio (Harman *et al.*, 2004). Considerando que los nutrientes, en particular el fósforo, se podrían incrementar su disponibilidad se favorecería así el crecimiento de la planta.

Las interacciones de *Trichoderma* – planta – patógeno se pueden ver resumidas en la Figura 1.

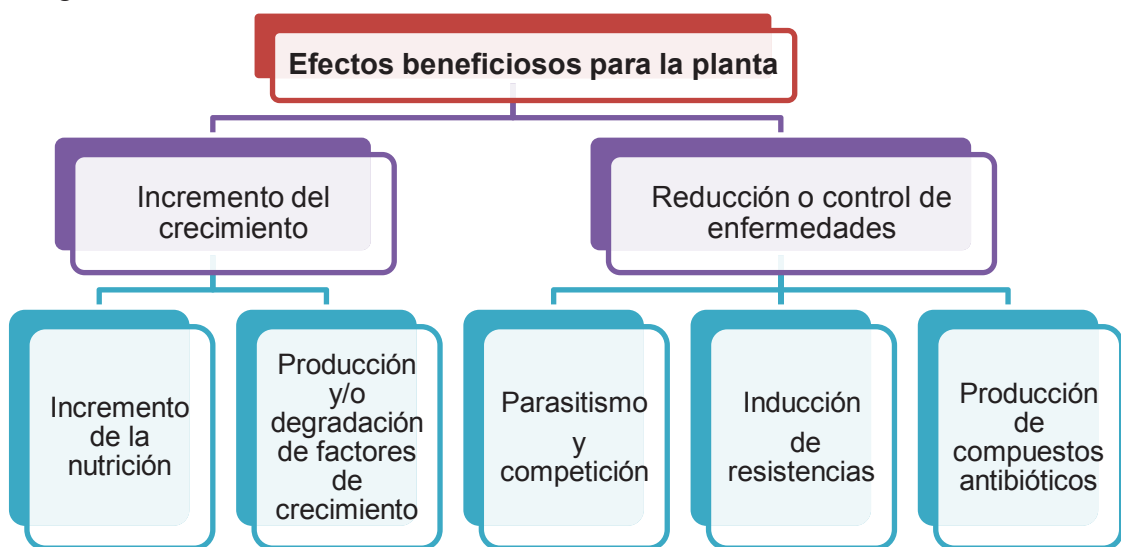


Figura 1: Interacción entre *Trichoderma* – planta – patógeno.

El objetivo de este trabajo fue comprobar la capacidad de biocontrol *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma* frente a los fitopatógenos *R. solani*, *S. sclerotiorum*, *B. cinerea* y *F. oxysporum*.

## 2. MÉTODOS.

Los aislamientos de patógenos empleados en los ensayos proceden de la colección de patógenos del Laboratorio de diagnóstico de Plagas y Enfermedades de la Escuela Superior y Técnica de Ingeniería Agraria (E.S.T.I.A.) de la Universidad de León y fueron *R. solani*, *S. sclerotiorum*, *B. cinerea* y *F. oxysporum*. Los 60 aislamientos de *Trichoderma* spp. empleados en estos ensayos fueron aislados en la zona de producción de la Indicación Geográfica Protegida I.G.P. de la “Alubia de La Bañeza – León” (Orden A.P.A/289/2006; Orden A.Y.G./1254/2005), sin ningún tipo de manipulación genética.

### 2.1. Ensayo mediante el uso de membranas.

El objetivo de estos ensayos fue evaluar el porcentaje de inhibición que los compuestos y/o enzimas líticas de *Trichoderma* spp. secretados al medio de

cultivo ejercen sobre el crecimiento de los diferentes hongos patógenos, seleccionando aquellos aislamientos de *Trichoderma* mostraron un mayor porcentaje de inhibición de patógenos obtenido a los 3 días de crecimiento de los patógenos.

En el ensayo, se emplearon placas de Petri de 90 mm de diámetro con medio patata-dextros-agar (PDA), cubriendo toda la superficie del medio con una membrana de celofán. Sobre ésta se sembraron discos de micelio de 6 mm de diámetro de las diferentes cepas de *Trichoderma* spp., incubándose a 22 °C durante 48 h. Pasado dicho tiempo se retiraron las membranas y se sembraron posteriormente discos de micelio del mismo diámetro del patógeno de estudio, incubándose nuevamente las placas a 22 °C. Se realizaron cuatro repeticiones. Por último, se midió el diámetro de los discos de micelio a los 3 días de crecimiento del patógeno calculando el porcentaje de inhibición.

## 2.2. Ensayos mediante cultivos duales.

El objetivo de estos ensayos fue comprobar la capacidad de biocontrol de *Trichoderma* spp. Dicha capacidad se detecta cuando el antagonista

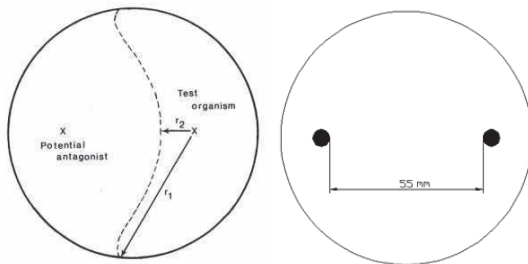


Figura 2: Ensayo de cultivos duales.

sobrecreece al patógeno, destruyéndolo. Cuando no es capaz de biocontrolarlo, el patógeno y *Trichoderma* spp se mantienen separados en la placa.

En placas Petri de 90 mm de diámetro con PDA se colocaron dos discos de micelio de 6 mm de diámetro a una distancia de 5,5 cm todos los aislamientos de *Trichoderma* con *R. solani*. Las placas se incubaron a 22 °C durante 5 días. Se midió el diámetro del patógeno ( $r_1$  y  $r_2$ ) (Figura 1), calculando el porcentaje de inhibición, con la fórmula  $\% I = (r_1 - r_2/r_1) \times 100$ . (Royse, 1978). Se realizaron cuatro repeticiones.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* para el patógeno *R. solani* se puede observar que mediante el uso de membranas (Tabla 1) la mayoría de las cepas tienen un porcentaje de inhibición superior al 60 %. Sin embargo en el caso del cultivo dual (Tabla 2), los porcentajes son inferiores, situándose entre 60 y 40% la mayoría de los aislamientos.

En el caso de *B. cinerea* sucede de forma similar al anterior patógeno. El mayor número de cepas se sitúa en el rango superior a 60 % en caso del ensayo mediante el uso de membranas (Tabla 1) y de 60-40 % en el de cultivo dual (Tabla 2).

**Tabla 1:** Porcentaje de inhibición de los aislamientos *Trichoderma* spp. frente a los fitopatógenos del ensayo mediante el uso de membranas

Inhibición (%)	<i>R. solani</i> *	<i>B. cinerea</i> *	<i>S. sclerotiorum</i> *	<i>F. oxysporum</i> *
> 80	21	19	33	0
80-60	26	22	8	22
60-40	4	6	16	9
< 40	9	13	3	29

\*Número de cepas con el porcentaje de inhibición entre los rangos establecidos.

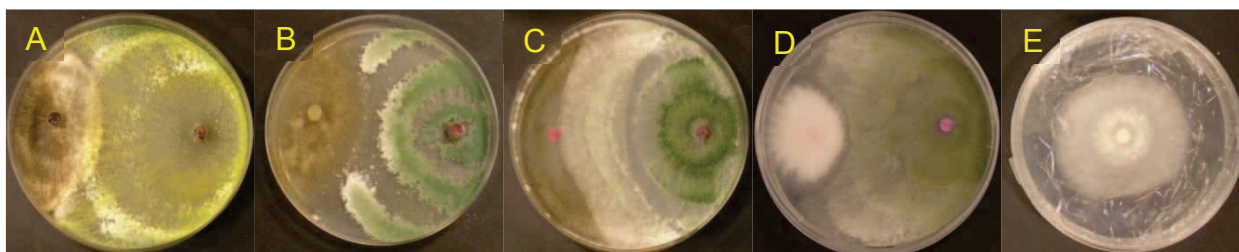
Con *S. sclerotiorum*, en el caso del ensayo mediante membranas (Tabla 1), la mayoría de los aislamientos de *Trichoderma* spp. son capaces de inhibir su desarrollo con unos porcentajes superiores al 80 %. Sin embargo en el caso de cultivo dual (Tabla 2), sucede lo mismo que con los otros dos patógenos antes mencionados, pues la mayoría de los aislamientos del agente de biocontrol se sitúa en el rango 60-40 %.

En el caso de *F. oxysporum* los porcentajes de inhibición en ambos ensayos se reducen respecto a los otros fitopatógenos. En el caso del ensayo mediante membranas (Tabla 1), la mayoría se encuentra en un rango inferior a 40 %, aunque existen aislamientos en el rango de 80-60 % que son capaces de inhibir su desarrollo. En el ensayo mediante cultivos duales (Tabla 2), la mayoría de los aislamientos se encuentran en el rango inferior del 40 %. Como sucede en el otro ensayo, existen aislamientos que inhiben su desarrollo entre el rango 60-40 %.

**Tabla 2:** Porcentaje de inhibición de los aislamientos *Trichoderma* spp. frente a los fitopatógenos del ensayo de cultivo dual.

Inhibición (%)	<i>R. solani</i> *	<i>B. cinerea</i> *	<i>S. sclerotiorum</i> *	<i>F. oxysporum</i> *
> 80	0	0	0	0
80-60	1	5	0	0
60-40	39	39	43	18
< 40	20	16	17	42

\*Número de cepas con el porcentaje de inhibición entre los rangos establecidos.



**Figura 3:** Ejemplos de los resultados *in vitro*. A) Ensayo de cultivo dual de *R. solani* (izquierda) y un aislamiento de *Trichoderma* (derecha); B) Ensayo de cultivo dual de *B. cinerea* (izquierda) y un aislamiento de *Trichoderma* (derecha); C) Ensayo de cultivo dual de *S. sclerotiorum* (izquierda) y un aislamiento de *Trichoderma* (derecha); D) Ensayo de cultivo dual de *F. oxysporum* (izquierda) y un aislamiento de *Trichoderma* (derecha); E) Desarrollo de un aislamiento de *Trichoderma* en el ensayo de cultivo mediante membranas.

#### 4. CONCLUSIONES

Se ha comprobado que los aislamientos de *Trichoderma* son capaces de controlar, en condiciones *in vitro*, aunque con diferencias en los porcentajes de inhibición, a los fitopatógenos *R. solani*, *S. sclerotiorum*, *B. cinerea* y *F.*

*oxysporum*. La actividad antagónica *in vitro* de los aislamientos de *Trichoderma* constituye un indicativo inicial de su actividad biológica contra hongos fitopatógenos.

**PALABRAS CLAVE:** patógeno, cultivo dual, cultivo mediante membranas, agente de biocontrol, alubia.

### **AGRADECIMIENTOS**

Estos ensayos han sido realizados gracias a la beca concedida a Sara Mayo Prieto (FPU12/00677) por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (España) de acuerdo a la Resolución de 25 de abril de 2012 (BOE de 22 de mayo) y la Resolución del 20 de diciembre de 2012. También al Ministerio de Economía y Competitividad por el proyecto nacional de “Farnesol as self-regulatory molecule in *Trichoderma*. Tyrosol and farnesol Signaling in *Trichoderma*-Bean interaction” (AGL2012-40041-C02-02).

### **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

APS, 2015: “Diseases of bean (*Phaseolus vulgaris* L.)”. American Phytopathological Society. (<http://www.apsnet.org/online/common/comment/bean.asp>).

Boto, J.A.; Reinoso, B. 1996. “La judía II- El cultivo de las leguminosas grano en Castilla y León”. Franco, F. y Ramos, A. Junta de Castilla y León. Consejería de Agricultura. Valladolid. España. Pp 319-355.

Burke, D.W., Hall, R. 2005. “*Fusarium* root rot” Compendium of bean diseases, 2<sup>nd</sup>. Ed. Schwart, H.F.; Steadman, J.R.; Hall, R. y Forster, R.L. The American Phytopathology Society. Sant Paul, United States. pp 13-15.

Campelo, M.P.; Lorenzana, A.; Marcos, M.F.; Ámez, M.; Boto, J.A.; Casquero, P.A. 2007. “Eficacia en campo de dos fungicidas para el control del “mal del pie” de la judía (*Phaseolus vulgaris*) en la La Bañeza (León)”. Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas, 33 (2):137-142.

Harman, G.E., Howell, C.R.; Viterbo, A.; Chet, I.; Lorito, M. 2004. “*Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts” Nature Reviews Microbiology 2:43-56.

Hjeljord, L.; Tronsmo, A. 1998. “*Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview”. Harman, G.E. y Kubicek, C.P. (eds.) “*Trichoderma* and *Gliocladium* (vol.2)” Taylor & Francis, Londres, Reino Unido, pp 131-153.

Howell, C.R. 2003. “Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts” Plant Dis 87:4-10.

Index Fungorum, 2015. "Index Fungorum" CABI Biosciences Databases. (<http://www.indexfungorum.org/>).

Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. 2015. "Estadísticas." ([www.magrama.es](http://www.magrama.es))

Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2015. "Estadísticas. FAOSTAR" ([www.fao.org](http://www.fao.org)).

Paulitz, T.C. 1990. "Biochemical and ecological aspect of competition in biological control" "New directions in biological control: Alternatives for suppressing agricultural pest and diseases" Baker, R.R. & Dunn, P.E. (eds). Alan R. Liss. Nueva York, EE.UU.

Royse, D.J. 1978 "The Influence of Fungi Isolated from Peach Twigs on the Pathogenicity of *Cytospora cincta*". *Phytopathol* 68: 603

Sivasithamparam, K.; Gisalberti, E.L. 1998. "Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*" En: Kubicek, C.P.; Harman G.E. (eds.), "Trichoderma and Gliocladium Basic Biology, Taxonomy and Genetics" Taylor and Francis Ltd., London, pp 139-191.

Valenciano, J.B.; Casquero, P.A.; Boto, J.A. 2004 "Influence of sowing techniques and pesticide application on the emergence and the establishment of bean plant (*Phaseolus vulgaris* L.)" *Agronomie*, 24 (2):113-118.

Woo, S.L., Scala, F.; Ruocco, M.; Lorito, M. 2006. "The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants" En: "Annual Meeting of the American-Phytopathological-Society". APS, Rehoboth Beach, pp 181-185

Yeddidia, I.; Benhamou, N.; Chet, I. 1999. "Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*" *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1061-1070.

**FUNGOS E OOMICETO CAUSADORES DE DOENÇAS EM  
ORQUÍDEAS NO SUL DA BAHIA**



## FUNGOS E OOMICETO CAUSADORES DE DOENÇAS EM ORQUÍDEAS NO SUL DA BAHIA

Cristiane Duarte dos Santos<sup>1</sup>; Eliane Leal Candeias<sup>2</sup>; Julielton Santos da Silva<sup>3</sup>; Maria Luíza do Carmo Santos<sup>4</sup>; Carolina Yamamoto Santos Martins<sup>5</sup>; Zozilene Nascimento Santos Teles<sup>6</sup>; Nadja Santos Vitória<sup>7</sup>; José Luiz Bezerra<sup>8</sup>; Edna Dora Martins Newman Luz<sup>9</sup>

<sup>1,2,3</sup> Alunos do programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, e-mail: [agrocristiane@yahoo.com.br](mailto:agrocristiane@yahoo.com.br); [agrcandeias@hotmail.com](mailto:agrcandeias@hotmail.com); [julieltonsilva@yahoo.com.br](mailto:julieltonsilva@yahoo.com.br)

<sup>4</sup> Graduanda de Biologia (UFRB). e-mail: [mluizadocarmo@gmail.com](mailto:mluizadocarmo@gmail.com)

<sup>5,6</sup> Técnicas do laboratório de microbiologia da (UFRB), e-mail: [carolayama@gmail.com](mailto:carolayama@gmail.com); [zozilene@hotmail.com](mailto:zozilene@hotmail.com)

<sup>7</sup> Professora Assistente da Universidade do Estado da Bahia - Campus VIII, e-mail: [nadjasv@hotmail.com](mailto:nadjasv@hotmail.com)

<sup>8</sup> Professor orientador, Bolsista PVNS CAPES da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, e-mail: [jlulabezerra@hotmail.com](mailto:jlulabezerra@hotmail.com)

<sup>9</sup> Professora convidada da Universidade Estadual de Santa Cruz e pesquisadora da CEPLAC, e-mail: [ednadora@cepec.gov.br](mailto:ednadora@cepec.gov.br)

### RESUMO

As orquídeas são consideradas como uma riqueza singular para o mundo da botânica pela grande diversidade de espécies, elas vem se destacando positivamente nos últimos anos no setor de floricultura. Apesar de serem consideradas rústicas com relação ao cultivo e manejo, são suscetíveis a um número considerável de doenças. Este trabalho teve como objetivo: comprovar os postulados de Koch para os fungos e oomicetos considerados patogênicos. As coletas foram realizadas em seis municípios diferentes no sul da Bahia. O isolamento e a identificação foram feitos no Laboratório de Biodiversidade de Fungos da CEPLAC. Os sintomas das doenças apareceram em três dias para *P. palmivora* e *Glomerela cingulata*, e sete dias para *P. capitalensis*.

Palavras-chave: Orchidaceae, *Phytophthora palmivora*, *Glomerela cingulata*, *Phyllosticta capitalensis*.

### ABSTRACT

The orchids are considered as a singular treasure for the world of botany by the great diversity of species, they have been highlighting positively in recent years in the sector of flowers. Despite being considered rustic with relation to cultivation and management, are susceptible to a large number of diseases. This study aimed to: demonstrate Koch's postulates for the fungi and Oomycetes considered pathogenic. The collections were carried out in six different municipalities in the south of Bahia. The isolation and identification were performed in the Laboratory of Biodiversity of Fungi CEPLAC. The symptoms of the diseases appeared in three days for *P. palmivora* and *Glomerela cingulata*, and seven days for *P. capitalensis*.

Keywords: Orchidaceae, *Phytophthora palmivora*, *Glomerela cingulata*, *Phyllosticta Capitalensis*.

## INTRODUÇÃO

A família Orquidaceae compreende 800 gêneros, 35.000 espécies e 120.000 híbridos (SOUZA & LORENZI, 2005). Segundo SUTTLEWORTH et al., (1982) as orquídeas constituem uma grande e interessante família de plantas superiores, distribuídas no mundo todo, que merecem mais dedicação e estudos do que realmente recebem. A beleza das espécies espontâneas e a elegância dos híbridos são unanimemente reconhecidas, bem como seu grande interesse científico como grupo único e altamente desenvolvido de plantas. Além disso, são rústicas e podem ser cultivadas, estudadas e apreciadas por qualquer amador interessado. Esta família talvez seja a mais interessante de todas as famílias de plantas, principalmente por apresentar imensa variação morfológica e extensa distribuição geográfica de suas espécies.

Historicamente a cultura das orquídeas começou no Extremo Oriente, especificamente no Japão e na China por volta de quatro mil anos. A palavra chinesa para orquídea (lan) já aparece no herbário chinês desde então. Entretanto, não se sabe ao certo quando ela passou a ser cultivada pelo homem, e nem se este cultivo foi motivado por razões estéticas ou medicinais (SAMPAIO et al. 2010). Além do interesse botânico as orquídeas são importantes fornecedoras de aromas e outros produtos relevantes para as indústrias de cosméticos e de alimentos. Elas desenvolvem-se desde o Ártico até os Trópicos, tanto ao nível do mar quanto nas grandes altitudes (FARIA et al. 2010).

Segundo NOGUEIRA (2004), várias espécies de orquídeas atraem a atenção de colecionadores e das floriculturas. O mercado mundial movimenta por volta de 210 milhões de dólares em orquídeas por ano, sendo a Tailândia, o maior produtor, exportando mais de 26 milhões de dólares por ano. O mercado brasileiro movimenta cerca de 70 milhões de reais. No entanto, apesar do crescimento de 25% da demanda interna, em 2003, o Brasil exportou cerca de 79 mil dólares, embarcando quase 9000 unidades para diversos países. A floricultura brasileira ainda carece de muitos subsídios científicos e tecnológicos para que possa atingir valores econômicos condizentes com a grande diversidade biológica e valor ornamental apresentado pela família Orchidaceae no país.

Existem no Brasil 33 gêneros e 1636 espécies endêmicos (BARROS, et al., 2015). O Brasil é um dos países mais ricos em orquídeas, tanto em diversidade, como em quantidade de espécies, comparável apenas à Colômbia e ao Equador. No Brasil a distribuição geográfica está em todo território brasileiro abrangendo as regiões o Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul, com maiores domínios fitogeográficos na Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pampa (BARROS, et al., 2015). Na Bahia o cultivo comercial ainda é mínimo sendo feito quase que totalmente por orquidófilos e amadores que apreciam a peculiaridade e beleza dessas plantas, com exceção da região de Camaçari onde existem alguns orquidários com produção comercial.

As orquídeas, apesar de serem consideradas relativamente rústicas com relação ao cultivo e manejo são suscetíveis a um número considerável de doenças (GLORIA et al., 2003 e FARIA et al., 2010).

Na orquidocultura algumas enfermidades podem colocar em risco a produção, depreciando esteticamente as plantas ou mesmo destruindo-as (BARROS, 2009).

Estudos feitos por KLEIN (2008) relacionam os seguintes fungos e omicetos causadores de doenças em orquídeas: *Pythium ultimum* Trow e *Phytophthora cactorum* (Lebert & Cohn.) J. Schöt.; murcha de fusarium causada por *Fusarium*

*oxysporum* Schletend, f.sp. *cattleyae* V. Foster; antracnose causada por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.; ferrugem causada por *Sphenospora kevorkianii* Linder (*Uredo nigropunctata* P.Henn.), *S. mera* Cumm; *S. saphena* Cumm.; *Uredo epidendri* P. Henn, *Uredo behnickiana* P. Henn. e *Hemileia oncidii* Griffon & Malbl.; mofo cinzento causado por *Botrytis cinerea* Pers. e *Botrytis* sp.; mancha de cercospora causado por *Cercospora odontoglossi* Prill. & Delacr., *C. angraeci*, *C. dendrobii*, *C. epipactidis*, *C. persisteriae* e *Cercospora* spp.; murcha de sclerotium causada por *Sclerotium rolfsii* Sacc.; manchas foliares causadas por *Phyllosticta capitalensis* Henn.; podridão das raízes causada por *Rhizoctonia solani* Kuhn; podridão de raízes causada por *Cylindrocarpon radicolola*.Wr.; podridão de raízes causada por *Cylindrocladium* sp.; mancha foliar causada por *Fusarium moniliforme* Sheldon; mancha do bulbo causada por *Diplodia* sp.; mancha causada por *Macrophoma* sp.; outras manchas foliares causadas por *Selenophoma dendrobii* Abiko e *Pestalotiopsis* sp.; crosta negra da baunilha causada por *Mycoleptodiscus indicus* (V.P. Sahni) B. Sutton; mancha aquosa ou mancha marrom causada por *Acidovorax cattleya* (syn. *Pseudomonas cattleyae* (Pav.) Sav.); podridão mole causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* e *Dickeya chrysanthemi*; e as viroses causadas por: Cymbidium mosaic virus–CymMV, Odontoglossum ringspot virus.–ORSV, Orchid fleck virus–OFV, Cucumber mosaic virus–CMV, Dendrobium vein necrosis virus–DVNV, Tomato ringspot virus–ToRSV, Bean yellow mosaic virus–BYMV, Calanthe mild mosaic virus–CalMMV, Ceratobium mosaic virus–CerMV, Clover yellow vein virus–CIYVV (=Dendrobium mosaic virus), Dasheen mosaic virus–DsMV, Cypripedium chlorotic streak vírusCypCSV (=Cypripedium necrotic leafstripe virus), Habenaria mosaic virus–HaMV, Turnip mosaic virus–TuMV, Vanilla mosaic virus–VanMV, Vanilla necrosis virus (=Watermelon mosaic virus WMV), Dendrobium leaf streak virus–DLSV (=Orchid fleck virus–OFV), Laelia red leafspot virus–LRLV (=Orchid fleck vírus–OFV), Cymbidium ringspot virus–CymRSV, Impatiens necrotic spot virus–INSV, Tomato spotted wilt virus–TSWV, Tobacco rattle vírus–TRV, Phalaenopsis chlorotic spot virus–PhCSV, Cypripedium calceolus vírus–CypCV; além do ataque de nematóides do gênero *Aphelenchoides*: *A. bessey* Christie (1942); *A. fragariae* (Ritzema Bos, 1891) Christie 1932; *A. ritzemabosi* (Swartz, 1911) Steiner & Buhrer, 1932 e do gênero *Pratylenchus*: *P. scribneri* Steiner, 1943.

Os prejuízos maiores causados à orquidicultura decorrem dos danos irreversíveis e da perda de qualidade de suas folhas, pseudobulbos e flores (FARIA et al., 2010). A correta identificação dos agentes causais é, portanto, de suma importância para que um manejo adequado seja estabelecido, minimizando as perdas (BARROS, 2009). O presente trabalho, portanto, objetivou a identificação de fungos e oomiceto patogênicos em orquídeas no sul da Bahia.



## MATERIAIS E MÉTODO

### Áreas das coletas

As coletas foram realizadas em seis municípios (Itabuna, Ibicuí, Itororó, Ilhéus, tapebi e Jussari) do sul da Bahia. As folhas e plantas foram provenientes de orquidário a céu aberto e sob árvores (Ilhéus); orquidário ripado e telado (Itapebi); orquidário improvisado sobre cobertura residencial (Itabuna); orquidários em quintais (Ibicuí, Itororó); árvores povoadas natural e artificialmente (Jussari).



Tabela 1: Tipos de cultivo de orquídeas no sul da Bahia - (A, B e C) Árvores povoadas artificialmente e natural; (D e E) Orquidário ripado e telado; (F) Orquidário sobre telhado; (G e H) Orquidário em quintais; (I) Orquidário a céu aberto.

As coletas de Itapebí, Ilhéus, Itabuna e Jussari foram realizadas em área de Mata Atlântica enquanto que as de Itororó e de Ibicuí em área de transição entre Mata Atlântica e áreas caracterizadas por vegetação rasteira e capoeiras.

### Isolamento

As plantas com sintomas e sinais de doenças foram levadas para o Laboratório de Biodiversidade de Fungos do Centro de Pesquisa do Cacau (CEPEC) da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), onde foram lavadas com sabão neutro em água corrente e em seguida foram cortadas em fragmentos de 5 milímetros. Os fragmentos foram desinfetados em álcool 70% por 2 minutos, hipoclorito de sódio a1% por 2 minutos, lavados por 4 vezes em água

destilada e esterilizada (ADE) e transferidos para placas de Petri com meio de batata-dextrose-agar (BDA). Após o aparecimento das colônias estas foram purificadas e identificadas quanto à espécie.

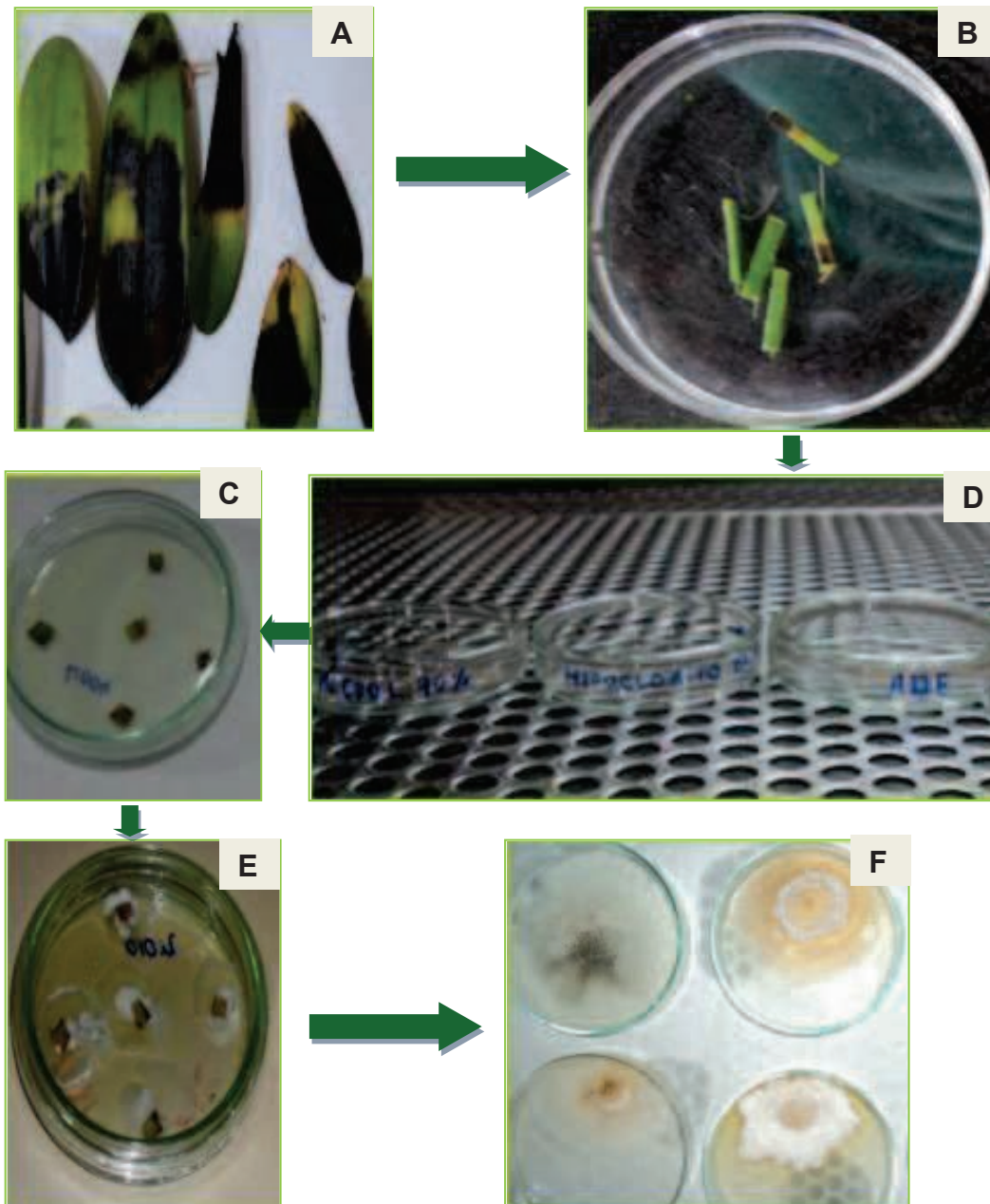


Figura 2: Metodologia utilizada para isolar fungos e oomicetos patogênicos. (A) Sintomas em folhas;(B) Fragmentos de folhas; (C) Desinfestação; (D) Plaqueamento; (E) Crescimento de colônias; (F) Culturas purificadas.

## Identificação

As identificações genéricas e específicas foram feitas a partir de culturas puras dos fungos em meios BDA, em placas de Petri, com cinco a 30 dias de crescimento. A caracterização morfológica foi procedida através de observações das características macroscópicas das colônias e microscópicas das estruturas somáticas e reprodutivas. Com o auxílio de chaves taxonômicas existentes na literatura especializada chegou-se à identificação dos gêneros, enquanto que as



espécies foram identificadas comparando-se as descrições específicas (ARX; MULLER, 1954; GUBA, 1961; MULLER; ARX, 1962; SEIFERT et al., 2011).

### Teste de patogenicidade

As plantas saudáveis para o uso no teste de patogenicidade foram mantidas em casa-de-vegetação. Folhas destacadas ou não foram inoculadas com discos de 5 mm de diâmetro provenientes de culturas do patógeno após seis dias de crescimento em BDA. O inóculo (discos de cultura) foi depositado nas superfícies adaxial e abaxial das folhas, após lavagem das mesmas com sabão neutro em água corrente. Metade das inoculações foi feita em folhas íntegras e o restante com folhas com ferimento feito com agulhas histológicas. Após a inoculação as folhas destacadas e as plantas inoculadas foram incubadas em câmara-úmida por 48 h.

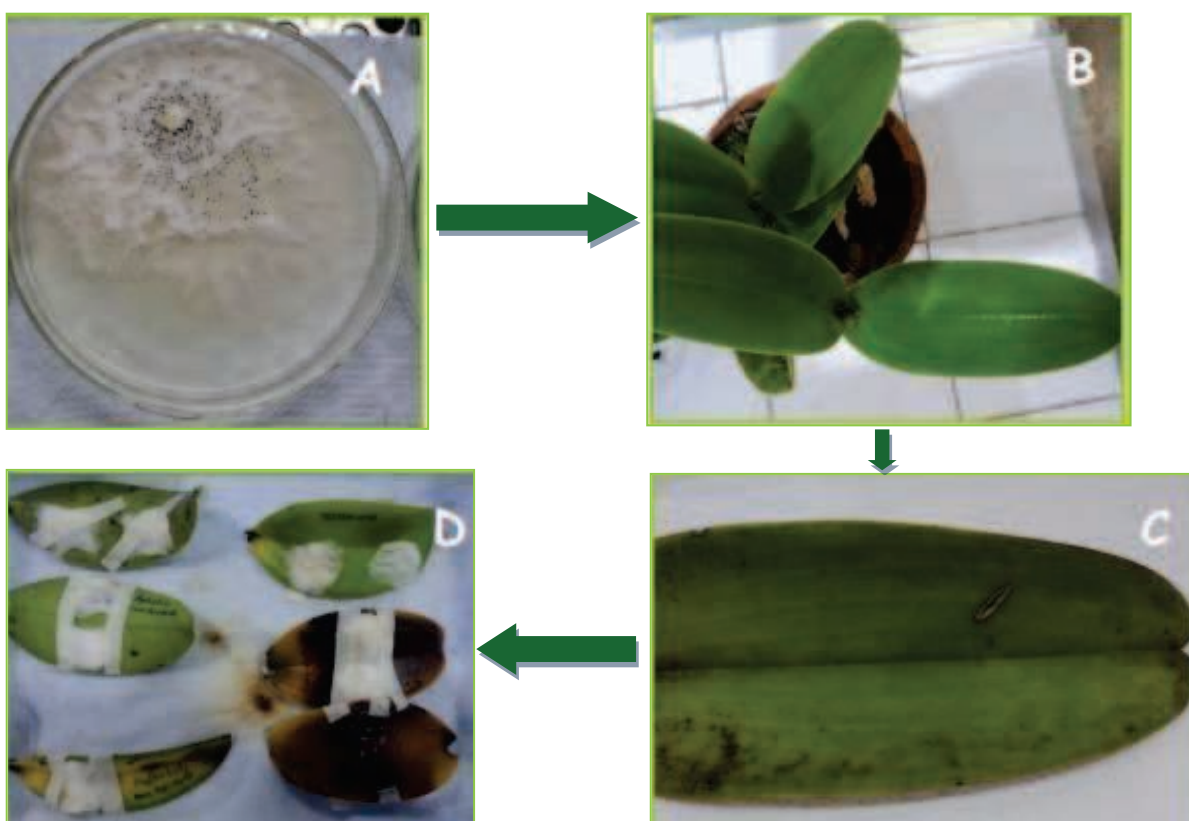


Figura 3: Metodologia utilizada para teste de patogenicidade. (A) Cultura do patógeno; (B e C) Folhas saudáveis antes da inoculação; (D) Folhas inoculadas.

Foram feitas avaliações diárias nas folhas e plantas inoculadas para observação do aparecimento de sintomas.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram feitos 332 isolamentos, dos quais foi possível identificar 210 isolados pertencentes a 24 espécies fúngicas e uma espécie de oomiceto, em seis municípios da região sul da Bahia. Os outros 122 isolados não produziram estruturas de reprodução nem esporos em meio de cultura sendo considerados como "Mycelia sterila". Foram identificadas 24 espécies fúngicas e uma espécie de oomiceto coletadas em seis municípios da região sul da Bahia. Dos isolados identificados em



nível de espécies, nove foram testados (*Phyllosticta capitalensis*, *Phytophthora palmivora*, *Glomerella cingulata*, *Fusarium* aff *oxysporum*, *Pestalotiopsis* sp., *Lasiodiplodia theobromae*, *Colletotrichum gloesporioides*, *Guignardia endophyllicola* e *Nigrospora sacchari*). Apenas *Phyllosticta capitalensis*, *Glomerella cingulata* e *Phytophthora palmivora* causaram lesões necróticas e podridão negra tanto na face abaxial quanto adaxial das folhas de *Cattleya* inoculadas com ferimentos em folhas destacadas e não destacadas. As inoculações sem fermento não causaram lesões em nenhuma das faces das folhas destacadas ou não destacadas.

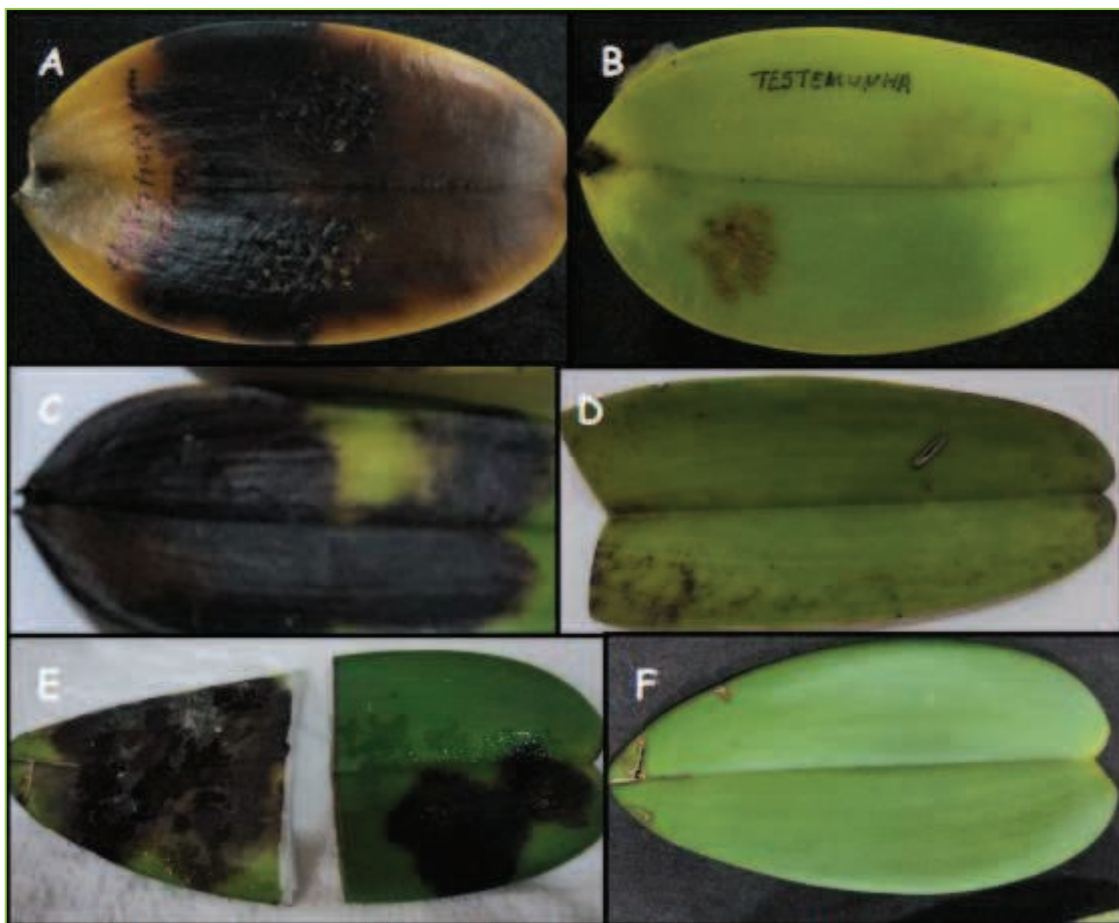


Figura 3: Inoculação em folhas destacadas de *Cattleya* – (A) Sintomas causado por *Phyllosticta capitalensis* (C) *Phytophthora palmivora* e (E) *Glomerella cingulata*; (B, D e F) Testemunhas não inoculadas.

Após as inoculações os sintomas apareceram em três dias para *P. palmivora* e *Glomerella cingulata*, e sete dias para *P. capitalensis*. O reisolamento dos patógenos foi realizado oito dias após o aparecimento dos sintomas. Verificou-se que as culturas reisoladas eram idênticas às culturas isoladas.

As espécies de *Glomerella* estão presentes nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, causando perdas significativas em várias colheitas, principalmente em fruteiras (GARRIDO & SÔNEGO, 2003). *Glomerella cingulata* causa manchas foliares em *Heliconia* spp., *Calathea* Burle Marx, *Musa coccínea* e em *Strelitzia* sp. (COSTA, 2007). No Brasil segundo MENDES (2012), existem cerca de 65 hospedeiros inclusive em orquídeas. Neste trabalho *G. cingulata* foi encontrada em: *Cattleya*, *Gongora*, *Octomeria* e *Phaleanopsis*. O gênero *Guignardia* causa várias doenças vegetais, inclusive à mancha preta dos citros (KIMATI et al., 1997). Estudos feitos por COSTA (2007) encontrou o gênero *Guignardia* associada

a plantas de helicônia. No Brasil são registrados apenas oito hospedeiros inclusive orquídeas para a espécie *Guignardia endophyllicola* (MENDES, 2015) a mesma encontrada no presente trabalho. O fungo *Phyllosticta* sp. foi encontrado causando pequenas manchas nas folhas de *Denfal* sp. (SOUSA et al., 2009). Estudos feitos por SILVA (2008) com orquídeas do Brasil encontraram pela primeira vez o fungo *Phyllosticta capitalensis*, essa mesma espécie foi encontrada nesse presente trabalho associada aos seguintes gêneros de orquídeas: *Arachnis*, *Bulbophyllum*, *Cattleya*, *Encyclica*, *Epidendrum*, *Maxillaria*, *Pleurothallis* e em outros não identificados causando doenças sobre folhas e pseudobulbos de *Bifrenaria harrisoniae*.

O gênero *Phytophthora* causa danos severos. Em viveiros na cidade de Ituberá foi diagnosticada podridão das folhas e inflorescência de antúrios causada por *P. citrophthora* (PAIM et al., 2006). A espécie *P. nicotianae* causa necrose em bulbos de lírio da paz (FISCHER et al., 2004). Na china, essa mesma espécie infectou a orquídea *Dendrobium candidum* (ZHANG et al., 2008). A espécie *P. palmivora* é citada por MENDES (2015) em 11 hospedeiros. A espécie de *Phytophthora* comumente relatada como causadora de podridão negra em orquídeas é *P. cactorum* (FARIA, 2010).

Os achados deste trabalho vêm reafirmar a grande importância do conhecimento das espécies fungicas e de oomicetos existente em Orchidaceae no bioma Mata Atlântica do sudeste baiano e entorno.

## CONCLUSÕES

- ❖ *Phytophthora palmivora* foi o patógeno mais importante causando surtos de podridão negra em orquidário.
- ❖ *Glomerella cingulata*, *Phyllosticta capitalensis* e *Phytophthora palmivora* foram encontrados pela primeira vez em *Cattleya* ssp. na Bahia.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a UESC, a UFRB e a CEPLAC pelo apoio e disponibilidade de suas instalações para o desenvolvimento deste trabalho e as agencias financiadoras CNPq e FAPESB pelas bolsas concedidas no período do desenvolvimento do trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARX, J.A; MÜLLER, E. Die Gattungen der amerosporen Pyrenomyceten. Beiträge zur Kryptogamenflora der Schweiz, Wabern- Bern, v.11, n.1, 1954. p.1–434.

BARROS, A.P.O. et al. Manchas foliares em *Catasetum expansum* (Orchidaceae) incitadas por *Colletotrichum* sp. IX Jornada de ensino, pesquisa e extensão –JEPEX 2009. Recife, PE, 2009.

BARROS, F. de; Vinhos, F.; Rodrigues, V.T.; Barberena, F.F.V.A.; Fraga, C.N.; Pessoa, E.M.; Forster, W.; Menini Neto, L.; Furtado, S.G.; Nardy, C.; Azevedo, C.O.; Guimarães, L.R.S. *Orchidaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179>>. Acesso em: 21 Mar. 2015

COSTA, C.R. Fungos associados às plantas ornamentais tropicais no Distrito Federal. 2007. 98f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade de Brasília, 2007 68

FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; CARVALHO, J. F. R. P. Cultivo de Orquídeas – Londrina, PR, 2010.

FISCHER, I. H. et al. Ocorrência de *Phytophthora parasitica* em Lírio da Paz no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 29, n. 6, nov./dez. 2004. p. 690.

GARRIDO, L. da C.; SÔNEGO, O. R. Sistema de produção de pêssego de mesa na região da Serra Gaúcha–doenças fúngicas e bacterianas do pessegueiro. Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, 2003. (Sistema de Produção,3). Versão Eletrônica, Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em 25/03/2012.

GIORIA, R.; et al. Doenças e pragas que atacam as orquídeas. Taubaté. Editora Brasil Orquídeas, 2003.

GUBA, E.F. Monograph of *Pestalotia* and *Monochaetia*. Harvard University

KIMATI, H.L. et al. (Eds.). Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2. 705 p.

KLEIN, E. H. S. – Levantamento e Desenvolvimento de Kit Diagnóstico de Patógenos e Propagação In Vitro de Orquídeas no Estado do Rio de Janeiro, Dissertação de Pós-graduação em Fitossanidade e Biotecnologia, UFRRJ, 2008, 72F.:il.

MENDES, M. A. S.; URBEN, A. F.; Fungos relatados em plantas no Brasil, Laboratório de Quarentena Vegetal. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Disponível em: <http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aiqweb/michtml/fgbanco01.asp>. Acesso em: 19/3/2015.

MENDES, S. S.; MESQUITA, J. B.; MARINO, R. H. Qualidade sanitária de sementes de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit armazenadas em câmara fria. *Acta Forestalis, Aracaju*, v.1, n.1, 2009. p.19-28. 71

MULLER, E; J.A. v. ARX. Die Gattungen der didymosporen Pyrenomyceten. *Beitr. Kryptogamienfl. Schweiz, Wabern- Bern*, v.11 n.2, 1962. p.1-922.

NOGUEIRA, R. E. Caracterização Morfológica e Molecular de Fungos Micorrízicos de Orquídeas. Tese em Microbiologia agrícola pela UFV. Viçosa, MG, 2004. of man in sterile distilled water. Furtherresearches. *Jour. Trop. Med. Hyg.* 70:

PAIM, M. C. A. et al. *Phytophthora citrophthora* as a pathogen of *Anturium andreanum* in Bahia, Brazil. *Australasian plant pathology*, v.35, n. 2, 2006. p. 275-277. 72

SAMPAIO, M. B. et al. Orquídeas: do desconhecido ao Novo Mundo. X JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – JEPEX – UFRPE: Recife, PE, 2010.

SEIFERT, K. A. et al. The Genera of Hyphomycetes. [CBS Biodiversity Series no. 9.]. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2011.

SILVA, M. et al. Leaf and pseudobulb diseases on *Bifrenaria harrisoniae* (Orchidaceae) caused by *Phyllosticta capitalensis* in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes*, 2008. p.53-56.

SOUSA, E. M. R. et al. Levantamento de fungos causadores de doenças em orquídeas no estado da Bahia. 60º Congresso Nacional de Botânica, 32º Reunião Nordestina de Botânica e 29º Encontro Regional de Botânicos – MG, BA, ES. Feira de Santana – Bahia. Jun/Jul 2009. 74

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da florabrasileira, baseado em APG II. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. 2005.p.106.

SUTTLEWORTH, F. ZIM, H. DILLON, G. Orquídeas: Guia dos Orquidófilos. Ed. Expressão e cultura, 1982.

ZHANG, J. Z.; LI, J.; XU, T. First report of *Phytophthora nicotianae* causing blight of *Dendrobium candidum* in Zhejiang province, China. *Plant Pathology*, v. 57, n. 2, 2008. p. 370

**ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia origanoides* H.B.K NO CONTROLE  
DE *Aspergillus níger***

## ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia origanoides* H.B.K NO CONTROLE DE *Aspergillus niger*

Simone Teles<sup>1</sup>; Rafael Mota da Silva<sup>2</sup>; José Alberto Pereira<sup>3</sup>, Ana Cristina Fermino<sup>4</sup>, Lenaldo Muniz de Oliveira<sup>5</sup>; Angélica Maria Lucchese<sup>6</sup>, Franceli da Silva<sup>7</sup>.

1.Pós-Doctor pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB/Campus de Cruz das Almas/BA.[telessimone@gmail.com](mailto:telessimone@gmail.com)

2.Aluno do curso de Doutorado em Ciências Agrárias pela UFRB/Campus de Cruz das Almas/BA.[rafamotaprego@hotmail.com](mailto:rafamotaprego@hotmail.com)

3.Prof<sup>o</sup>Dr<sup>o</sup> do Departamento de Agricultura, Instituto Politécnico de Bragança/Portugal.[jpereira@ipb.pt](mailto:jpereira@ipb.pt)

4. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas – UFRB Cruz das Almas/BA.[ferminosoares@gmail.com](mailto:ferminosoares@gmail.com)

5. Prof<sup>o</sup>.Dr<sup>o</sup>. do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Feira de Santana-UEFS, Feira de Santana/BA.[lenaldo.uefs@gmail.com](mailto:lenaldo.uefs@gmail.com)

6. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. do Departamento de Ciências Exatas-UEFS/ Feira de Santana/BA.[angelica.lucchese@gmail.com](mailto:angelica.lucchese@gmail.com)

7. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas – UFRB Cruz das Almas/BA, orientadora.[franceli.silva@gmail.com](mailto:franceli.silva@gmail.com)

**RESUMO:** O sisal, importante cultura da região semiárida, vêm declinando a produção da fibra devido à podridão vermelha, causada pelo *Aspergillus niger*. Nos últimos anos tem crescido a busca por produtos naturais na agricultura para o controle desses e de outros fitopatógenos. Este trabalho teve como objetivo, avaliar o efeito do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K sobre o crescimento micelial e germinação de esporos de *Aspergillus niger* van Tieghem. O experimento foi conduzido utilizando o delineamento inteiramente casualizado com cinco concentrações (0,125, 0,25, 0,5, 1 e 2  $\mu$  mL<sup>-1</sup>), dois controles (BDA e BDA+ tween) e 6 repetições. O óleo essencial foi obtido pelo método da hidrodestilação. No teste *in vitro*, para inibição do crescimento micelial, os óleos essenciais foram incorporados ao meio BDA.. Para germinação dos conídios, foram utilizadas placas de microtitulação. O óleo essencial de *L. origanoides* inibiu 95% o crescimento micelial do *Aspergillus niger* e a germinação dos esporos foi reduzida à medida que aumentou a concentração do óleo essencial. Conclui-se que óleo essencial de *L. origanoides* possui potencial para o controle de *A. niger*.

**PALAVRAS-CHAVE:** óleo essencial, fitopatógeno, sisal

## ESSENTIAL OIL OF *Lippia origanoides* H.B.K IN THE CONTROL OF *Aspergillus niger*

**SUMMARY:** The sisal, an important crop of the semiarid region, is reducing its annual production of fiber due to the bole rot caused by *Aspergillus niger*. Due to the damages caused to the environment by the use of synthetic products, the demand for natural products in agriculture is increasing for the control of these phytopathogens. The



present work intended to evaluate the effect of *Lippia origanoides* H.B.K. essential oil over the mycelia growth and spore germination of *Aspergillus niger* van Tieghem. The experiment was conducted using an experimental outline completely randomized, with five concentrations (0.125; 0.25; 0.5; 1 and 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), two controls (PDA and PDA plus tween) and six repetition. The essential oil extractions by hydro-distillation. In the *in vitro* evaluation, for the growth mycelia inhibition, essential oil were incorporated in PDA.. For the conidia germination were used plates of microtiter. Regarding mycelia growth, the results demonstrated that the essential oil of *L. origanoides* inhibited 95% of *A. niger* growth and spores germination was reduced with the concentration applied of essential oil. It was concluded that the use of *L. origanoides* essential oil possess potentialities in the control of *A. niger*.

**Keywords:** essential oil, phytopathogen, sisal

## INTRODUÇÃO

Em decorrência dos problemas ambientais e os efeitos tóxicos provocados por produtos sintéticos, os estudos voltados para o uso de substâncias naturais são cada vez mais crescentes. Os óleos essenciais podem ser uma alternativa no controle de insetos-pragas e doenças causadas por fungos, nematoides, vírus e bactérias, e estes ainda podem ser associados às práticas de manejo integrado de doenças, podendo atender à grande demanda atual por produtos para a produção agroecológica de alimentos (SILVA *et al.*, 2010).

Trabalhos realizados com óleos essenciais evidenciam o potencial das plantas medicinais no controle de fitopatógenos. Tzortzakis e Economakis (2007) verificaram o controle do *Colletotrichum coccodes*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*, e *Rhizopus stolonifer* com uso do óleo de *Cymbopogon citratus*.. Soylu *et al.* (2010) também identificaram a ação do óleo de *Origanum syriacum*, *Lavandula stoechas* e *Rosmarinus officinalis* na inibição do crescimento de *Botrytis cinerea*. Gupta *et al.* (2011) avaliando seis espécies medicinais (*Mentha arvensis*, *Carum capticum*, *Cymbopogon citratus*, *Eugenia caryophyllata*, *Cedrus deodara* e *Eucalyptus globulas*) contra *Meloidogyne incognita* e *Fusarium oxysporum* obtiveram resultados positivos no controle em baixas concentrações do óleo essencial. Kedia *et al.* (2014) constataram atividade inseticida do óleo essencial de *Mentha spicata* no controle de *Collosobruchus chinensis*.

O óleo essencial do alecrim do tabuleiro (*Lippia origanoides* H.B.K) apresenta atividade biológica comprovada contra micro-organismos patogênicos principalmente pela presença dos monoterpenos e sesquiterpenos (HYLDGAARD *et al.*, 2012). Contudo, apesar do potencial dessa espécie no controle de patógenos, não foi possível encontrar na literatura estudos voltados para o seu uso no controle de fitopatógenos.

As perdas da produção das principais culturas, relacionadas ao ataque de pragas, incluindo insetos, nematoide e vírus é estimada em até 50% (PIMENTEL *et al.*, 1991;. OERKE, 2006), sendo que cerca de 70% das doenças de plantas são ocasionadas por fungos (LEVETIN & MCMAHON,2003). Na cultura do sisal (*Agave sisalana*), espécie de grande

importância econômica e social para os agricultores da região semiárida (CONSOLI *et al.*, 2009), a realidade não é diferente, em virtude dos prejuízos causados pelo *Aspergillus niger*. Esse fungo, agente etiológico da podridão vermelha, vêm causando o declínio da produção anual da fibra de sisal (SOARES *et al.*, 2006). Essa doença encontra-se disseminada em 100% dos plantios na Bahia, com incidência média variando de 5 a 40% (ABREU, 2010). Considerando que as pesquisas de controle de doenças fúngicas por meio do emprego de óleos essenciais tem crescido consideravelmente nos últimos anos (DINIZ *et al.*, 2008), e que a exploração da atividade biológica de compostos secundários presentes nos óleos essenciais de planta pode constituir uma forma efetiva de controle de doenças em plantas cultivadas. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do óleo essencial sobre o crescimento micelial e germinação de esporos de *Aspergillus niger*, isolado do sisal.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. O isolado de *Aspergillus niger* van Tieghem foi obtido de plantas de sisal com sintomas de podridão vermelha.

Para extração do óleo essencial amostras de 100g de folhas+ inflorescência previamente secas e trituradas rapidamente em liquidificador industrial foram adicionadas em balão de vidro de 5 litros contendo água destilada em volume suficiente para cobertura total do material vegetal, iniciando o processo de hidrodestilação. Foram adotados aparatos do tipo Clevenger graduados, acoplados a balões de vidro, que foram aquecidos por mantas térmicas elétricas com termostato. O processo de extração foi conduzido durante 3 horas, contadas a partir da condensação da primeira gota, sendo verificado o volume de óleo extraído na coluna graduada do aparelho de Clevenger. Com objetivo de remover a água residual foi adicionado ao óleo essencial sulfato de sódio anidro para evitar perdas por hidrólise durante o armazenamento. Posteriormente, com o uso de pipeta do tipo Pasteur, o óleo foi acondicionado em frasco de vidro de 2 mL envolto com papel alumínio, etiquetado e armazenado em congelador comercial a -5 °C ao abrigo da luz.

Para a análise da composição química, 20 mg do óleo essencial foram previamente diluídos em 1 mL de acetato de etila. Na análise por CG/DIC foi utilizado um Cromatógrafo Shimadzu® CG-2010 equipado com injetor automático AOC-20i, coluna capilar Rtx-5 (30 m x 0.25 mm), espessura do filme 0.25 µm, temperatura do injetor 220 °C e do detector 240 °C, hélio como gás de arraste (1.2 mL min<sup>-1</sup>), com programa de temperatura do forno de 60 a 240 °C a 3 °C.min<sup>-1</sup>, mantendo a 240 °C por 20 min, split de 1:20, volume de injeção de 1 µL.

As análises por CG/EM foram realizadas em Cromatógrafo Shimadzu® CG-2010 acoplado a Espectrômetro de Massas CG/MS-QP 2010 Shimadzu®, com injetor automático AOC-20i, coluna capilar DB-5ms (30 m x 0.25 mm), espessura do filme 0.25 µm, temperatura do injetor 220°C, gás de arraste hélio (1 mL min<sup>-1</sup>), temperatura da interface e da fonte de ionização 240°C, energia

de ionização 70 eV, corrente de ionização 0.7 kV e programa de temperatura e split semelhante a descrita acima.

A identificação dos constituintes foi realizada através do cálculo do índice de Kovats de cada um dos picos e pelos dados de espectrometria de massas. Os índices foram calculados com a utilização de cromatogramas obtidos pela co-injeção da amostra com uma série homóloga de n-alcenos (C<sub>8</sub> a C<sub>24</sub>). Cada pico do cromatograma foi também identificado pelo seu espectro de massas, pela comparação com a biblioteca do equipamento, pela consulta da literatura especializada (ADAMS, 2007; JOULAIN e KONIG, 1998) e pela injeção de padrões. Já a quantificação dos constituintes identificados foi obtida com base nas áreas dos picos cromatográficos correspondentes utilizando-se o método da normalização.

Para determinação do crescimento do fungo foi utilizado discos de micélio com 5 mm de diâmetro e transferidos para as placas de Petri contendo o meio BDA com as diferentes concentrações do óleo essencial (0.125, 0.25, 0.5, 1 e 2 µL mL<sup>-1</sup>). As placas foram incubadas em BOD a 28±2°C e as culturas foram avaliadas a cada 48 horas, a partir da instalação do experimento, por meio da medição do diâmetro da colônia com uma régua milimetrada, em dois sentidos diametralmente opostos.

Para avaliar a inibição da germinação de esporos de *A. niger*, foram adicionadas ao meio batata dextrose (BD) as concentrações do óleo essencial (0.125, 0.25, 0.5, 1 e 2 µL mL<sup>-1</sup>). Posteriormente adicionou-se 150 µL do meio BD contendo as frações, em poços de placas de microtitulação e 150 µL da suspensão de esporos de *Aspergillus niger* na concentração 10<sup>6</sup> conídios mL<sup>-1</sup>. As placas foram incubadas a 28,5 °C em câmara de crescimento tipo BOD. Os controles negativos foram constituídos de tween e meio de cultura BD (Batata-dextrose) sem adição do óleo essencial. A avaliação foi por meio da contagem aleatória dos esporos, registrando-se o número de esporos germinados e não germinados no total de 100 esporos, após a adição de uma gota de lactofenol, em todos os tratamentos, para paralisar a germinação de esporos. A adição do lactofenol ocorreu no momento em que o tratamento controle apresentou 50% de esporos germinados. Foi considerado como esporo germinado aquele cujo tubo germinativo apresentava o comprimento superior ao dobro do diâmetro do esporo.

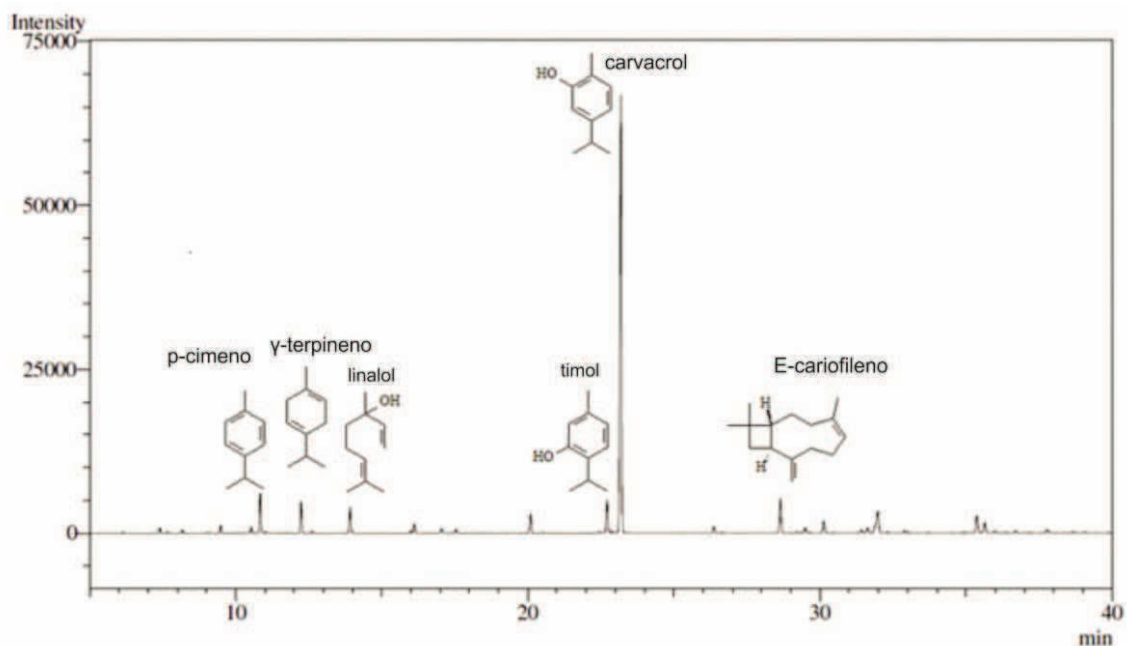
Os dados foram interpretados estatisticamente por análises de variância pelo teste de F e regressão. As análises foram realizadas com auxílio do programa SISVAR (FERREIRA, 2000).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram identificados 27 compostos do óleo essencial das folhas de *Lippia origanoides*, divididos entre monoterpenos e sesquiterpenos (Tabela 1). os compostos carvavrol (58,60%), p-cimeno (6,30%), (E)-cariofileno (4,20%), γ-terpineno (4,0%), timol (4,0%) e linalol (3,10%) foram os componentes majoritários do óleo essencial de *Lippia origanoides* (Figura 1).

**Tabela 1** Componentes químicos identificados e seus respectivos índices de Kovats calculados ( $IK_C$ ), índices de Kovats da literatura ( $IK_L$ ) do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K.

Compostos	$IK_{calc}$	$IK_{lit}$	(%)
pent-4-enoato de etila	884	888	tr.a
$\alpha$ -tujeno	930	930	0,53 $\pm$ 0,15
$\alpha$ -pineno	938	939	tr.a
canfeno	954	954	0,33 $\pm$ 0,06
1-octen-3-ol	980	979	tr.a
mirreno	992	990	0,93 $\pm$ 0,15
$\alpha$ -terpineno	1019	1020	0,70 $\pm$ 0,17
$\rho$ -cimeno	1028	1024	6,27 $\pm$ 0,40
limoneno	1032	1029	0,20 $\pm$ 0,12
$\gamma$ -terpineno	1063	1064	3,97 $\pm$ 0,81
linalol	1100	1196	2,53 $\pm$ 0,61
cânfora	1148	1146	1,10 $\pm$ 0,00
borneol	1169	1169	0,60 $\pm$ 0,10
terpinen-4-ol	1180	1177	0,53 $\pm$ 0,06
metil timil eter	1238	1235	2,53 $\pm$ 0,12
timol	1296	1290	4,10 $\pm$ 0,10
carvacrol	1311	1299	58,60 $\pm$ 2,23
acetato de carvacrol	1376	1372	0,50 $\pm$ 0,10
E-cariofileno	1423	1419	4,13 $\pm$ 0,50
$\alpha$ -bergamoteno	1438	1434	tr.a
aromadendreno	1442	1441	0,67 $\pm$ 0,06
$\alpha$ -humuleno	1457	1454	1,43 $\pm$ 0,15
biclogermacreno	1500	1500	3,23 $\pm$ 0,50
7-epi- $\alpha$ -selineno	1521	1522	0,37 $\pm$ 0,06
espatulenol	1581	1578	2,20 $\pm$ 0,35
óxido de cariofileno	1586	1583	1,60 $\pm$ 0,26
viridiflorol	1594	1592	0,33 $\pm$ 0,06
Total identificado			<b>97,40</b>



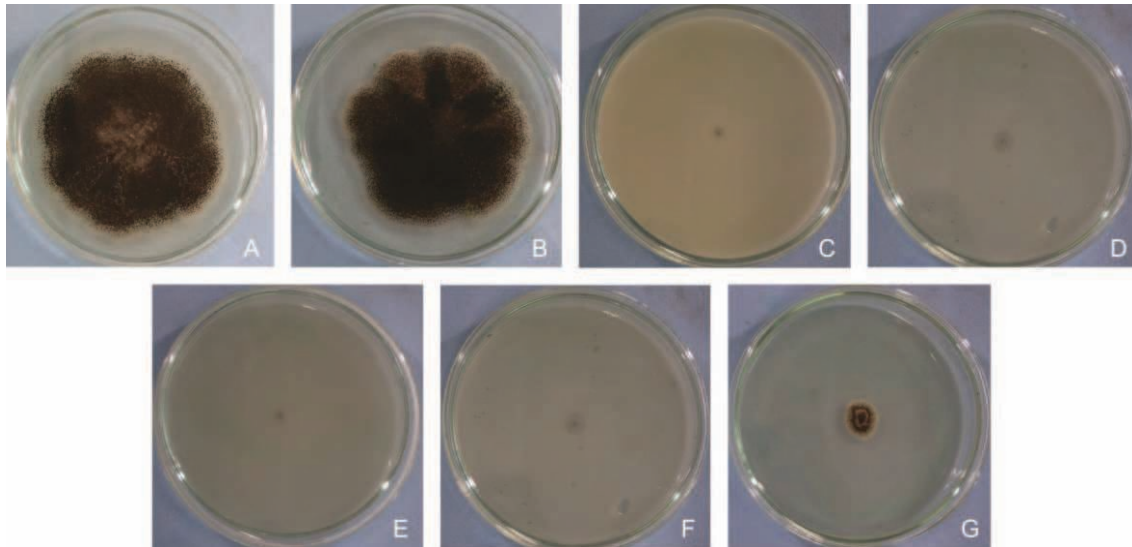
**Figura 1:** Compostos majoritários de *Lippia origanoides*

A presença do carvacrol, *p*-cimeno e timol, conferem a esta espécie o uso medicinal e atividades biológicas comprovadas contra micro-organismos patogênicos (HYLDGAARD et al., 2012).

A fim de determinar a atividade biológica do óleo essencial de *Lippia origanoides* foram avaliadas a porcentagem de inibição do crescimento micelial e porcentagem de germinação de esporos. Na Tabela 1 são apresentados os dados de inibição do crescimento micelial do *Aspergillus niger*.

De acordo com os dados observados, o fungo cresceu no tratamento controle, onde não foi identificado porcentagem de inibição. Entretanto, a adição do óleo essencial reduziu significativamente o crescimento do fungo (Figura 2). O óleo essencial de *Lippia origanoides* proporcionou 95% de inibição do crescimento micelial do *Aspergillus niger* independentemente da concentração utilizada. Na menor concentração testada ( $0,125 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), foi possível verificar a ação do óleo inibindo significativamente o crescimento do fungo (Tabela 2). Resultados semelhantes foram encontrados por Martins et al. (2010), onde os autores verificaram que o óleo de *Melaleuca arternifolia* reduziu o crescimento micelial dos fungos *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Alternaria alternata*, a partir da concentração de 0,2% incorporada ao meio de cultura. Hillen et al. (2012), em estudos realizados com óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) também verificaram inibição do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* em todas as concentrações (20, 40, 60, 100, 200, 500 e  $1000 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) testadas.





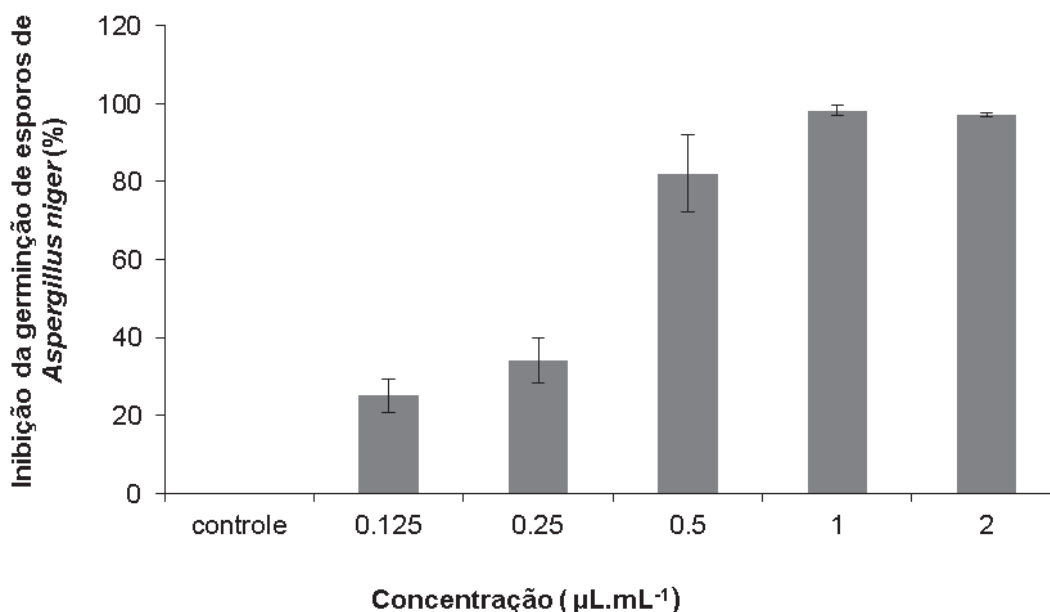
**Tabela 2:** Porcentagem de inibição do crescimento micelial do *Aspergillus niger*

Concentração ( $\mu\text{L. mL}^{-1}$ )	%
0.125	95.60 $\pm$ 0.35 a
0.25	95.25 $\pm$ 0.65 a
0.5	95.60 $\pm$ 1.10 a
1	96.00 $\pm$ 0.35 a
2	96.60 $\pm$ 1.10 a

A eficiência do óleo essencial *Lippia origanoides* sobre a inibição da germinação de *A. niger* é apresentada na Figura 3. Os dados obtidos indicam que o potencial inibitório do óleo essencial na germinação do esporo foi evidenciado à medida que aumentou a concentração do óleo essencial. A partir da concentração de  $1 \mu\text{L mL}^{-1}$  do óleo essencial de *Lippia origanoides*, ocorreu em média 98% da inibição de germinação dos esporos. Em experimento realizado com outras espécies medicinais os resultados de germinação atingiram 100% de inibição. Estudos feitos por Silva e Bastos (2007) com *Piper dilatatum*, *Piper callosum* e *Piper marginatum* var. *anisatum*, nas concentrações de 0,4 e  $0,5 \mu\text{L mL}^{-1}$  encontraram 100% de inibição na germinação de basidiosporos de *Crinipellis perniciosus*, agente etiológico da vassoura-de-bruxa do cacauero Nas espécies de *Cymbopogon nardus* e *Thymus vulgaris* também foi possível verificar a inibição total da germinação dos uredinosporos de *Phakospora pachyrhizi*, agente etiológico da ferrugem da soja (MEDICE et al. 2007). Souza Júnior et al. (2009) também observaram que os óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham e *Lippia citriodora* Kunth nas concentrações 1, 3, 5 e  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  inibiram em 100% a germinação dos esporos de *Colletotrichum gloeosporioides*. Já Kumar et al. (2014) em estudos com diferentes espécies do gênero *Erigeron*, não observaram a inibição total da germinação dos esporos, contudo houve uma inibição significativa entre 78 a 97,5% na concentração  $2000 \text{ mg mL}^{-1}$  sob o *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*.



Apesar das menores concentrações inibirem em torno de 95% o crescimento do fungo, o mesmo não foi observado para germinação de esporos, onde foi possível observar 35% de inibição. Segundo French (1992), os compostos químicos presentes em substâncias voláteis podem estimular ou inibir o desenvolvimento e a germinação de esporos de fungos em determinadas concentrações



**Figura 3:** Porcentagem de inibição da germinação de esporo do *Aspergillus*.

Segundo FRENCH (1992), os compostos químicos presentes em substâncias voláteis podem estimular ou inibir o desenvolvimento e a germinação de esporos de fungos em determinadas concentrações.

De acordo com Fontenelle *et al.* (2007) os principais constituintes de óleos essenciais extraídos de plantas que exercem atividade antifúngica importante são compostos fenólicos como o timol, carvacrol ou eugenol. O composto majoritário identificado neste estudo foi o carvacrol. A forte ação exercida pelo óleo essencial de *L. origanoides* sobre o desenvolvimento micelial de *A niger* provavelmente ocorreu devido à presença desse composto. Entretanto, pode estar associada também à presença de outros componentes, incluindo os minoritários. Segundo Montanari *et al.* (2011), os constituintes minoritários do óleo essencial da espécie são críticos e podem influenciar a atividade antimicrobiana através de um efeito sinérgico, potencializador ou antagônico. De acordo com os resultados obtidos é possível concluir que os testes *in vitro* indicam o potencial de uso do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K para o controle de *Aspergillus niger*.

**AGRADECIMENTOS:** À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia-FAPESB; Financiadora de Estudos e Projetos-FINEP.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R.B. **Identification of essential oil components by gas chromatograph/mass spectrometry**. Carol Stream: Allured, 2007. p.804.
- ABREU K.C.L.M. 2010. **Epidemiologia da podridão vermelha do sisal no Estado da Bahia**. 2010. 100p. Tese (Dotourado em Ciências Agrárias)-Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.
- FERREIRA, D. F. **Sistema de análises de variância para dados balanceados**. Lavras: UFLA, 2000. (SISVAR 4.1 pacote computacional).
- FONTENELLE, R. O. S. et al. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 934-940, 2007.
- FRENCH, R.C. Volatile chemical germination stimulators of rust and other fungal spores. **Mycologia**, v.84, n.3, p.277-288, 1992.
- GUPTA, A.; SHARMA, S.; NAIK, S.N. Biopesticidal value of selected essential oils against pathogenic fungus, termites, and nematodes. **International Biodeterioration e Biodegradation**, v. 65, p.703-707, 2011.
- HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R.L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 1-24, 2012.
- JOULIN, D., KONIG, W.A. **The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons**. Hamburg: EB-Verl, 1998. p.658.
- KEDIA, A.; PRAKASH, B.; MISHRA, P.K., CHANOTIYA, C.S.; DUBEY, N.K. Antifungal, antiaflatoxicogenic, and insecticidal efficacy of spearmint (*Mentha spicata* L.) essential oil. **International Biodeterioration e Biodegradation**, v. 89, p. 29-36, 2014.
- KUMAR, V; MATHELA, C.S.;TEWARI, G.;SINGH, D.; TEWARI, A.K.; BISHT, K.S. Chemical composition and antifungal activity of essential oils from three Himalayan Erigeron species. **Food Science and Technology**, v.56,p. 278-283, 2014.
- LEVETIN; MCMAHON, 2003. **Fungi and human health: Drugs, poisons, patho-gens,allergies**. Disponível em: <http://www.sbs.utexas.edu/mbierner/BIO-305E/Lectures,%20etc/Fungi%20V.pdf>. Acesso em: 29 Jan.2014.
- MARTINS, J. A. S.; SAGATA, E.; SANTOS, V. A.; JULIATTI, F. C. Avaliação do efeito do óleo de *Melaleuca alternifolia* sobre o crescimento micelial *in vitro* de fungos fitopatogênicos. **Bioscience Journal**, v. 27, n. 1, p. 49-51, 2010.
- MEDICE, R., ALVES, E.; ASSIS, R. T.; JUNIOR, R. G. M; LOPES, E. A. G. L. Óleos essenciais no controle da Ferrugem Asiatica da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd, e P. Syd. **Ciencia agrotecnologica**, v.3, n1,p. 83-90, 2007.
- MONTANARI, R. M. et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from Verbenaceae species: alternative sources of (*E*)-caryophyllene and germacrene-D. **Química Nova**, [S.I.], v. 34, n. 9, p. 1550-1555, 2011.
- PIMENTEL, D., MCLAUGHLIN, L., ZEPP, A., LAKITAN, B., KRAUS, T., KLEINMAN, P., VANCINI, F., ROACH, W., GRAAP, E., KEETON, W., SELIG,

G. Environmental and economic effects of reducing pesticide use. **Bioscience**, v. 4, p. 402-409, 1991.

SILVA, M. B.; MORANDI, M. A. B.; PAULA JÚNIOR, T. J.; VENZON, M.; FONSECA, M. C. M. Uso de princípios bioativos de plantas no controle de fitopatógenos e pragas. **Informe Agropecuário**, v. 31, n. 255, p. 70-77, 2010.

SOUZA JÚNIOR, I. T.; SALES, N. L. P.; MARTINS, E. R. Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do maracujazeiro amarelo. **Revista Biotemas**, v. 22, n. 3, p. 77-83, 2009.

SOYLU, E. M.; KURT, S.; SOYLU, S. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, n. 3., p. 183-189, 2010.

**QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE CATEQUINA E EPICATEQUINA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA CASCA DA RAÍZ DA *Mimosa tenuiflora* (WILLD.) POIRET POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDOS DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS (CLAE-DAD)**

# QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE CATEQUINA E EPICATEQUINA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA CASCA DA RAÍZ DA *Mimosa tenuiflora* (WILLD.) POIRET POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDOS DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS (CLAE-DAD)

Pesquisa Institucional desenvolvida no Laboratório de Bioprospecção Vegetal, pertencente ao Grupo de Pesquisa Estudos Químicos e Atividades Biológicas em Produtos Naturais da Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS; Projeto de Mestrado.

Hugo Neves Brandão<sup>1</sup>, José Luiz Carneiro da Rocha<sup>2</sup>, [Maiane dos Santos Neves](mailto:maiane_santos2@hotmail.com)<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Professor Orientador, Doutor em Química, Curso de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, [hugo@uefs.br](mailto:hugo@uefs.br); <sup>2</sup>Aluno do Curso de Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais, bolsista FAPESB, [luiiz\\_farmaco@hotmail.com](mailto:luiiz_farmaco@hotmail.com); <sup>3</sup>Aluna do Curso de Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais, bolsista CAPES, [maiane\\_santos2@hotmail.com](mailto:maiane_santos2@hotmail.com).

## INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais no tratamento e na cura de várias enfermidades está presente na cultura de grande parte da população desde o início da civilização, sendo uma atividade muito comum e altamente difundida. Com a evolução do conhecimento científico, intensificaram-se os estudos das plantas medicinais, relacionando a sua composição química com os seus efeitos terapêuticos, confirmando, muitas vezes, a sua utilização popular. (BEZERRA, 2008; VEIGA JUNIOR *et al*, 2005).

No Brasil, várias pesquisas foram realizadas, não só quanto a aspectos fitoquímicos, mas também quanto à atividade biológica de plantas que ocorrem nos diferentes ecossistemas brasileiros. O estudo de plantas no país é importante para contribuir com o conhecimento fitoquímico e comprovação das propriedades terapêuticas e segurança de muitas espécies utilizadas popularmente, uma vez que o Brasil oferece grande biodiversidade e muitas das quais ainda não foram estudadas (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006; MELENDÉZ; CAPRILES, 2006).

No semiárido nordestino, cuja vegetação predominante é a caatinga, muitas plantas nativas ou exóticas são potencialmente ricas em propriedades medicinais, porém, pouco exploradas ainda pela ciência. A *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret, popularmente conhecida como jurema-preta, é uma leguminosa da subfamília Mimosoideae (Fabaceae), muito utilizada para fins medicinais por comunidades indígenas e populações locais da região nordeste. Está disseminada nos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia (Figura 1) (MAIA, 2004; NUNES *et al*, 2008; OLIVEIRA *et al*, 1999).

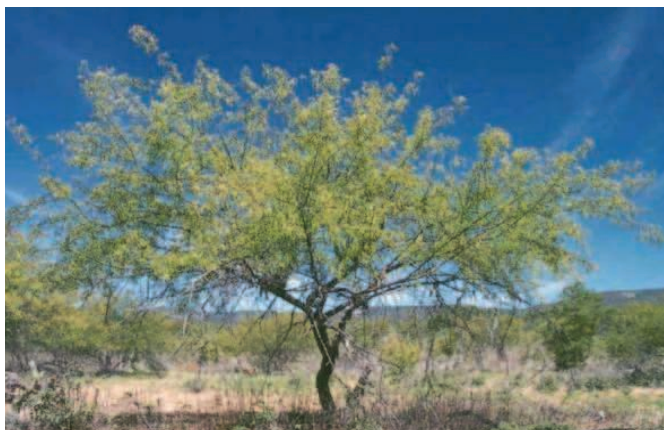
Na medicina popular, as cascas do caule e da raiz da jurema-preta são utilizadas principalmente por comunidades indígenas e populações da região nordeste do Brasil no tratamento de diversas enfermidades, como queimaduras e inflamações (BEZERRA, 2008). Segundo Maia (2004), há pesquisas que demonstram seu potencial antimicrobiano, analgésico, regenerador de células, antitérmico e adstringente peitoral. O uso das cascas, na forma de pó seco, tem-se mostrado eficaz no tratamento tópico de eczemas e inflamações bem como na cicatrização de

feridas e até mesmo no tratamento de doença venosa e úlcera de perna (SOUZA *et al*, 2008; TELLEZ; DUPOY DE GUITARD, 1990).

A jurema-preta é não somente designativa de uma espécie botânica, mas também de uma planta sagrada para os povos indígenas, sendo utilizada tradicionalmente como bebida ritual e religiosa, conhecida como “vinho da jurema” (CAMARGO, 2001).

A composição química da *M. tenuiflora* tem atraído um considerável interesse, principalmente devido à presença de alcaloides indólicos, taninos e flavonóides (SOUZA *et al*, 2008). No entanto, com relação à casca da raiz desta espécie, há poucos estudos descritos na literatura sobre seu perfil fitoquímico e propriedades biológicas, que possam auxiliar na comprovação científica de seu uso na medicina popular.

**Figura 1:** Espécie *Mimosa tenuiflora* (Willd) Poiret



Fonte: APNE/CNIP, [200\_?].

Em estudos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa *Estudos Químicos e Atividades Biológicas em Produtos Naturais* da Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS, avaliou-se a atividade antioxidante do extrato da casca da raiz da *M. Tenuiflora*. Tal atividade foi realizada em laboratório pelo teste do sequestro do radical livre 1,1 – difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), sendo um dos métodos mais comumente empregado que envolve a geração de espécies oxidantes, como no caso do radical DPPH (KUÇUK, 2007). A partir deste ensaio, a jurema-preta demonstrou possuir capacidade antioxidante comparável ao padrão utilizado.

Nos últimos anos, muitas evidências têm indicado que a presença de radicais livres e outros oxidantes está associada a vários fatores como mutação do DNA, oxidação de proteínas e peroxidação lipídica que contribuem tanto no processo de envelhecimento como também em muitas complicações biológicas como inflamações, doenças autoimunes, carcinogênese e disfunções cerebrais. Isso tem aumentado a busca por produtos naturais com ação antioxidante, uma vez que estes são bem indicados para atenuar os efeitos deletérios causados pelo estresse oxidativo celular. O interesse em encontrar substâncias antioxidantes de origem vegetal tem crescido muito recentemente, em função dos possíveis efeitos indesejáveis apresentados pelos antioxidantes sintéticos (CARVALHO, 2004;



FINKEL; HOLBROOK, 2000 *apud* FABRI *et al*, 2011; NUNES *et al*, 2008; SOUSA *et al*, 2007).

Diante dessas informações e, considerando que a casca da raiz da *M. Tenuiflora* apresentou potencial antioxidante significativo, o presente trabalho propõe avaliar a composição de compostos fenólicos do extrato acetato de etila desta planta, através da quantificação do teor de catequina e epicatequina por Cromatografia a Líquidos de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD), uma vez que é relatado que a ação antioxidante de espécies vegetais é atribuída principalmente aos compostos fenólicos. Desta forma, busca-se aprimorar o conhecimento e utilização desta propriedade farmacológica, a partir do uso popular da espécie *M. Tenuiflora*.

## METODOLOGIA

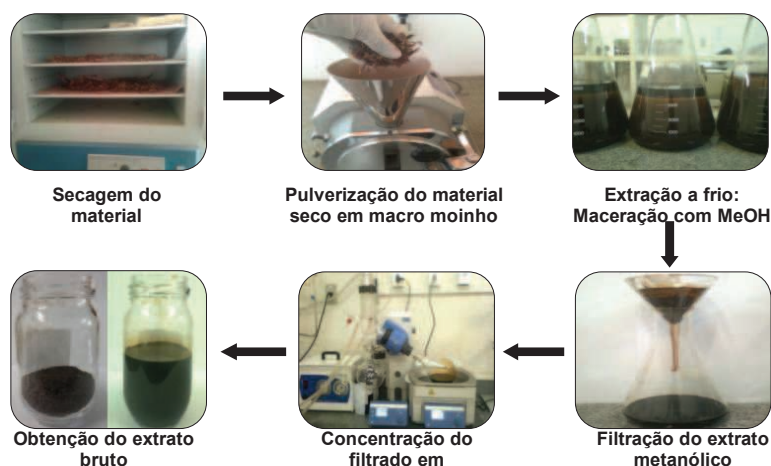
### Coleta e identificação da espécie *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret

As partes aéreas e as raízes da espécie *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. foram coletadas no período da manhã, no município de Rodelas, Bahia, em janeiro de 2013, no Sub-Médio São Francisco, onde a mesma é facilmente encontrada. A identificação botânica da espécie foi realizada pelo professor Luciano Paganucci Queiroz, e em seguida foi depositada a exsicata (NEVES, M. S. 211045 - HUEFS) no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS.

### Preparo do extrato bruto

As cascas das raízes da espécie *M. tenuiflora* foram retiradas e colocadas para secagem em estufa com ar circulante a uma temperatura média de 40°C durante 5 dias, sendo em seguida, trituradas em macro moinho de facas. O pó resultante foi pesado e transferido para erlenmeyers e posteriormente, submetido à técnica de extração a frio, onde foram realizadas 6 macerações, utilizando como solvente o metanol (MeOH). O extrato metanólico obtido foi filtrado e posto para concentrar em rotaevaporador a 60°C, e em seguida, foi transferido para um frasco previamente pesado e identificado. O material concentrado foi colocado na capela para secagem à temperatura ambiente, dando origem ao extrato bruto seco (Figura 2).

**Figura 2:** Preparo do extrato bruto seco a partir das cascas das raízes da *M. tenuiflora*

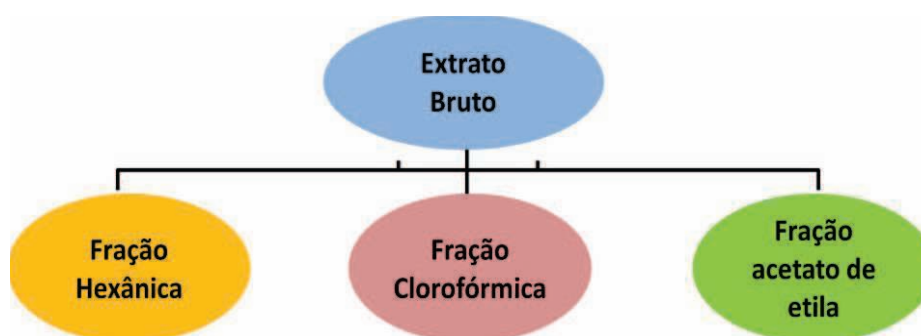


Fonte: PESQUISA EXPERIMENTAL, 2014.

### Preparo das frações

A partição líquido-líquido do extrato bruto da *M. tenuiflora* foi realizada com solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade como hexano, clorofórmio e acetato de etila, utilizando-se como fase aquosa, mistura de água e metanol nas proporções 9:1 e 6:4 para hexano e clorofórmio, respectivamente, e 100% de água para acetato de etila. Desta forma, o extrato bruto seco foi dissolvido em água/metanol (fase aquosa) e posteriormente, transferido para funil de separação, adicionando-se o solvente orgânico (fase orgânica), de acordo com o aumento da polaridade: hexano, clorofórmio e acetato de etila. Após agitação do funil de separação, formaram-se duas fases, as quais foram coletadas separadamente em frascos diferentes. As frações particionadas resultantes, correspondentes às fases orgânicas, foram filtradas e concentradas em rotaevaporador, e por último, postas na capela para secar à temperatura ambiente (Figura 3).

**Figura 3:** Esquema geral para obtenção das frações semipurificadas da *M. tenuiflora*



Fonte: PESQUISA EXPERIMENTAL, 2014.

### Quantificação do teor de catequina e epicatequina por CLAE-DAD

Para a identificação e quantificação do teor de catequina e epicatequina por CLAE-DAD no extrato acetato de etila da espécie *M. tenuiflora* os padrões empregados foram catequina e (-)-epicatequina da marca Sigma-Aldrich. As análises cromatográficas foram feitas em cromatógrafo Varian equipado com uma bomba binária de alta pressão e detector de arranjo de diodo Varian ProStar (Figura 4). A separação cromatográfica foi realizada por meio de coluna LiChroCARTPurospherStaR® RP18-e (250 mm x 4,6 mm i.d.) (5µm) (Merck, Darmstadt, Germany) combinado com pré-coluna apropriada da Merck. As condições cromatográficas incluíram: volume de injeção de 20µL e faixa de comprimento de onda de 220-400 nm, com aquisição em 280 nm.

**Figura 4:** Cromatógrafo Varian



Fonte: PESQUISA EXPERIMENTAL, 2015.

O gradiente de eluição utilizado foi composto pelas soluções de ácido acético 0,7% (Fase A) e acetonitrila:ácido acético 0,7% (8:2 v/v) (Fase B) sendo que as análises foram realizadas com tempo total de 41 minutos, a uma temperatura de 35°C e com fluxo de 1ml/min. As amostras a serem analisadas foram preparadas dissolvendo-se com o solvente orgânico (Fase B) e em seguida foram filtradas em cartucho de extração de fase sólida (SPE) para remover partículas que pudessem interagir com a coluna cromatográfica ou danificá-la e com isso alterar os resultados. Após as amostras serem injetadas, as mesmas foram fortificadas com os padrões e novamente injetadas. A identificação dos compostos foi confirmada comparando-se o tempo de retenção e o espectro de ultravioleta (UV) das amostras em relação aos padrões.

Para a quantificação desses compostos, foram construídas curvas de calibração para cada um dos padrões utilizados. Para isso, foram preparadas seis concentrações do padrão catequina (2; 1,5; 1; 0,5; 0,25 e 0,1mg/mL) e sete concentrações do padrão epicatequina (1; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2; 0,05 e 0,005mg/mL) bem como uma concentração da amostra (3mg/mL), as quais foram injetadas em triplicata no cromatógrafo. A partir das médias das áreas dos picos de cada concentração foram plotados gráficos (área do pico x massa em mg) e através de regressão linear dos pontos originou-se a equação da reta ( $y=ax+b$ ) que permitiu quantificar o teor de cada composto identificado.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Para a quantificação do teor da catequina e epicatequina no extrato acetato de etila da casca da raiz da *M. tenuiflora* foi realizada, inicialmente, a identificação das mesmas a partir da análise do cromatograma da amostra. Desta forma, foi feita uma análise preliminar comparando-se os tempos de retenção encontrados na amostra com os tempos de retenção dos padrões comerciais puros. A confirmação se deu através da co-injeção da amostra adicionada dos padrões puros, em que se analisou novamente seus tempos de retenção (Tabela 1). Além disso, para uma comprovação mais eficiente também foram feitas comparações entre os espectros

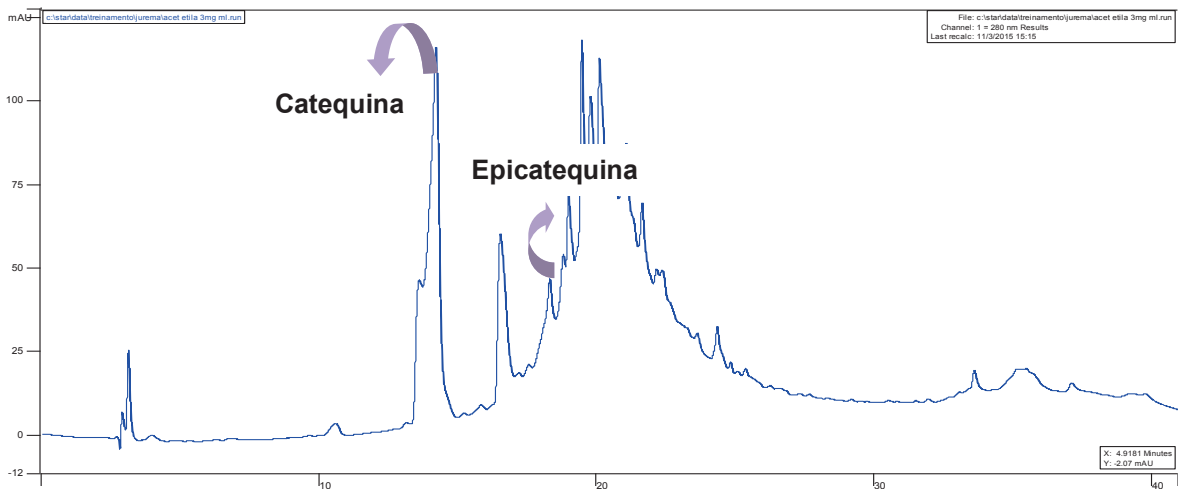
de ultravioleta das substâncias encontradas na amostra com os espectros dos padrões comerciais (Figura 5).

**Tabela 1:** Tempos de retenção dos padrões

Padrões	Tempos de retenção (Tr)
Catequina	15,4'
Epicatequina	19,2'

Fonte: PESQUISA EXPERIMENTAL, 2015.

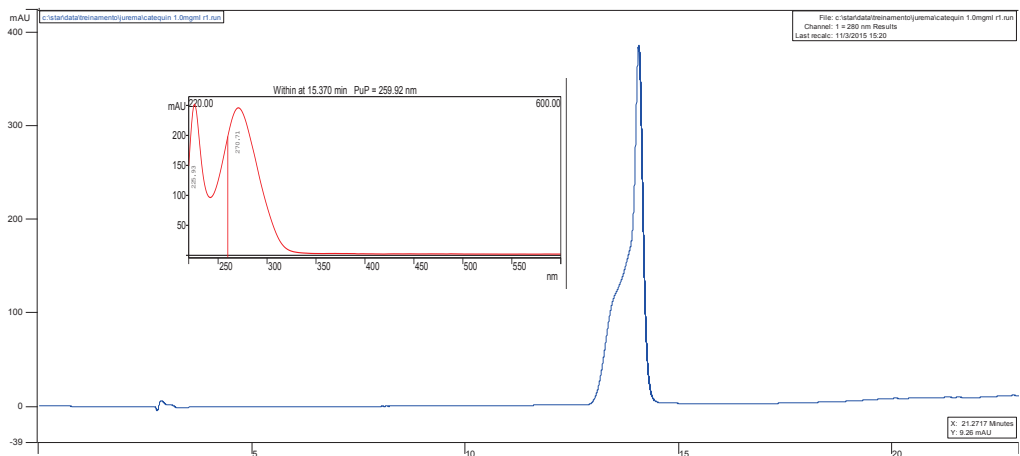
**Figura 5:** Cromatograma do extrato acetato de etila da *M. tenuiflora*



Fonte: PESQUISA EXPERIMENTAL, 2015.

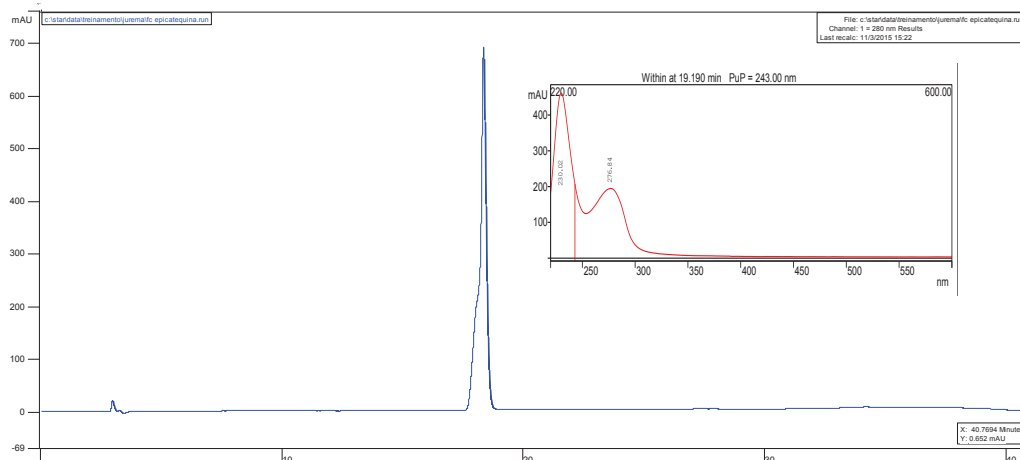
A aquisição dessas substâncias foi realizada em comprimento de onda de 280 nm na região do ultravioleta, pois os compostos fenólicos por possuírem núcleos aromáticos muitas vezes conjugados, apresentam espectros de UV característicos, com um ou mais picos de absorção entre 230 a 340 nm. Estes, por sua vez, podem sofrer ionização provocada por algum composto básico e com isso ter desvio batocrômico entre 15 e 50 nm, acompanhado de aumento de absorbância (Figura 6 e 7) (HARBONE, 1889; ASSIS, 2014).

**Figura 6:** Cromatograma do padrão catequina e seu respectivo espectro no UV



Fonte: PESQUISA EXPERIMENTAL, 2015.

**Figura 7:** Cromatograma do padrão epicatequina e seu respectivo espectro no UV



Fonte: PESQUISA EXPERIMENTAL, 2015

A quantificação das substâncias analisadas foi realizada construindo-se curvas de calibração a partir dos padrões puros. Os teores de catequina e epicatequina encontrados foram de 0,39 mg/ml e 0,014 mg/mL, respectivamente, os quais foram obtidos por interpolação da média das áreas dos picos do extrato acetato de etila contra curva de calibração da catequina e epicatequina (Gráfico 1 e 2).

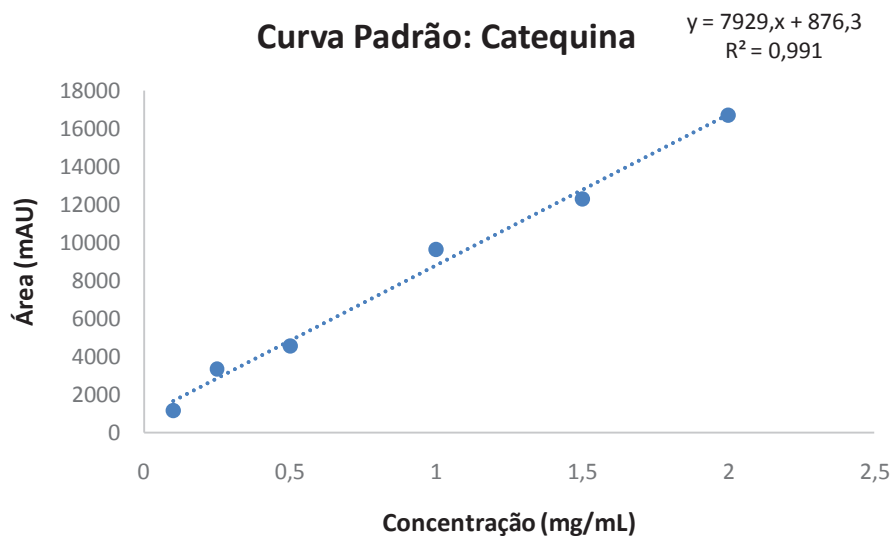
Os teores de compostos fenólicos apresentados no extrato acetato de etila, como a caquetina e epicatequina demonstram correlação positiva com a atividade antioxidante apresentada pela espécie nos experimentos anteriores. Além disso, foi realizada triagem fitoquímica através de testes colorimétricos e ensaios de precipitação anteriormente, em que se indicou a presença de substâncias fenólicas. Realizou-se também quantificação de fenólicos totais através do reagente de Folin-Ciocalteu, em que a *M. tenuiflora* apresentou um alto teor de compostos fenólicos.

A presença dos compostos fenólicos em plantas tem sido muito estudada, recentemente, por estes apresentarem atividades farmacológica e antinutricional e também por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* e a proliferação de fungos (SOARES, 2002; SOUSA *et al*, 2007).

No entanto, não há estudos na literatura analisando a composição fenólica da casca da raiz da espécie *Mimosa tenuiflora*, o que mostra a importância deste trabalho em quantificar o teor de substâncias dessa classe de metabólitos.

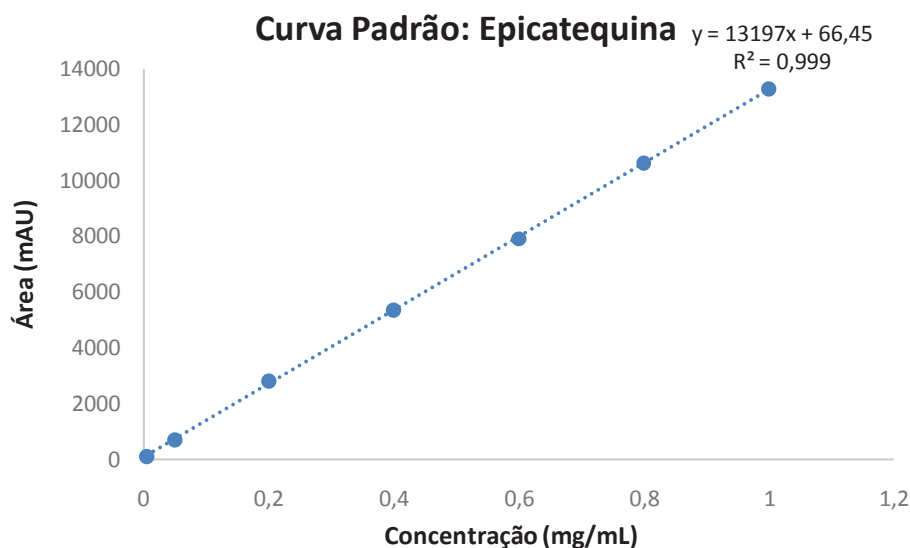
Em um trabalho realizado por Tonello e colaboradores (2012) foi feita a análise de compostos fenólicos de extratos de espécies do gênero *Mimosa* por CLAE-DAD em que se utilizou método semelhante com deste trabalho, onde foram identificados compostos fenólicos na maior parte das espécies.

**Gráfico 1:** Curva de calibração do padrão catequina



Fonte: PESQUISA EXPERIMENTAL, 2015

**Gráfico 2:** Curva de calibração do padrão epicatequina



Fonte: PESQUISA EXPERIMENTAL, 2015

## CONCLUSÃO

A CLAE é uma das técnicas mais empregada na quantificação e identificação de compostos fenólicos, devido a sua eficiência ao realizar separações e análises quantitativas de substâncias em poucos minutos, com alta resolução e sensibilidade.

Com isso, a partir desta técnica foi possível quantificar os teores de catequina e epicatequina do extrato acetato de etila da casca da raiz da *Mimosa tenuiflora*, sugerindo que essa classe de metabólitos secundários contribui particularmente e



mais efetivamente para o seu potencial antioxidante apresentado em experimentos anteriores.

É importante destacar que não existem estudos na literatura avaliando a composição fenólica por CLAE-DAD da casca da raiz da *M. tenuiflora*, com isso o presente estudo contribui com informações acerca do seu perfil fitoquímico, podendo auxiliar na comprovação científica de sua utilização na medicina popular. Além disso, o presente estudo pode contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos, a exemplo de diversos medicamentos que foram desenvolvidos a partir da etnofarmacologia.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Mimosa tenuiflora*. Compostos fenólicos. Cromatografia. Atividade antioxidante

### **AGRADECIMENTOS:**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES;  
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB;  
Universidade Estadual de Feira de Santana- UEFS  
Professor Doutor Hugo Neves Brandão  
Doutorando José Luiz Carneiro da Rocha

### **REFERÊNCIAS**

- ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 678-689, 2006.
- APNE/CNIP. *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. [200?]. Disponível em: [http://www.cnip.org.br/banco\\_img/Jurema%20Preta/mimosatenuiflorawilldpoir3.html](http://www.cnip.org.br/banco_img/Jurema%20Preta/mimosatenuiflorawilldpoir3.html). Acesso em: 03 mar. 2015.
- ASSIS, Maria Lucy Vieira de. **Determinação do potencial antioxidante e quantificação de compostos fenólicos por CLAE em acessos de *Capsicum baccatum* var. *pendulum***. 2014. 139 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes – RJ, 2014.
- BEZERRA, Denise Aline Casimiro. **Estudo fitoquímico, bromatológico e microbiológico de *Mimosa tenuiflora* (Willd) Poiret e *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke**. 2008. 63 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Campina Grande, Patos-PB, 2008.
- CAMARGO, M. T. L. Contribuição ao estudo Etnofarmacobotânico de bebida ritual de religiões afro-brasileiras denominada “jurema”, à base de *Mimosa hostilis* Benth. Leguminosae – Mimosoideae e seus aditivos psicoativos. In: CONFERÊNCIA DO X SIMPÓSIO LATINOAMERICANO E VII SIMPÓSIO ARGENTINO DE FARMACOBOTÂNICA. Comodoro Rivadaria. **Anais eletrônicos**. Comodoro Rivadaria: Herbarium, 2001. Disponível em: <<http://www.aguaforte.com.br>>. Acesso em: 08 mar. 2015.
- CARVALHO, José Carlos Tavares. **Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**, Ribeirão Preto, SP: Tecmedd, 2004.

FABRI, R. L.; NOGUEIRA, M. S.; DUTRA, L. B.; BOUZADA, M. L. M.; SCIO, E. Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família Asteraceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.13, p.183-189, 2011.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 480, p. 239-47, 2000.

HARBONE, J. B. General procedures and measurement of total phenolics. *In*: DEY, P. M.; HARBONE, J. B. **Methodos plant biochemistry**, v.1: pant phenolics. (ed). Londom: Academic press, 1989.

KUÇUK, M. *et al.* Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. **Food Chemistry** . v. 100, p. 526–534, 2007.

MAIA, G. N. **Caatinga** - árvores e arbustos e suas utilidades. São Paulo: D&Z Computação Gráfica e Editora, 2004.

MELENDÉZ, P. A., CAPRILES, V. A. Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico. **Phytomedicine**. v.13, p. 272-276, 2006.

NUNES, X. P.; MESQUITA, R. F.; SILVA, D. A.; LIRA, D. P.; COSTA, V. C. O.; SILVA, M. V. B.; XAVIER, A. L.; DINIZ, M. F. F. M.; AGRA, M. de F.. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.18, p. 718-723. 2008.

OLIVEIRA, M. R.; RODRIGUES, J. M. E.; CHIAVONE-FILHO, O., MEDEIROS, J. T. N. Estudo das condições de cultivo da Algaroba e Jurema-preta e determinação do poder calorífico. **Revista de Ciência & Tecnologia**, v.14, p. 93-104, 1999.

SOARES, Sérgio Eduardo. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista Nutrição**, Campinas- SP, v. 15, p. 71-81, 2002.

SOUSA, C. M. de M.; SILVA, R. H.; JÚNIOR, G. M. V.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S. da; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351-355. 2007.

SOUZA, R. S. O. de; ALBUQUERQUE, U. P. de; MONTEIRO, J. M.; AMORIM, E. L. C. de. Jurema-Preta (*Mimosa tenuiflora* [Willd.] Poir.): a review of its traditional use, phytochemistry and pharmacology. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 937-947, 2008.

TELLEZ, P. J.; DUPOY DE GUITARD, J. Pharmaceutical preparation containing *Mimosa tenuiflora* extract with skin-regenerating properties. **Patent Eur Pat Appl.**, v. 349, p. 469, 1990.

TONELLO, M. L.; FUENTEFRIA, A. M.; LANA, A. J. D.; MORAIS, C. B.; SILVA, F. E. K.; ZUANAZZI, J. A. S. Estudo dos compostos fenólicos de espécies da família Leguminosae (Fabaceae) do Sul do Brasil e atividade antifúngica. **Revista Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, Porto Alegre, v. 32, Suplemento, 2012.

VEIGA JÚNIOR, F. V.; PINTO, A. C. Plantas Mediciniais: Cura Segura?. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 28, p. 519-528, 2005.

**TEOR DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia origanoides* H.B.K. EM  
DIFERENTES TEMPOS DE EXTRAÇÃO**

## TEOR DE ÓLEO ESSENCIAL DE *LIPPIA ORIGANOIDES* H.B.K. EM DIFERENTES TEMPOS DE EXTRAÇÃO

Sara Samanta da Silva Brito<sup>1</sup>; Francis Almeida da Silva<sup>2</sup>; Simone Teles<sup>3</sup>; Natacha Nara Gonçalves de Mello da Conceição<sup>4</sup>, Natielli Conceição Santos<sup>5</sup>, Franceli da Silva<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Aluna de Doutorado Curso de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Bolsistas CAPES, E-mail: [sarassbrito@gmail.com](mailto:sarassbrito@gmail.com); [fansilva\\_almeida@gmail.com](mailto:fansilva_almeida@gmail.com);

<sup>2</sup> Aluno de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Bolsistas CAPES, E-mail: [fansilva\\_almeida@gmail.com](mailto:fansilva_almeida@gmail.com);

<sup>3</sup> Pós – Doc, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Bolsista FAPESB, E-mail: [telessimone@gmail.com](mailto:telessimone@gmail.com);

<sup>4</sup> Aluna do curso de Graduação em Agroecologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, E-mail: [natacha.nara1@gmail.com](mailto:natacha.nara1@gmail.com);

<sup>5</sup> Aluna do curso de Graduação em Engenharia Florestal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, E-mail: [natacha.nara1@gmail.com](mailto:natacha.nara1@gmail.com); [nat.csantos@hotmail.com](mailto:nat.csantos@hotmail.com);

<sup>6</sup> Professora orientadora, Curso de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, E-mail: [franceli.silva@gmail.com](mailto:franceli.silva@gmail.com).

**Resumo:** A eficácia do método de extração de óleo essencial é fundamental para a obtenção da produção máxima de óleo em função do material vegetal utilizado assim como a certeza da não alteração da composição química do mesmo. Sendo necessário um baixo custo, velocidade constante e simplicidade do processo, assim o presente trabalho objetivou-se avaliar o melhor tempo de extração dos óleos essenciais de *Lippia origanoides* H.B.K. visando a otimização do processo. O experimento foi realizado no laboratório de Fitoquímica da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, campus Cruz das Almas – BA, as amostras de *Lippia origanoides* H.B.K. foram coletadas no horto florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana – BA. A parte aérea das plantas foram secas em estufa com circulação forçada à 40°C, após a secagem foi feita a separação do caule e folha, e, em seguida, 1 g das folhas em triplicata foi utilizada na determinação do teor de umidade. Foram utilizadas 60 g para cada amostra submetidas ao processo de hidrodestilação em vapor usando um aparelho do tipo Clevenger, o processo de extração foi conduzido durante 3 horas, contadas a partir da condensação da primeira gota, sendo verificado o volume de óleo extraído na coluna graduada do aparelho de Clevenger. Para verificação do tempo de extração o volume de óleo extraído foi verificado em intervalos de 30 min e o teor do óleo essencial foi calculado a partir da base livre de umidade, que corresponde ao volume (mL) de óleo essencial em relação a massa seca. De acordo com os resultados obtidos podemos observar que o teor do óleo essencial de *Lippia origanoides* variou de 1.15 a 2.16%, sendo o maior teor no tempo de 180 min de extração.

**Palavras chave:** Plantas medicinais, Hidrodestilação, compostos voláteis.

**Abstract:** The efficiency of the essential oil extraction methodology is fundamental for obtaining maximum oil yield relatively to the plant material, as well as in order to

ensure that no changes are inflicted in its chemical composition. It is necessary a low cost, with constant speed simple process, so within this study the main objective is to evaluate the optimal time of extraction of essential oils of *Lippia origanoides* H.B.K aiming for extraction process optimization. The experiment was conducted in the Phytochemistry Laboratory of the Federal University of Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas – BA. The samples of *Lippia origanoides* H.B.K. were collected in the Horto Florestal in the State University of Feira de Santana – BA. The aerial part of the plant was dried at 40 °C, after drying was performed a separation of stems and leaves, and then 1 g of leaves in triplicate was used to determine the moisture content. One hundred grams were used for each sample subjected to the process hydrodistillation process in a Clevenger-type apparatus during 3 h, counted from the first drop of condensation. The volume of oil extracted was verified in a graduated column Clevenger-type apparatus. The collected oil was then stored in sealed vials at -5 °C and protected from the light with aluminum foil. The extraction yield was calculated in mL of oil per 100 g of dried material. To verify the optimum extraction time the extracted oil volume was measured each 30 min and its content was calculated from the moisture-free basis, which is the volume (mL) of essential oil in relation to dry mass. According to the obtained results, we can observe that the essential oil content of *Lippia origanoides* ranged from 1:15% to 2:16%, with the highest content being recorded at 180 min of extraction.

**Key Words:** Medicinal plants, hydrodistillation, volatile compounds

## Introdução

O Brasil é considerado o país com maior biodiversidade no mundo, cerca de 17% das plantas apenas foram estudadas quanto ao seu emprego medicinal e ainda sem aprofundamento no aspecto fitoquímico e farmacológico demonstrando assim o enorme potencial a ser descoberto (CRAGG e NEWMAN, 1999; HAMBURGUER, MARSTON, HOSTETMANN, 1991).

O óleos essenciais são misturas complexas de substâncias, odoríferas e líquidas, provenientes do metabolismo secundário das plantas. Possuem quase sempre um aroma agradável, incolores ou ligeiramente amarelados de aparência oleosa e diferem dos óleos fixos por possuírem alta volatilidade. Estão localizados em estruturas secretoras especializadas, como pelos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas, canais oleíferos ou ainda em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas e podem ocorrer em apenas um órgão vegetal ou em toda a planta (MARTINS et al. 1998; CARDOSO et al. 2001; SIMÕES & SPITZER, 2004).

Apresentam composição química muito variada, são formados por ésteres de ácidos graxos, terpenóides, fenilpropanonas, álcoois, aldeídos entre outros. Porém os mais encontrados são terpenos como monoterpenos e sesquiterpenos chegando a cerca de 90% (SIMÕES et al, 2007).

O mercado atual de óleos essenciais é extenso e crescente sendo utilizado na indústria alimentícia, farmacêutica, e química na produção de novos produtos para a agricultura. Brasil, China, Índia e Indonésia são considerados os quatro maiores produtores mundiais, sendo o Brasil o terceiro maior exportador com 91% das exportações de óleos essenciais de cítricos, principalmente laranja (SOUZA et al.,

2010). Cerca de 3000 óleos são produzidos atualmente provenientes de plantas, destas 300 espécies são importantes do ponto de vista comercial gerando cerca de 40.000 a 60.000 toneladas por ano com valor de mercado estimado em 700 milhões de dólares (DJILANI AND DICKO, 2012).

Dentre as diversas formas de uso destes óleos podemos destacar o uso em indústrias farmacêuticas, em cosméticos, proporcionar aroma e sabor a alimentos além do uso constante e crescente na indústria agrícola, pelas propriedades antifúngicas, antibacteriana e inseticida (SACCHETTI et al., 2005).

Podem ser obtidos de diversas partes da planta e através de vários processos, em 93% dos casos o método de destilação a vapor é utilizado, os 7% restantes são utilizados a hidrodestilação, extração por solventes, enfleurage, prensagem a frio entre outras, o que vai ser definido pela parte utilizada da planta, quantidade e dos compostos a serem extraídos em função da sua utilização (GUENTHER, 1972; MASANGO, 2001; 2005).

A escolha do método é de extrema importância pois deve-se garantir que a composição química do óleo não será alterada. Além da eficácia do método, a produção máxima de óleo em função do material vegetal utilizado sendo necessário ter um baixo custo, velocidade e simplicidade do processo (PAVIA et al., 2004; GAVAHIAN et al., 2015).

O método da hidrodestilação é bastante utilizado para o isolamento de materiais voláteis no caso dos óleos essenciais. Neste método o material vegetal a ser destilado fica em contato direto com a água, o processo se inicia quando esta entra em ebulição e arrasta os compostos voláteis consigo inclusive o óleo, condensa quando entra em contato com água gelada e dessa forma gera uma mistura heterogênea, com duas fases, devido à diferença de polaridade e densidade entre a água e o óleo (OLIVEIRA & SOUZA, 2012).

O grande desafio no uso de plantas medicinais e aromáticas é a obtenção da produtividade estável, em qualidade e quantidade desejada uma vez que a produção dos metabólitos e seus princípios ativos variam em função de vários fatores como ambientais, genéticos além do método e tempo de extração (OLIVEIRA et al., 2012). De acordo com Charles e Simon (1990) o método de extração utilizado para a obtenção do óleo essencial influencia diretamente no seu conteúdo.

Assim, objetivou-se avaliar o melhor tempo de extração dos óleos essenciais de *Lippia organoides* H.B.K. visando a otimização do processo.

## **Metodologia**

O experimento foi realizado no laboratório de Fitoquímica da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, campus Cruz das Almas - BA.

### **Coleta e preparação do material vegetal**

As amostras de *Lippia organoides* H.B.K. foram coletadas no horto florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana – BA (Figura 1).



A parte aérea das plantas foram secas em estufa com circulação forçada à 40°C até obter peso constante. Após a secagem da parte aérea, foi feita a separação do caule e folha. Parte do material seco foi separado para determinação do teor de umidade. O procedimento foi realizado em triplicata, sendo utilizado 3g das folhas secas em estufa de circulação forçada à 40°C durante 48hs.



**Figura 1:** *Lippia origanoides* H.B.K.

### **Extração do óleo essencial**

Amostras de 60g de folhas + inflorescência secas e rapidamente trituradas em liquidificador, foram adicionadas em balão de três litros contendo água destilada o suficiente para cobertura total do material vegetal. Foram adotados aparatos do tipo Clevenger graduados, acoplados em balões de vidro, que foram aquecidos por mantas térmicas elétricas com termostato (Figura 2).

O processo de extração foi conduzido durante 3 horas, contadas a partir da condensação da primeira gota, sendo verificado o volume de óleo extraído na coluna graduada do aparelho de Clevenger. Para verificação do tempo de extração o volume de óleo extraído foi verificado em intervalos de 30 min.

Com objetivo de remover a água residual foi adicionado ao óleo essencial sulfato de sódio anidro para evitar perdas por hidrólise durante o armazenamento. Posteriormente, com o uso de pipeta do tipo Pasteur, o óleo foi acondicionado em frasco de vidro de 2 mL envolto em papel alumínio, etiquetado e armazenado em congelador comercial a -5 °C ao abrigo da luz.



**Figura 2:** Aparelho tipo Clevenger utilizado na hidrodestilação.

### **Teor do óleo essencial**

O teor do óleo essencial foi calculado a partir da base livre de umidade, que corresponde ao volume (mL) de óleo essencial em relação a massa seca; a partir da fórmula:

$$To = \frac{Vo}{\frac{Bm - (Bm \times U)}{100}} * 100$$

Onde: To = teor do óleo (%);  
Vo = volume do óleo extraído;  
Bm = biomassa vegetal;  
(Bm x U) = quantidade de umidade presente na biomassa;  
Bm – (Bm x U) = biomassa seca.

Após à análise de variância, os resultados foram submetidos a análise de variância mediante o uso do programa SISVAR versão 5.3 (FERREIRA, 2011).

## Resultados e Discussão

De acordo com os resultados obtidos podemos observar que o teor do óleo essencial variou de 1.15 a 2.16%. Segundo alguns autores o óleo essencial de *L. organoides* H.B.K. tem apresentado alta variabilidade quanto ao teor, com uma amplitude de 1 a 4,6% da massa de suas folhas (OLIVEIRA et al., 2007; CAVALCANTE et al., 2009). O máximo de teor de óleo extraído foi obtido aos 180 min, apresentando um volume de 0.95 mL (Tabela 1).

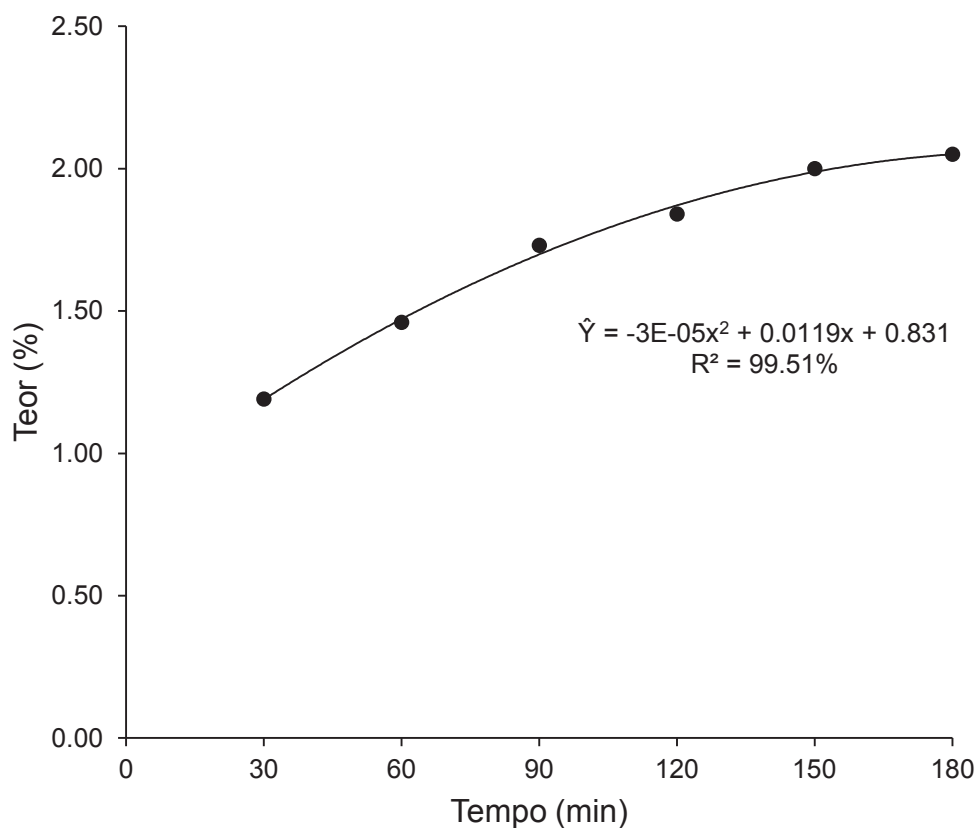
**Tabela 1.** Volume de óleo essencial extraído das folhas+inflorescência de *Lippia organoides* H.B.K.

Tempo de extração (min)	Volume de óleo (mL)
30	0.55
60	0.68
90	0.80
120	0.85
150	0.92
180	0.95

Na figura 3, pode ser observado que à medida que aumentou o tempo de extração houve um aumento no teor de óleo essencial extraído das folhas+inflorescência de *Lippia organoides*, sendo que o teor de óleo tendeu a estabilização a partir dos 150 min.

Estudos realizados por Oliveira et al. (2012) com outras espécies produtoras de óleos essenciais, avaliando os mesmos tempo utilizados neste trabalho (30, 60, 90 e 120 min) observaram que após 60 minutos de hidrodestilação obteve-se 0,5 mL e após isso ocorreu a estabilização tornando-se constante esse volume.

Já para Ehlert et al. (2006) com outras espécies medicinais foi encontrado um menor tempo de extração para obter o mesmo volume (0.5 mL), sendo: 130 minutos de extração para *Cymbopogon citratus*, 150 minutos para as espécies *Cymbopogon winterianus*, *Aristolochia* sp, *Hyptis pectinata* e *Hyptis fruticosa*, 160 minutos para *Lippia sidoides* e 230 minutos para *Eucalyptus globulus*. Observa-se que essa diferença ocorre não apenas entre diferentes espécies, mas também dentro da mesma espécie.



**Figura 3:** Teor de óleo essencial em relação ao tempo de hidrodestilação de *Lippia origanoides* H.B.K.

Prins et al. (2006) ao avaliarem o teor do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* nos tempos 30, 60, 90 e 120 min de extração observaram que os tempos 90 e 120 min favorecem significativamente o rendimento do óleo essencial sendo de 1,15 e 1,18 mL respectivamente.

Ao avaliar a extração do óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. em 1, 2 e 3 horas utilizando dois métodos de extração (hidrodestilação e extração por solvente), Jakiemiu (2008) observou que pelo método da hidrodestilação o rendimento variou de 1,35% para uma hora de extração e 1,82% para três horas de extração. Para as espécies *Hyptis pectinata*, *Hyptis fruticosa* e *Lippia sidoides* os valores máximos de teores de óleos essenciais foram obtidos nos tempos de 150, 140 e 160 minutos, respectivamente (CAMPOS et al., 2004).

Os resultados apresentados pelos diferentes autores demonstram que cada espécie aromática possui um tempo ideal para extração máxima dos óleos essenciais. Esses óleos são largamente utilizados nas indústrias alimentícias, cosméticas, farmacêuticas e recentemente na agricultura (COSTA, 2008; SOYLU et al.2010).

Devido à demanda de utilização dessas substâncias, o estudo prévio dos fatores que influenciam a hidrodestilação torna-se cada vez mais importante, uma vez que, maiores quantidades voláteis podem ser obtidas de acordo com o tempo estabelecido para extração.

## Conclusão

O máximo teor de óleo essencial obtido das folhas+inflorescência de *Lippia origanoides* H.B.K. é obtido aos 180 min de extração.

## Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia pela infraestrutura para realização da pesquisa;

À FAPESB, CAPES e CNPq pelo financiamento dos projetos e concessão das bolsas aos alunos de Pós-graduação.

## Referências

- CAVALCANTE, I.M.S.M. et al. Potencial Mutagênico (Teste de micronúcleos) e composição química dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Lippia origanoides*. In: 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Fortaleza-CE, Anais...Fortaleza: Adaltech Soluções para eventos, 2009.
- CHARLES, D.J.; SIMON, J.E. Comparison of extraction methods for the rapid determination of essential oil content and composition of basil (*Ocimum* spp.). *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v.115, n.3, p.458-62, 1990.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Discovery and Development of Antineoplastic Agents from Natural Sources. *Cancer Investigation*, vol.17, n. 2, p. 153-163. 1999.
- COSTA, L. C. B. Condições culturais, anatomia foliar, processamento e armazenamento de *Ocimum selloi* em relação ao óleo essencial. 161f. Dissertação (Doutorado em Agronomia), Universidade Federal de Lavras. Lavras – MG, 2008.
- DJILANI, A.; DICKO, A. The therapeutic benefits of essential oils. In: Bouayed, J., Bohn, T. (Eds.), *Nutrition, Well-being and Health*. InTech, Croatia, pp. 155–178, 2012.
- EHLERT, P.A.D.; BLANK, A.F.; ARRIGONIBLANK, M.F.; PAULA, J.W.A.; CAMPOS, D.A.; ALVIANO, C.S. Tempo de hidrodestilação na extração de óleo essencial de sete espécies de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 8: 79-80, 2006.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia (UFLA)*, v.35, n.6, p. 1039-1042, 2011.
- GAVAHIAN, M.; FARAHNAKY, A.; FARHOOSH, R.; JAVIDNIA, K.; SHAHIDI, F. Extraction of essential oils from *Mentha piperita* using advanced techniques: Microwave versus ohmic assisted hydrodistillation. *Food and Bioproducts Processing* 94, 50–58, 2015.
- GUENTHER, E. *The essential oils*. Huntington, N.Y.: R.E. Krieger, v.6, 1972.
- HAMBURGER, M.; MARSTON, A.; HOSTETMANN, K. Search for new drugs of plant origin. *Advances in Drug Research*, 20, p.167-169, 1991.
- JAKIEMIU, E. A. R. Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris* L.). 89 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

MASANGO, P. Towards understanding steam distillation of essential oils by differential quantification of principal components using capillary gas chromatography (Ph.D. thesis), University of Surrey, 2001.

MASANGO, P. Cleaner production of essential oils by steam distillation, *Journal of Cleaner Production* 13, 833–839, 2005.

OLIVEIRA, D.R. et al. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. *Food Chemistry*, v. 101, p. 236–240, 2007.

OLIVEIRA, A.R.M.F.; JEZLER, C.N.; OLIVEIRA, R.A.; MIELKE, M.S.; COSTA, L.C.B. Determinação do tempo de hidrodestilação e do horário de colheita no óleo essencial de menta. *Horticultura Brasileira* 30: 155-159, 2012.

OLIVEIRA, W.P.; SOUZA, M.E.A.O. Comparação dos métodos extração de óleo essencial de arraste a vapor e hidrodestilação utilizando casca de manga nos estados de desidratação e in natura. *Anais CONGRESSO NORTE NORDESTE DE PESQUISA E INOVAÇÃO, TOCANTIS*, 2012.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; ENGEL, R.G. *Introduction to Organic Laboratory Techniques: A Small Scale Approach*, Cengage Learning, Stamford, USA, 2004.

PRINS, C.L.; LEMOS, C.S.L.; FREITAS, S.P. Efeito do tempo de extração sobre a composição e o rendimento do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.8, n.4, p.92-95, 2006.

SACCHETTI, G. et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, London, v.91, n.4, p.621-632, Aug.2005.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Ed. 6a, Porto Alegre, ED. UFRGS, 1102p, 2007.

SIMÕES, C.M.O., SPITZER, V. Óleos voláteis. In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, p.468-495, 2003.

SOUZA, S. A. M.; MEIRA, M. R.; FIGUEIREDO, L. S.; MARTINS, E. R. Óleos essenciais: aspectos econômicos e sustentáveis. *Enciclopédia Biosfera*, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v. 6, n.10, p. 1-11, 2010.

SOYLU, E. M.; KURT, S.; SOYLU, S. In vitro and in vivo antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 143, n. 3., p. 183-189, 2010.

VEGAVELA, N.E.; DELGADOAVILA, W. A.; CHACON SANCHEZ, M. I.I. Genetic structure and essential oil diversity of the aromatic shrub *Lippia origanoides* Kunth (Verbenaceae) in two populations from northern Colombia. *Agronomía Colombiana*, vol.31, n.1, p. 517, 2013.

VICUÑA, G. C., STANSHENKO, E. E., FUENTES, J. L. Chemical composition of de *Lippia origanoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. *Fitoterapia*, v.81, p.343-349, Oct. 2010.



**ASPECTOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS DO GÊNERO *Lippia*  
COM ÊNFASE NA ESPÉCIE *L. thymoides* MART. & SCHAUER**

## ASPECTOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS DO GÊNERO *LIPPIA* COM ÊNFASE NA ESPÉCIE *L. THYMOIDES* MART. & SCHAUER.

Robson Argolo dos Santos<sup>1</sup>; Vanessa França Chaves<sup>2</sup>; Pedro Alcantara da Silva Abreu<sup>3</sup>; Romeu da Silva Leite<sup>4</sup>; Luma dos Passos Bispo<sup>5</sup>; Lenaldo Muniz de Oliveira<sup>6</sup>

1 Aluno do Curso de Graduação em Agronomia, bolsista FAPESB, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), e-mail: argolo.agro@gmail.com.

2 Aluna do Curso de Graduação em Agronomia, bolsista PIBIC/CNPq, UEFS, e-mail: vanessafranca2011@hotmail.com

3 Aluno do Curso de Graduação em Agronomia, bolsista FAPESB, UEFS, e-mail: pedro\_804@outlook.com.

4 Aluno do Curso de Graduação em Agronomia, bolsista FAPESB, UEFS, e-mail: leiteromeu@hotmail.com.

5 Aluna do Curso de Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais, bolsista CAPES, e-mail: luma.pb@hotmail.com

6 Professor Orientador, Doutor em Fisiologia Vegetal do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, UEFS, email: lenaldo.uefs@gmail.com.

### Introdução

Segundo a geografia convencional, o Nordeste brasileiro é dividido em zonas litorâneas, agreste e sertão, sendo esses dois últimos responsáveis por formar a região semiárida que compreende 925.043 km<sup>2</sup>, ou seja, 55,6% do Nordeste (SILVA, 2012), o qual está inserido a caatinga, único bioma exclusivamente brasileiro com grande biodiversidade e potencial vegetal. Segundo Sá et al. (2003) o bioma é dividida em quatro zonas de acordo com a integração entre vegetação e solo: domínio de vegetação hiperxerófila, domínio de vegetação hipoxerófila, ilhas úmidas e agreste e área de transição.

A região ocupada pela caatinga possui um grande número de espécies vegetais endêmicas, porém há uma precariedade sobre seu conhecimento botânico por serem tipos de vegetação menos estudados no Brasil e é também um dos que mais sofreu antropização (CASTELLETTI et al., 2000), encontrando-se muito devastada e, conseqüentemente, com potencial de produção drasticamente reduzido (MAIA, 2004). Apesar de toda essa problemática a cerca deste bioma, estudos recentes indicaram que aproximadamente 1.512 espécies ocorrem na caatinga (QUEIROZ et al., 2006), das quais muitas são utilizadas com potencial medicinal, principalmente as plantas que pertence a família Verbenaceae.

A família Verbenaceae está incluso na ordem Lamiales e compreende cerca de 36 gêneros e 1000 espécies de distribuição pantropical, mas principalmente neotropical. No Brasil, existem 17 gêneros (*Aloysia*, *Baillonia*, *Bouchea*, *Casselia*, *Citharexylum*, *Duranta*, *Glandularia*, *Lantana*, *Lippia*, *Monochilus*, *Petraea*, *Phylla*, *Priva*, *Stachytarpheta*, *Tamonea*, *Verbena* e *Verbenoxylum*) e aproximadamente 250 espécies. As espécies desta família são ervas ou arbustos, mas algumas são árvores ou lianas e muitas são aromáticas (SOUZA & LORENZI, 2005).

O gênero *Lippia* é um dos dois maiores da família Verbenaceae, reunindo aproximadamente 200 táxons entre ervas, arbusto, subarbustos e pequenas árvores, frágeis, ascendentes, geralmente aromáticos com glândulas nas folhas (SALIMENA, 2000; VICCINE), cujos maiores centros de dispersão se encontram em países das Américas do Sul e Central, como também em territórios da África tropical (TERBLANCHÉ et al., 1996; PASCUAL et al., 2001), sendo de grande importância para a flora do semiárido devido a sua representatividade e utilização econômica como condimentar ou medicinal. Os principais centros de diversidade específica do gênero *Lippia* estão localizados no México e Brasil, onde o maior número de espécies se encontra na Cadeia do Espinhaço, localizada nos estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás (OLIVEIRA et al., 2007).

A espécie enfatizada neste trabalho, *L. thymoides*, também conhecida popularmente como alecrim do mato ou alecrim do campo, é uma planta arbustiva com 0,5 a 1,5 m de altura, ramos glabros, quadrangulares. Folhas opostas nos ramos normais, fasciculadas nos braquiblastos, discolores, coriáceas, 0,5 a 1 cm de comprimento; pecioladas; pecíolo com 0,5 a 0,8 mm de comprimento, membranácea, oblanceolada a espatulada, ápice arredondado, margem inteira, base atenuada; venação hifódroma. Inflorescência até 6 mm de comprimento, axilares, solitárias, subglobosas, compactas, cerca de 1 cm de comprimento; brácteas imbricadas, oval-lanceoladas, ápice agudo cimeira helicoidal. Flores pediceladas, pedicelo com 0,3 a 0,4 cm de comprimento, cálice, cilíndrico, lacínios lanceolados, pubescentes externamente, glabros internamente; corola salverforme, branca a amarelo-alaranjado, lobos 1,2 a 1,5 mm de comprimento, arredondados, pubescentes externamente e glabros internamente; estames-6, tetradínamos, filetes glabros, anteras lanceoladas; ovário glabro (MELO et al., 2010; SALIMENA & SILVA, 2009). É uma espécie endêmica do Brasil, podendo ser encontrada apenas em dois estados, Bahia e Minas Gerais, tendo seu estado fitogeográfico distribuídos nos biomas caatinga e cerrado, e está listada no banco de dados de plantas do Nordeste (SALIMENA et al., 2010; GAMARRA-ROJAS et al., 2012).

## **Metodologia**

O trabalho é uma revisão de literatura, realizada entre fevereiro e março de 2015, no qual foi elaborada com base em referências teóricas, parte adquirida no maior portal de comunicação atual, a internet, e também utilização da biblioteca. Foi coletado de sites que passam uma maior confiança das informações, como portal da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), o periódicos da SciELO (Scientific Electronic library Online), e leituras citadas da biblioteca.

Os critérios de inclusão para os estudos encontrados foram a abordagem sobre a descrição de plantas medicinais, sobre tudo, o gênero *Lippia*, enfatizando a espécie *L. thymoides*, com potencial biotecnológico na região semiárida do Nordeste brasileiro.

## **Resultados e discussão**

Através da Cromatografia Gasosa pôde-se observar a composição química do óleo essencial de muitas espécies de *Lippia*. Com base em dados publicados, percebe-se que as substâncias como limoneno,  $\beta$ -cariofileno, *p*-cimeno, cânfora, linalool,  $\alpha$ -

pineno, e timol, são os componentes que aparecem com maior frequência nesse gênero (PASCUAL et al., 2002; CRAVEIRO et al., 1981). A secreção desses óleos essenciais tem sido associada à presença de tricomas, os quais normalmente são de formas variadas entre grupos vegetais, mas em geral uniformes dentro de um mesmo táxon (SANTOS et al., 2004), estando estabelecido pelas literaturas que fatores abióticos, como incidência de chuvas, disponibilidade de água, radiação solar e stress induzido por ozônio, e bióticos, como presença de insetos, fungos e alelopatia, podem alterar a produção e emissão dos componentes voláteis das plantas (LINDSKOG & POTTER, 1995; MAFFEI, M. E., 2010; ORMEÑO et al., 2007).

Silva (2012) identificou 45 constituintes na composição química do óleo essencial das folhas *L. thymoides* coletado nas quatro estações do ano (**veja tabela 1**), evidenciado o grande potencial químico da espécie, e tendo como composto majoritário os sesquiterpeno e  $\beta$ -cariofileno.

**TABELA 1:** Composição química do óleo essencial das folhas *L. thymoides*.

Fórmula	Constituinte	IK <sub>L</sub>	TOO		TOI		TOP		TOV	
			IK <sub>C</sub>	%	IK <sub>C</sub>	%	IK <sub>C</sub>	%	IK <sub>C</sub>	%
C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	$\alpha$ -Tujeno	930	930	0,11	930	0,09	930	0,27	-	-
C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	$\alpha$ -Pineno	932	938	1,81	938	0,94	938	2,38	931	1,42
C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	Canfeno	946	953	5,44	953	2,64	954	5,66	943	3,25
C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	Sabineno	969	976	1,31	978	0,93	976	1,72	962	0,67
C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	$\beta$ -Pineno	974	980	1,16	980	0,64	980	1,43	965	1,70
C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	$\beta$ -Mirceno	988	991	0,94	991	0,49	991	0,94	-	-
C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	$\alpha$ -Felandreno	1002	1007	0,08	1006	0,07	-	-	-	-
C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	3-Careno	1008	1013	0,27	1013	0,23	1013	0,26	-	-
C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	$\alpha$ -Cimeno	1022	1026	0,47	1026	0,91	1027	2,69	1027	1,12
C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	Limoneno	1029	1032	3,63	1032	2,42	1032	3,75	1032	1,67
C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	1,8-Cineol	1031	1034	3,04	1034	3,88	1034	4,50	1034	1,86
C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	$\gamma$ -Terpineno	1059	1061	0,51	1061	0,65	1062	1,01	1062	0,74
C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	Terpinoleno	1088	1090	0,86	1090	0,47	1090	0,46	-	-
C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	Pinocarveol	1139	-	-	1141	0,12	1141	0,22	-	-
C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	Cânfora	1146	1146	8,61	1146	4,92	1146	3,22	1146	4,52
C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	Borneol	1169	1168	5,33	1168	4,45	1168	7,36	1168	6,46
C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	4-Terpinenol	1177	1178	0,83	1178	0,59	1179	0,85	-	-
C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	$\alpha$ -Terpineol	1188	-	-	1190	0,23	-	-	-	-
C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	Verbenona	1205	-	-	1203	0,79	-	-	-	-
C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	Acetato de bornil	1288	-	-	1286	0,35	-	-	-	-
C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	Timol	1290	-	-	1290	0,12	1291	0,21	1290	0,27
C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	$\delta$ -Elemeno	1338	-	-	1340	0,38	-	-	-	-
C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	$\alpha$ -Cubebeno	1348	1352	0,63	1352	0,60	1353	0,77	1353	0,65
C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	Copaeno	1376	1378	2,47	1378	2,55	1379	3,38	1379	2,42
C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	$\beta$ -Burboneno	1388	-	-	1386	0,28	1387	0,40	-	-
C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	$\beta$ -Cubebeno	1388	-	-	-	-	1392	0,28	-	-
C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	$\beta$ -Elemeno	1390	-	-	1392	0,24	-	-	-	-
C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	$\alpha$ -Bergamoteno	1412	1406	0,54	1407	0,29	1407	0,40	-	-
C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	$\alpha$ -Gurjuneno	1409	-	-	1411	0,34	1412	0,38	1412	0,82



Fórmula	Constituinte	IK <sub>L</sub>	TOO		TOI		TOP		TOV		
			IK <sub>C</sub>	%	IK <sub>C</sub>	%	IK <sub>C</sub>	%	IK <sub>C</sub>	%	
C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	α-Cedreno	1411	1411	0,30	1414	0,52	1415	0,82	-	-	
C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	β-Cariofileno	1419	1422	17,22	1423	26,27	1423	21,20	1423	19,28	
C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	α-Cariofileno	1454	1457	5,05	1456	3,99	1457	3,06	1457	5,48	
C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	β-Fameseno	1456	-	-	1463	0,44	-	-	-	-	
C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	<i>alo</i> - Aromadendreno	1460	-	-	1469	0,04	-	-	1465	0,57	
C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	Germacreno D	1485	1483	4,80	1483	6,18	1484	4,72	1484	5,39	
C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	α-Zingibireno	1493	-	-	1493	1,43	-	-	-	-	
C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	α-Muuroleno	1500	1506	0,57	1498	1,67	1507	1,06	1509	2,00	
C <sub>15</sub> H <sub>22</sub>	Cupareno	1504	-	-	1506	0,78	1510	0,88	-	-	
C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	β-Bisaboleno	1505	-	-	1509	0,89	-	-	-	-	
C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	Z-α-Bisaboleno	1507	1509	1,12	-	-	-	-	-	-	
C <sub>15</sub> H <sub>22</sub>	Calameneno	1529	1525	4,30	1525	3,53	1526	4,75	1526	3,83	
C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	Germacreno B	1561	-	-	-	0,00	1561	0,88	1561	1,04	
C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	<i>trans</i> -Nerolidol	1561	1564	1,57	1564	3,59	1565	1,52	1565	1,69	
C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	Espátulenol	1578	-	-	1579	0,43	-	-	1580	1,28	
C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	Oxido de cariofileno	1582	1585	1,99	1585	2,11	-	-	1586	2,64	
			Monoterpenos		34,40		25,93		36,93		23,68
			Monoterpenos oxigenados		17,81		15,45		16,36		13,11
			Sesquiterpenos		40,56		56,55		44,50		47,09
			Sesquiterpenos oxigenados		3,56		6,13		1,52		5,61
			Total de identificados %		74,96		82,48		81,43		70,77
			Não identificados %		25,04		17,52		18,57		29,23

TOO, óleo essencial da planta coletada no outono; TOI, óleo essencial da planta coletada no inverno; TOP, óleo essencial da planta coletada na primavera; TOV, óleo essencial da planta coletada no verão; IK<sub>L</sub>, índice de Kovats da literatura; IK<sub>C</sub>, índice de Kovats calculado; %, percentual relativa.

FONTE: SILVA, 2012

Ao redor do mundo, popularmente, espécies do gênero *Lippia* têm sido empregadas no tratamento de distúrbios gastrointestinais ou respiratórios e hipertensão. Porém, a maioria dos estudos biológicos está concentrada nas análises dos seus óleos essenciais e sua atividade antimicrobiana, repelente ou larvicida. Tem sido apontado também elevado potencial como agente antiviral, antimalárica, antiinflamatório, sedativo e hipotensor (PASCUAL *et al.*, 2001). Trabalhos realizados pela equipe do Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos (LAPRON) da Universidade Estadual de Feira de Santana (LUCHESE *et al.*, 2005a; LUCHESE *et al.*, 2005b; LUCHESE *et al.*, 2006) comprovaram que seis espécies de *Lippia*, inclusive *L. thymoides* e *L. insignis*, apresentaram elevada atividade contra *Candida*

*albicans*. Pinto (2008) comprovou que as espécies *L. microphylla* e *L. thymoides* podem fornecer agentes terapêuticos promissores contra infecções com bactérias e leveduras. Já Silva (2012) avaliou os óleos essenciais de *Lippia thymoides* e constatou que foram efetivos contra as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus* e a levedura *Candida albicans*, sendo mais eficientes os monoterpenos em relação aos sesquiterpenos.

## **Conclusão**

O gênero *Lippia* juntamente com a espécie *Lippia thymoides* Mart. & Schauer possui uma vasta gama de compostos químicos, e propriedades antimicrobiana, sendo letal contra as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus* e a levedura *Candida albicans*. Desta forma fica evidenciado neste trabalho o grande potencial biotecnológico deste gênero, e que a espécie é uma grande fonte de substâncias com diversas atividades farmacológicas, validando seu uso na medicina popular para o tratamento de feridas, febre, reumatismo e bronquite.

**Palavras-Chave:** Biotecnologia, plantas medicinais, *Lippia thymoides*

## **Agradecimentos**

A FAPESB pela concessão da bolsa de pesquisa. A Unidade Experimental Horto Florestal – UNEHF-, por ceder o espaço para realização das atividades.

## **Referências**

CRAVEIRO A.A.; FERNANDES A.G.; ANDRADE C.H.S.; MATOS F.J.A; ALENCAR J.W.; MACHADO, M. Óleos essenciais de Plantas do Nordeste. Editora UFC. Fortaleza, 1981.

CASTELLETTI, C. H. M. et al. Quanto ainda resta da Caatinga? Uma estimativa preliminar. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (Eds.). Ecologia e conservação da caatinga. Recife, PE: Editora Universitária UFPE, 2003. p. 719-734.

GAMARRA-ROJAS, C. F. L. et al. Checklist das plantas do Nordeste. Disponível em <<http://www.cnip.org.br/bdpm/checklistNE.pdf>>. Acesso em 25 de Março de 2015.

LINDSKOG, A.; POTTER, A. Terpene emission and ozone stress. Chemosphere, v. 30, p. 1171-1181, 1995.

LUCHESE, A. M.; OLIVEIRA, L. S.; RODRIGUES, O. S.; MOREIRA, J. S.; ZAIM, C. Y. H.; ZAIM, M. H.; QUEIROZ, LUCIANO PAGANUCCI DE; GIULIETTI, A. M.; UETANABARO, A. P. T.; CONCEICAO, T. A. Óleos essenciais do gênero *Hyptis* da região do semiárido da Bahia. In: III Simpósio Brasileiro de Óleos Essências, 2005, Campinas (Anais). Instituto Agrônomo de Campinas, 2005a.

LUCHESE, A. M.; CASTRO, P. R. DE ; ZAIM, C. Y. H.; ZAIM, M. H.; SANTOS, T. R. Avaliação comparativa do óleo essencial de *Lippia alnifolia*. In: III Simpósio Brasileiro de Óleos Essências, 2005, Campinas (Anais). Instituto Agrônomo, 2005b. p. 121.



LUCCHESI, A. M.; ZAIM, C. Y. H.; MACHADO, S. S.; RODRIGUES, O. S.; MOREIRA, J. S.; SANTOS, A. O. A.; ROCHA, M. B.; SOUZA, R. D.; UETANABARO, A. P. T. Comparação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos de espécies do semiárido baiano. In: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006, Águas de Lindóia (Anais) 2006. p. PN285.

MAFFEI, M. E. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. South African Journal of Botany, v. 76, p. 612-631, 2010.

MAIA, G. N. Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades. São Paulo, SP: D & Z Computação Gráfica e Editora, 2004. 413 p.

MELO, J. I. M. et al. Verbenaceae sensu lato em um trecho da ESEC Raso da Catarina, Bahia, Brasil. Revista Caatinga, v. 23, p. 41-47, 2010.

OLIVEIRA, D. R. et al. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* H.B.K. Food Chemistry, v. 101, p. 236-240, 2007.

ORMEÑO, E.; FERNANDEZ, C.; MÉVY, J-P. Plant coexistence alters terpene emission and content of Mediterranean species. Phytochemistry, v. 68, 840-852, 2007.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ MATA, D. & VILLAR, A. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. Journal of Ethnopharmacology. v.76, p 201-214, 2001.

QUEIROZ, L. P.; CONCEIÇÃO, A.; GIULIETTI, A. M. Nordeste semi-árido: Caracterização geral e lista das fanerógamas. In: GIULIETTI, A. M. et al. (Eds.). Diversidade e caracterização das fanerógamas do semi-árido brasileiro. Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia, 2006. p. 15-359.

SÁ, I. B.; RICHÉ, G. R.; FOTIUS, G. A. As paisagens e o processo de degradação do semi-árido nordestino. In: SILVA, J. M. C. et al. (Org.). Biodiversidade da caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2003. p. 17-36.

SALIMENA, F. R. G.; SILVA, T. R. S. F. Flora de Grão-Mogol, Minas Gerais: Verbenaceae. Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo, v. 27, p. 119-120, 2009.

SALIMENA, F. R. G. 2000. Revisão taxonômica de *Lippia* sect. *Rhodolippia* Schauer (Verbenaceae). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Brasil.

SALIMENA, F. R. G. et al. Verbenaceae in Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB021457>>. Acesso em 25 Março 2015.

SANTOS, F. J. B. et al. Composition and biological activity of essential oils from *Lippia organoides* HBK. Journal of Essential Oil Research, v. 16, p. 504-506, 2004.

SALIMENA, F. R. G. Revisão taxonômica de *Lippia* L. sect. *Rhodolippia* Schauer (Verbenaceae), 2000. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, 2000.

SILVA, F. S. Estudo Fitoquímico e Farmacológico de *Lippia thymoides* Mart. & Schauer (verbenaceae). 2007. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana-BA, 2007.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2005.

VICCINI, L.F.; PIERRE, P.M.O.; PRAÇA, M.M.; SOUZA DA COSTA, D.C.; ROMANEL-COSTA, E.; SOUZA, S.M.; PEREIRA-PEIXOTO, P.H.; SALIMENA, F.R. Chromosome numbers in the genus *Lippia* (Verbenaceae). *Plant Systematics and Evolution*, v. 256, p. 171-178, 2006.

**Atividade antifúngica de extrato hidroalcoólico de folhas de pimenta jamaica (*Pimenta dioica*), aroeira (*Schinus molle*) e goiaba (*Psidium guajava*) contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense***

# **Atividade antifúngica de extrato hidroalcoólico de folhas de pimenta jamaica (*Pimenta dioica*), aroeira (*Schinus molle*) e goiaba (*Psidium guajava*) contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense***

Cristiano Oliveira do Carmo<sup>1\*</sup>; Rafael Mota da Silva<sup>2</sup>; Filipe Costa Lima<sup>3</sup>; Ana Paula Araújo de Souza<sup>4</sup>; Jamille Almeida dos Santos<sup>5</sup> Ana Cristina Fermino Soares<sup>6</sup> Franceli da Silva<sup>7</sup>

1 Mestrando do Programa de Pós Graduação em Ciência Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB. email: cristian\_oli10@yahoo.com.br;

2 Doutorando do Programa de Pós Graduação em Ciência Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB. email: ferminosoaes@gmail.com;

3 Graduando do curso de Engenharia Agrônômica da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB; email: limafc.agro@gmail.com

4 Graduando do curso de Licenciatura em Biologia\ Bolsista PIBIC da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB; email: anapaulaaraujo\_2013@hotmail.com;

5 Graduanda do curso de Engenharia Agrônômica da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB. email: jamillealmeida\_@hotmail.com;

6 Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. do Programa de Pós Graduação em Ciência Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB. email: ferminosoaes@gmail.com;

7 Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. do Programa de Pós Graduação em Ciência Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB. email:franceli.silva@gmail.com;

## **Resumo**

A banana vem sofrendo perdas na sua produtividade, devido a ocorrência do mal-do-Panamá, causado pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. O efeito fungitóxico de extratos de plantas tem sido investigado em diversos patossistemas. Os objetivo deste estudo foi avaliar os extratos hidroalcoólicos de folhas de pimenta Jamaica (*Pimenta dioica* (L.) Merr.), aroeira (*Schinus molle*) e goiaba (*Psidium guajava*L.) no controle *in vitro* de *F. oxysporum*. As folhas de pimenta Jamaica, goiaba e aroeira foram coletadas e lavadas e secas em estufa de ventilação forçada à 45°C. As folhas foram imersas em solução de etanol e água na proporção de 1:1 por um período de 72 horas. Foi retirado o solvente em evaporador rotatório à 45°C e pressão reduzida. Os extratos foram esterilizados por filtração, em membrana de nitrocelulose (Millipore) com porosidade de 0,2 µm. Para a avaliação do efeito dos extratos no crescimento micelial, o extrato foi adicionado ao meio de cultura BDA, acrescentando-se, 1ml/Lde Tormicina® (oxitetraciclina 100 mg/mL). Fez-se a transferência de discos de micélio de culturas de *F. oxysporum* com 7 dias de crescidas para o centro de placas de Petri, contendo meio de cultura com os extratos de folhas de Pimenta Jamaica, Goiaba e Aroeira (25, 50 e 75% V/V) e o tratamento controle sem adição do extrato. As placas foram incubadas a temperatura de 28± 2 °C e as culturas foram avaliadas a cada 24 horas, por meio da medição do diâmetro da colônia. Nos testes *in vitro* para o controle de *F. oxysporum*, o extratos hidroalcoólico das folhas de pimenta Jamaica, reduziu o diâmetro da colônia do fungo em até 15.03%. O extrato hidroalcoólico das folhas de aroeira, inibiu o crescimento micelial em até 62.47% na concentração de 75%. O extrato hidroalcoólico da folha de goiaba na concentração de 25%, reduziu o crescimento em 48.45%. Os extrato hidroalcoólicos de folhas de pimenta

jamaica, aroeira e goiaba apresentaram efeito fungitóxico sobre o crescimento micelial de *F. oxysporum*.

Palavras chaves: Plantas medicinais, fusariose, mal do panamá,

## Introdução

A banana é um dos frutos mais produzidos e consumidos em todo o mundo, com uma produção mundial de aproximadamente 106,5 milhões de toneladas. O Brasil ocupa a quinta posição mundial, com uma produção de 7,3 milhões de toneladas de frutos (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO, 2013). A região nordeste é a maior produtora (39,1%), seguida das regiões sudeste (31,7%), sul (13,5%), norte (11,8%) e centro-oeste (3,5%), em uma área estimada de 514.366 ha (IBGE, 2013).

Apesar da importância econômica para a região nordeste, a cultura vem sofrendo perdas na sua produtividade, devido a ocorrência da doença do mal-do-Panamá, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E.F. Smith) Snyder & Hansen. O impacto causado por esse fitopatógeno é extremamente severo, ocasionando o declínio da atividade agrícola, com graves reflexos para a economia da região. A doença causa a morte prematura de plantas adultas, próximo ou durante o florescimento, e as perdas podem atingir 100% da produção (PEREIRA et al., 2005).

*F. oxysporum* é um patógeno do solo que produz clamidósporos como propágulos de repouso. Eles apresentam paredes espessas e resistentes a flutuações ambientais, permitindo que o agente patogênico sobreviva no solo por um período longo tempo sem presença de plantas hospedeiras (Momma et al., 2010). Após ser infestado por *F. oxysporum* do solo, as variedades suscetíveis de banana não podem ser replantadas com sucesso por décadas. Assim, a produção de banana vem sofrendo uma drástica redução (Ploetz, 2006).

O uso de produtos sintéticos no controle das doenças na agricultura tem se intensificado (VENTUROSOSO et al., 2010). No entanto, em longo prazo, além do surgimento de isolados fitopatogênicos resistentes às substâncias químicas utilizadas, os resultados negativos para a sociedade e para o meio ambiente são evidentes, devido à poluição e riscos a saúde humana e animal causados pelos seus resíduos (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000).

Diante das dificuldades de controle de fitopatógenos de solo, tem-se buscado metodologias como a utilização de produtos naturais tais como óleo essencial e extratos de plantas, eficientes no controle de pragas e doenças das plantas e que apresentem menores riscos a saúde humana e ao meio ambiente (CARNEIRO et al., 2007).

O efeito fungitóxico de extratos de plantas tem sido investigado em diferentes patossistemas. Seu uso no controle de fitopatogênicos tem se mostrado promissor por apresentarem propriedades anti-inflamatórias, antibacterianas e antifúngicas, além de serem misturas complexas, apresentando baixo risco de desenvolver resistência microbiana, constituindo-se uma alternativa de

interesse econômico e ecológico bastante promissor, sendo alternativa de substituição de produtos sintéticos e isolamento de princípios ativos nelas presentes (MATOS, 1997; SOUZA et al., 2007; PINHEIRO et al., 2011).

Diante disso, a pimenta jamaica (*Pimenta dioica* (L.) Merr.), aroeira (*Schinus molle*) e a goiaba (*Psidium guajava* L.), vem se destacando no controle de microrganismos fitopatogênicos, apresentando-se inócua ao homem e ao ambiente, e com grande potencial de aplicação em um programa integrado de controle de doenças de plantas (CARVALHO et al., 2006).

A goiaba é usado no tratamento de doenças gastrointestinais, calafrios e dor de estômago (UNAM, 2009). Por outro lado, Pimenta jamaica é utilizada tradicionalmente como antiemético (Germosén-Robineau de 2005). A aroeira vem sendo utilizada no tratamento de doenças devido à composição química de seus óleos essenciais, sendo usada no tratamento de distúrbios respiratórios (DEGÁSPARI et al., 2005), além de possuir ação adstringente, anti-diarréica, depurativa, diurética e febrífuga (LIMA et al., 2006).

Embora existam relatos de uso medicinal destas espécies, faltam estudos sobre a atividade antimicrobiana destes extratos e seu potencial para o controle do agente causal da doença do mal do Panamá da bananeira. O objetivo deste estudo foi avaliar os extratos hidroalcolícos de folhas de pimenta jamaica (*Pimenta dioica* (L.) Merr.), aroeira (*Schinus molle*) e goiaba (*Psidium guajava* L.) no controle *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

## Metrodologia

### Coleta e secagem

As folhas de pimenta Jamaica, goiaba e aroeira foram coletadas e lavadas em água corrente, colocadas na superfície de papel absorvente para retirar o excesso de água, transferidas para sacos de papel pardo com capacidade para 2 kg e colocadas em estufa de ventilação forçada à 45°C, até obtenção de peso constante.

### Preparo e fracionamento do extrato hidroalcolólico (EHA) de Pimenta Jamaica, Goiaba e Aroeira.

As folhas secas foram imersas em solução de etanol e água na proporção de 1:1 por um período de 72 horas. Esse procedimento foi repetido três vezes para extração exaustiva do material vegetal. Após esse período filtrou-se o extrato em papel filtro. Em seguida foi retirado o solvente em evaporador rotatório à 45°C e pressão reduzida. Os extratos foram esterilizados por filtração, em membrana de nitrocelulose (Millipore) com porosidade de 0,2 µm.

### Avaliação *in vitro* dos extratos hidroalcolólicos de pimenta Jamaica, goiaba e aroeira sobre o crescimento micelial.

As avaliações foram realizadas por meio da determinação do potencial de inibição do crescimento micelial de *F. oxysporum*, em meio de cultura BDA (batata, dextrose, ágar). Para a avaliação do efeito dos extratos no crescimento



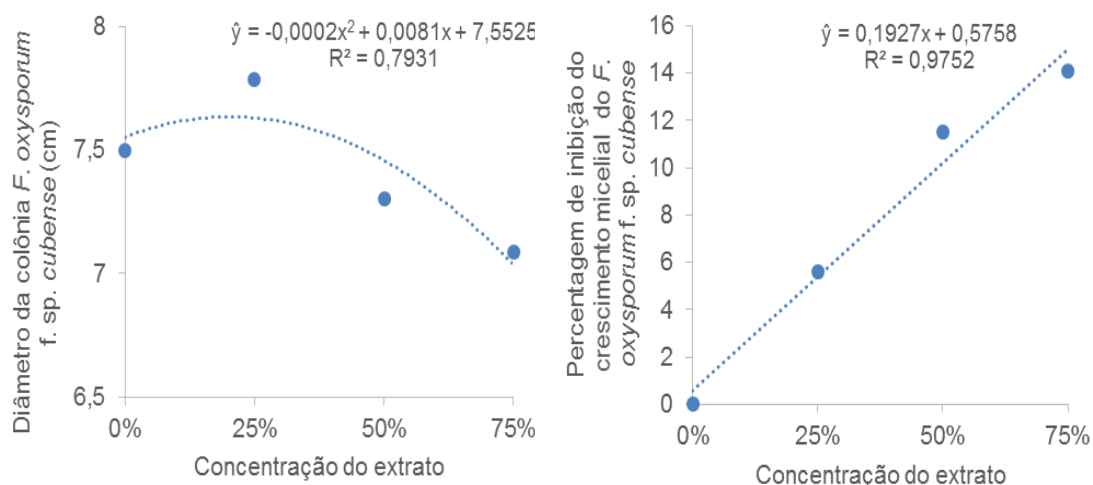
micelial de *F. oxysporum*, o extrato foi esterilizado, conforme descrito acima, e adicionado ao meio de cultura BDA, após a esterilização do meio em autoclave, quando este apresentava a temperatura próxima ao ponto de solidificação, acrescentando-se, 1ml/L de Tormicina® (oxitetraciclina 100 mg/mL). Em seguida, o meio de cultura foi agitado manualmente com movimentos rotativos do frasco e foram vertidos 15 ml de meio por placa de Petri. Vinte e quatro horas após a solidificação do meio, fez-se a transferência de discos de micélio da borda de culturas de *F. oxysporum* com 7 dias de crescidas para o centro de placas de Petri com meio de cultura BDA, contendo as concentrações dos extratos de folhas de pimenta Jamaica, goiabeira e aroeira (25, 50 e 75% V/V) e o tratamento controle sem adição do extrato. As placas foram incubadas a temperatura de  $28 \pm 2$  °C e as culturas foram avaliadas a cada 24 horas, por meio da medição do diâmetro da colônia com uma régua milimetrada, em dois sentidos diametralmente opostos, até a colônia de um dos tratamentos atingir as bordas da placa.

### Estadística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial com dez repetições. Os dados foram analisados por regressão, com o programa estatística SISVAR.

### Resultados e Discussão

Os testes *in vitro* para o controle do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubeense*, com extratos hidroalcoólicos de folhas de pimenta jamaica (*Pimenta dioica* (L.) Merr.), evidenciaram uma redução no crescimento micelial do fungo. Os resultados indicaram que as diluições 50 e 75%, reduziram o diâmetro da colônia do fungo em até 15.03% (figura 1).



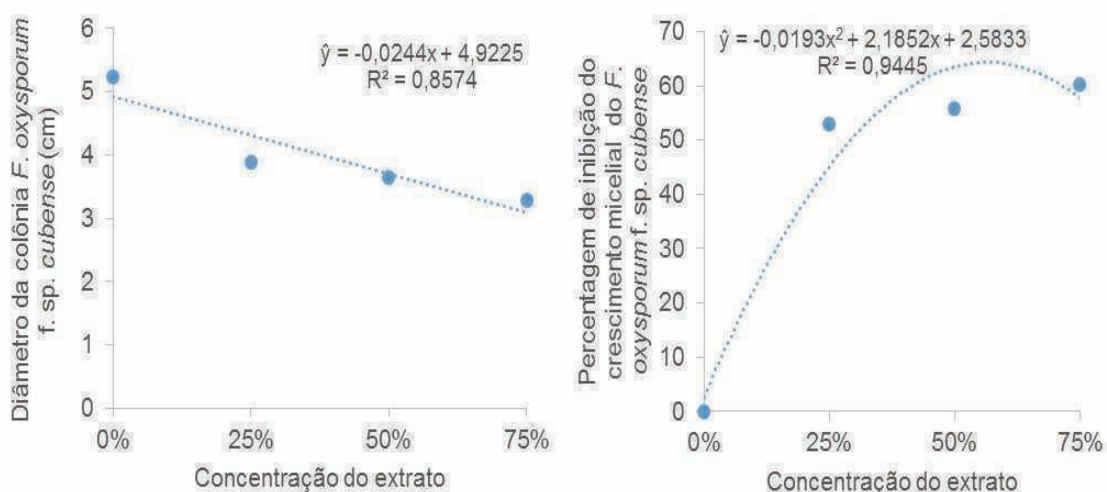
**Figura 1:** Diâmetro da colônia e Percentagem de inibição do crescimento micelial do *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubeense* em diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de folhas de pimenta Jamaica em meio BDA.

A eficiência apresentada pelo extrato hidroalcoólico de pimenta jamaica quanto à atividade fungicida pode ser devido à existência de substâncias bioativas.

Bara&Vanetti (1998), trabalhando com óleo essencial de folhas de *P. dioica*, rico em eugenol, observaram atividade antimicrobiana frente a *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Pseudomona sputida* isolada de amostras de carne (Oussalah et al., 2006; 2007). Além do óleo essencial, o extrato aquoso dos frutos de *P. dioica* apresentou atividade antibacteriana para *S. aureus* (Romero et al., 2005).

Fajardo (1997), relata que o eugenol vem sendo bastante utilizado como antioxidante e Mouchrekfilho (2000), descrevem a utilização como antiespasmódico, anti-séptico, agente antimicrobiano, agente bactericida e fungicida, antialérgico.

O extrato hidroalcoólico das folhas de aroeira, nas concentrações acima de 25%, proporcionaram a inibição do crescimento micelial de *F.oxysporum* em até 62.47% na concentração de 75%.



**Figura 2:** Diâmetro da colônia e Percentagem de inibição do crescimento micelial do *F.oxysporum* f. sp. *cubeuse* em diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de folhas de aroeira (*Schinus molle*) em meio BDA.

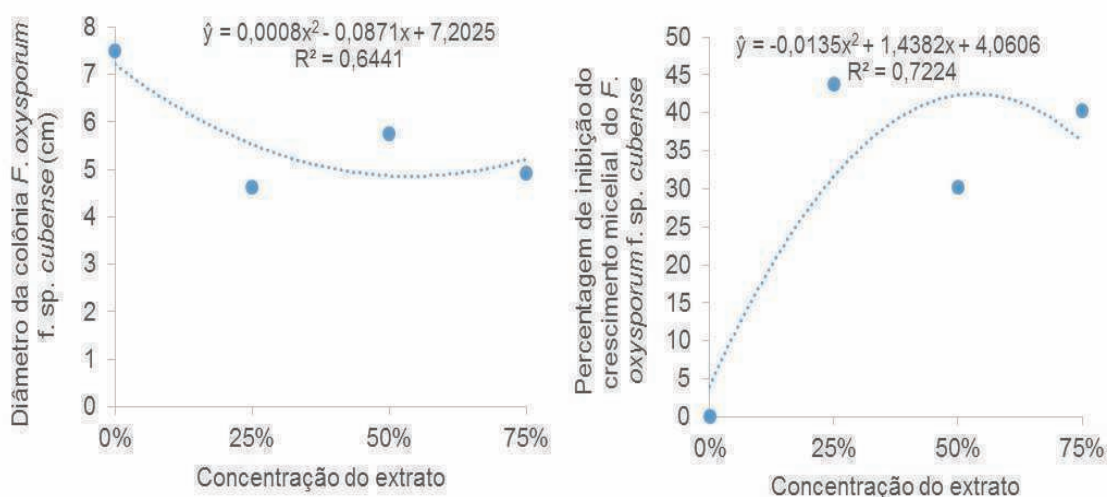
Resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira Junior et al. (2013), avaliando o efeito do óleo essencial do fruto de *Schinus terebinthifolius* sobre o crescimento micelial do fungo *Colletotrichum gloeosporioides in vitro*, apresentando inibição de crescimento de 79,07%. Porém, Bandeira & Lima (2013), utilizando o extrato etanólico proveniente dos frutos de jurubeba lobeira (*solanum grandiflorum*), evidenciou ação fungicida sobre *F. oxysporum in vitro*.

Segundo Moreira et al. (2011) o extrato hidroalcoólico das folhas de aroeira (*Schinus molle* L.) testado *in vitro* nas concentrações de 10, 20 e 25% foi

eficiente na inibição do crescimento micelial dos fungos *Fusarium* sp. e *Dreschlera* sp. em quaisquer concentrações avaliadas.

O extrato hidroalcoólico da folha de *Psidium guajava* L., apresentou atividade antimicrobiana, inibindo o crescimento microbiano em todas as concentrações testada, porém a concentração de 25% foi a que apresentou maior percentagem de inibição contra *F. oxysporum*, tendo uma redução no crescimento de 48.45% (Figura 3).

Em estudos utilizando extratos hidroalcoólicos e aquosos de folhas de goiaba (*Psidium guajava* L.), Sanches et al. (2005), obtiveram efeito inibitório contra cepas padrão de *Staphylococcus aureus*. Fonseca e Botelho (2010), demonstrou atividade antimicrobiana, avaliando microrganismos patogênicos da cavidade oral humana, através do extrato bruto das folhas de goiaba (*Psidium guajava* L.).



**Figura 3:** Diâmetro da colônia e Percentagem de inibição do crescimento micelial do *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* em diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de folhas de goiaba (*Psidium guajava* L.) em meio

Os extratos vegetais são considerados como eliciadores bióticos, cuja eficiência no controle de fitopatógenos tem sido observada em diversos patossistemas (BONALDO et al., 2004). A redução do crescimento micelial decorre da ação fungitóxica das substâncias com efeito antimicrobiano sobre o metabolismo do fungo, presente na composição das plantas bioativas (CARVALHO et al., 2010)

#### Conclusão

Os extrato hidroalcoólicos de folhas de pimenta Jamaica (*Pimenta dioica*), aroeira (*Schinus molle*) e goiaba (*Psidium guajava*), apresentaram efeito fungitóxico sobre o crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*

A atividade antifúngica do extrato hidroalcoólico das folhas de *Schinus molle*, contra *F.oxysporum* sp.  *cubense* foi a mais eficaz.

## Agradecimento

Ao programa de pós graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. À coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior – Capes, pela concessão da bolsa de estudo e a Fundação de amparo à pesquisa do Estado da Bahia -Fapesb, pelo financiamento de reagentes e equipamentos.

## Referências

BANDEIRA, R. A & LIMA, R. A. Efeito do extrato etanólico dos frutos de *solanum grandiflorum* ruiz sobre *fusarium oxysporum* kühn in vitro. *Revista Saúde e Pesquisa*, v. 6, n. 1, p. 69-73, jan./abr. ISSN 1983-1870, 2013

BONALDO, S. M. et al. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. *Fitopatol. Bras.*, v.29, n.2, p.128- 134, 2004.

BARA, M.T.F.; VANETTI, M.C.D. Estudo da atividade antimicrobiana de plantas medicinais, aromáticas e corantes naturais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.7/8, n.1/2, p.22-34, 1997/1998.

CARNEIRO, S.M. et al. Eficácia de extratos de Nim para o controle do oídio do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 1, p. 34-39, 2007.

CARVALHO, R.A. ; LACERDA, J.T.D. ; OLIVEIRA, E.F. ; CHOARY, S.A. ; BARBEIRO NETO, M. ; SANTOS, E.S. **Controle Agorecológico da fusariose do abacaxi com plantas antibióticas**. 2006. Artigo em hipertexto. Disponível em: <http://www.infobios.com/artigos/2006/abacaxi/index.htm>. Acesso em 20 fev . 2015.

CARVALHO, P.R.S. Extratos vegetais: potencial elicitor de fitoalexinas e atividade antigungica em antracnose do cajueiro. Jaboticabal: UNESP, 2010. 51p. Tese (Doutorado) Produção vegetal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- UNESP, 2010

COLE, E. R. Estudo Fitoquímico do Óleo Essencial dos Frutos da Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e sua Eficiência no Combate ao Dengue. Dissertação (Mestrado-Química de produtos naturais)- Centro de Ciências Exatas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 82p, 2008.

DEGÁSPARI, C. H. et al. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 29, n. 3, p. 617-622, 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). FAOSTAT: Producción. Roma, 2013. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 29 dez. de 2014.

FAJARDO, G. ; MARTINEZ, E.M. ; VILAREM, G. ; GASET, A. ; SANTOS, J.M. Comparative study of the oil and supercritical CO<sub>2</sub> extract of Mexican pimento (*Pimenta dioica* Merril). **J. Essent. Oil Res.**, v.9, n.2, p. 181-185, 1997

GERMOSÉN-ROBINEAU, L. 2005. Farmacopea vegetal caribeña. Prosis, Unión Europea. 485 pp.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Sistema IBGE de recuperação automática. 2013. Disponível em <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp>>. Acesso em: 20 fev. 2015.

LIMA, M.E.L. et al. Antimicrobial activity of the essential oil from two specimens of *Pimenta pseudo caryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum (Myrtaceae) native from São Paulo State - Brazil. **Pharmacology online**, v.3, p.589-93, 2006.

MATOS, F.A. **As plantas da Farmácia Viva**. Fortaleza: Ed. Universidade Federal do Ceará, v.1, 57p. 1997.

MOMMA, N. MOMMA, M. MOMMA, Y. KOBARA, **Biological soil disinfection using ethanol: effect on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and soil microorganisms**. Gen. Plant Pathol., 76 (5) pp. 336–344, (2010).

MOREIRA, R. M.; VIEIRA, C. G.; VIÉGA, P. V. S.; SANTOS, G. A. L.; MUZA, D. N. **Extrato hidroalcoólico de aroeira sobre o crescimento *in vitro* de *Fusarium sp.* e *Drechslera sp.*** In: XX Congresso de Iniciação Científica, III Mostra Científica, 2011, Pelotas. Disponível em: <[http://ufpel.edu.br/cic/2011/anais/pdf/CB/CB\\_00189.pdf](http://ufpel.edu.br/cic/2011/anais/pdf/CB/CB_00189.pdf)>. Acesso em: 19 de março de 2015.

MOUCHREK FILHO, V. E. **Estudos Analíticos e modificações químicas por metilação e acetilação do eugenol contido no óleo essencial extraído das folhas da espécie pimenta dioica Lindl.** São Carlos. 2000, 124p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos. USP

OLIVEIRA JUNIOR, L.F.G et al. Efeito fungitóxico do óleo essencial de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* RADDI) sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. **Rev. bras. plantas med.** 2013, vol.15, n.1, pp. 150-157.

OUSSALAH, M. et al. Antimicrobial effect of selected plant essential oil on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. **Meat Science**, v.73, p.236-44, 2006.

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oil on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v.18, p.414-20, 2007.

PEREIRA, J.C.R.; PEREIRA, J.R.; CASTRO, M.E.A.; GASPAROTTO, L. Ocorrência do mal-do-panamá em bananeira do subgrupo Figo, em Piau, Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, n.5, p.574, 2005.

PINHEIRO, L.Z.; COSTA, I.F.J.B.; BERNARDES, N.R.; LOPES, D.D.M.; OLIVEIRA, D.B. Extrato aquoso da aroeira: compostos fenólicos, taninos condensados e atividade antioxidante. In: Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Química, 34., 2011, Santa Catarina. CD-ROM... Santa Catarina: Sociedade Brasileira de Química, 2011.

Ploetz, R.C. ***Fusarium* wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense***. *Phytopathology*, 96 (6) (2006), pp. 653–656

ROMERO, C.D. et al. Antibacterial properties of common herbal remedies of the south west. ***Journal of Ethno pharmacology***, v.99, p.253-7, 2005.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. ***Revista Floresta***, Curitiba, v.30, p.129-137, 2000.

SOUZA, A. E. F.; ARAÚJO, E.; NASCIMENTO, L. C. Atividade antifúngica de extratos de alho e capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolado de grãos de milho. ***Fitopatologia Brasileira***, v.32, n.6, p.465-471, 2007.

UNAM. 2009. Guayaba. En: Argueta, V.A. (Coordinador General). Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana. Tomos I, II, III. Instituto Nacional Indigenista, México. Consultado el 15 de octubre de 2010 en la página electrónica: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php>

VENTUROSO, L.R.; BACCHI, L.M.A.; GAVASSONI, W.L.; PONTIM, B.C.A.; CONUS, L.A. Influência de diferentes metodologias de esterilização sobre a atividade antifúngica de extratos aquosos de plantas medicinais. ***Rev. Bras. Pl. Med.***, Botucatu, v.12, n.4, p.499-505, 2010.



**AVALIAÇÃO DE PREPARADO HOMEOPÁTICO NO CONTROLE  
DA TIRIRICA (*Cyperus rotundus* L.)**

## AVALIAÇÃO DE PREPARADO HOMEOPÁTICO NO CONTROLE DA TIRIRICA (*Cyperus rotundus* L.)

Jamile de Jesus Moreira <sup>1</sup>, Luiz Mario Nascimento Conceição <sup>2</sup>, Rosimar Nery de Souza<sup>3</sup>, Mara Rubia Araujo dos Santos<sup>4</sup>, Iremar Neves dos Santos<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Discente do Curso de Graduação em Tecnologia em Agroecologia, [jamilejm.ufrb@gmail.com](mailto:jamilejm.ufrb@gmail.com); <sup>2</sup> Discente do Curso de Graduação em Tecnologia em Agroecologia; <sup>3</sup> Discente do Curso de Graduação em Tecnologia em Agroecologia [rosytica@hotmail.com](mailto:rosytica@hotmail.com); <sup>4</sup> Discente do Curso de Graduação em Tecnologia em Agroecologia, [negamara1984@gmail.com](mailto:negamara1984@gmail.com). <sup>5</sup> Discente do Curso de Graduação em Tecnologia em Agroecologia, [iremarneves92@gmail.com](mailto:iremarneves92@gmail.com)

### Introdução

A tiririca (*Cyperus rotundus* L.) é uma planta herbácea perene cujo meio de propagação ocorre por meio de sementes e vegetativamente: rizomas, bulbos e tubérculos subterrâneos (ROSSI, 2007). A tiririca é uma planta espontânea de difícil manejo, sendo uma das principais responsáveis por perdas em plantios comerciais das mais variadas culturas. Trata-se de uma planta muito agressiva, possuindo alta capacidade de reprodução, dispersão e rusticidade, o que torna seu controle difícil e oneroso para o agricultor (SILVEIRA, 2010). Além de competir diretamente por água, luz e nutrientes, a tiririca inibe a germinação e brotação de outras espécies, pela exsudação de substâncias químicas pelas raízes, com efeito, alelopático (MELLO, 2003).

Muitos agricultores possuem seus plantios prejudicados devido, aparecimento de plantas principalmente de caráter espontâneo em suas plantações. Desta forma torna-se muito importante solucionar estes problemas, visando sempre baixo custo e responsabilidade ambiental. De acordo com Paixão (2008), com o processo de transição da agricultura convencional para um estilo de agricultura menos agressiva ao meio ambiente, é necessária a utilização de tecnologias alternativas que visem à harmonização ambiental, favorecendo a existência das relações ecológicas nos agroecossistemas. Visando o controle sem agredir ao meio ambiente existem os preparados homeopáticos, uma nova alternativa a ser difundido entre os agricultores.

A homeopatia, ciência criada pelo médico Alemão Samuel Hahnemann, tem como princípios básicos a experimentação clínica de substâncias em indivíduos sadios, a cura pelos semelhantes, a administração de doses mínimas e medicamento único. OLIVEIRA et al., (2013). A inserção da homeopatia na agricultura, como prática geral, tem como objetivo levar saúde ao meio rural. A primeira consequência tem-se em vista o abandono dos agrotóxicos e toda a parafernália consumista que acarreta a dependência do agricultor (ANDRADE & CASALI, 2011).

A homeopatia tem o potencial de agir no agroecossistema como um todo, harmonizando o meio ambiente e as plantas nele inseridas. Desta forma a homeopatia pode ser empregada com o objetivo de evitar a competição de plantas espontâneas com as plantas utilizadas no ambiente de cultivo, trazendo menores impactos aos produtores e aos sistemas de produção.

O manejo das plantas espontâneas é realizado por meio da combinação de uma forma racional de medidas preventivas, como também de medidas de controle e erradicação se necessárias em um determinado agroecossistema (ZAMBOLIM, 2000).

Diante desta problemática o presente trabalho se propôs verificar o efeito de preparados homeopáticos em diferentes dinamizações no controle do capim tiririca (*Cyperus rotundus* L.).

## **Metodologia**

O experimento foi conduzido em área residencial, no município de Cruz das Almas-BA. Coletaram-se em média 400 rizomas de tiririca que foram lavados e posteriormente selecionados 250 rizomas pelo tamanho entre 3 e 5 cm. O experimento foi realizado em 5 bandejas de polietileno contendo 50 células cada, nas seguintes dimensões: bandeja 30 x 60 cm, células de 5 x 5 cm e profundidade de 9 cm, que foram lavadas e esterilizadas com álcool 70% e preenchidas com areia. Após o preenchimento das células, seguiu-se as aberturas de buracos para o plantio dos rizomas. Utilizando piloto com diâmetro de 2 cm, o qual foi inserido a uma profundidade de 4 cm para plantio dos rizomas. A cada abertura foi implantado 1

rizoma de tiririca/ célula totalizando 50 unidades/bandeja,ao final foram todos cobertos com areia.

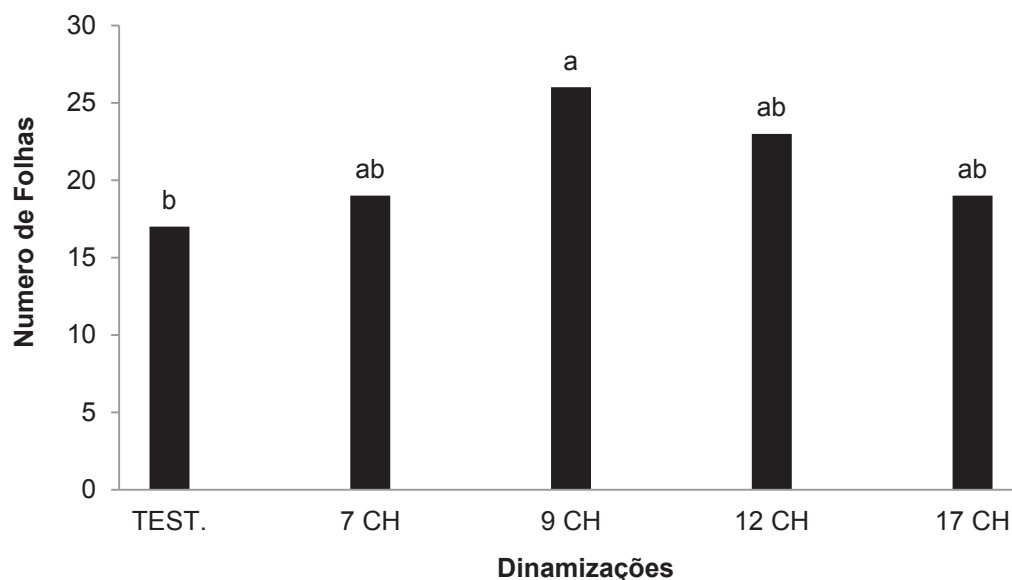
Os tratamentos utilizados para condução do experimento foram: T1 tratamento controle, T2 preparado homeopático de *arsenicum álbum* na 7 CH,T3 preparado homeopático de *arsenicum álbum* na 9 CH, T4 preparado homeopático de *arsenicum album* na 12 CH e T 5 preparado homeopático de *arsenicum album* na 17 CH. As aplicações dos preparados homeopáticos foram realizadas por meio de seringas com capacidade para 20 ml, o tratamento T1 recebeu apenas água e os demais seus respectivos tratamentos em intervalos de dias alternados. O preparado para a experimentação foi elaborado por meio da diluição de 40 gotas dos preparados em 1000 ml de água. Cada célula foi regada com 20 ml do seu respectivo preparado, com a finalidade de garantir a segurança na aplicação dos preparados, todos os recipientes foram devidamente identificados.

O preparado homeopático *arsenicum album* foi adquirido em farmácia de manipulação na dinamização 6 CH,para obter-se as demais foi acrescentado 20 ml de álcool 70% em um frasco com vidro âmbar de capacidade total para 30ml, ao mesmo adicionou-se 5 gotas do preparado homeopático na dinamização 6 CH, posteriormente realizou-se as succussões ou seja agitou-se o mesmo em ritmo ordenado por 100 vezes, desta forma obteve-se a dinamização 7 CH, realizou-se o mesmo procedimento sucessivamente até a dinamização 17 CH. Ao final selecionou-se dentre o total as dinamizações utilizadas para experimentação 7 CH, 9 CH, 12 CH e a 17 CH. A experimentação transcorreu por um período de 60 dias, a variável Emergência das plântulas, foram obtidas por meio de observações e anotações diárias durante um intervalo de 17 dias, período este suficiente para a emergência das plântulas inseridas, sendo contabilizadas apenas as que emergiam seu meristema apical acima da superfície do solo. A variável número de brotações totais por tratamento foi obtida ao final da experimentação, contando-se o numero de plantas vivas em cada tratamento.Ao final do experimento as variáveis coletadas: Índice de velocidade emergência (IVE) e numero de folhas por parcelas (NF), coletadas foram analisados pelo programa estatístico SISVAR<sup>®</sup> desenvolvido pela Universidade Federal de Lavras (UFLA).

## Resultados e discussão

Os dados expressos na Figura 01 relativo ao numero de folhas, demonstraram que o tratamento 9 CH foi superior aos demais tratamentos desta forma o mesmo estimulou o surgimento de folhas. O tratamento testemunha foi inferior a todos, porém analisando o numero de folhas, quanto pior é o tratamento para esta variável melhor é o mesmo para o controle. Os demais tratamentos não diferenciaram-se pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Resultados semelhantes a estes foram encontrados por MARTINAZZO-PORTZ et al., (2009), que ao avaliarem diferentes preparados homeopáticos de plantas de picão preto (*Bidens pilosa*) em diferentes dinamizações na germinação de sementes da mesma espécie, constataram que os preparados homeopáticos utilizados não afetaram na germinação final de sementes de picão-preto. Em outros trabalhos realizados por Silva e Casali (2007), com sementes de milho expostas ao envelhecimento acelerado, observaram que o *Arsenicum álbum* na 8CH, revigorou as sementes, promovendo aumento do percentual e índice de velocidade de germinação. Figura 01

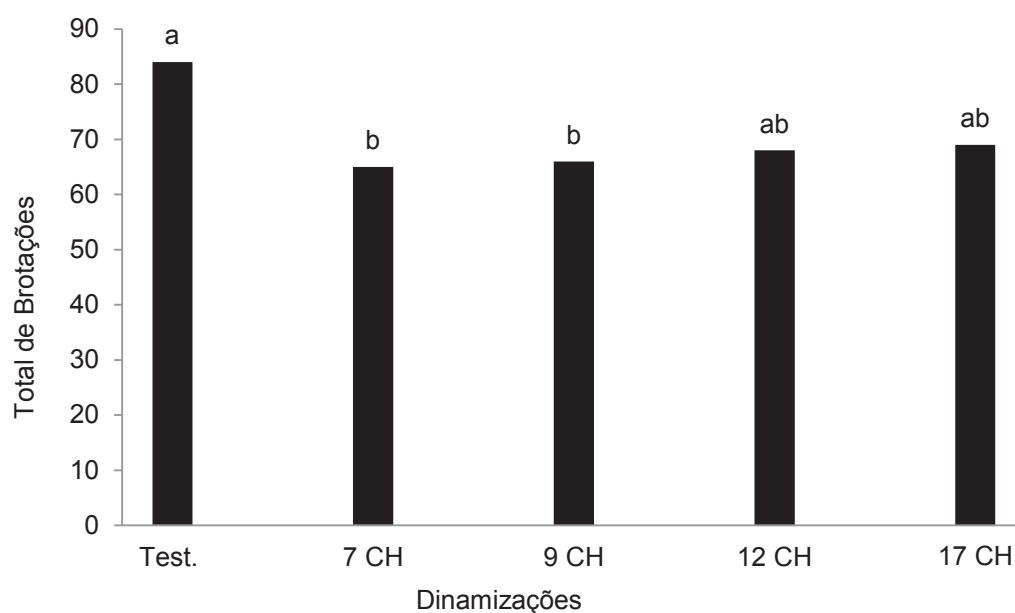
Figura 01: Número de folhas por parcela.



Em relação a variável numero total de brotações foi observado que a testemunha foi superior em relação aos demais tratamentos, dentre as demais dinamizações a 7CH

e 9 CH foram as que melhor controlaram o número de brotações. SILVEIRA et al., (2009) observaram resultados semelhantes, quando testaram diferentes preparados homeopáticos aplicados em tiririca, onde a percentagem da emergência nas dinamizações 3CH, 6CH, 9CH e 12CH foram inferiores a testemunha. PAIXÃO et al., (2013), também avaliaram diferentes isoterápicos no capim tiririca e concluíram que os preparados homeopáticos possui alta interferência do metabolismo vegetal.

Figura 02 :Número total de brotações.



## Conclusões

Ao final da experimentação conclui-se que os melhores tratamentos para o controle do capim tiririca (*Cyperus rotundus*) em bandeja, foram *Arsênico álbum* nas dinamizações 7 CH e 9 CH. Apesar da efetividade da utilização da homeopatia ser comprovada por meio de experimentações, são necessários outros estudos com outras dinamizações afim de comprovar a efetividade do controle homeopático do capim tiririca.



**Palavras-Chave:** *Cyperus rotundus*, preparado homeopático, agroecologia

### Referencias Bibliográficas

ANDRADE, F. M. Coutinho de; CASALI, V. W. D.; Homeopatia, agroecologia e sustentabilidade. *Rev. Bras. de Agroecologia*. ISSN: 1980-9735 6 (1) : 49-56, 2011.

MARTINAZZO-PORTZ, T.; MÜLLER, S. F.; MEINERZ, C.; FRANZENER, G. Germinação de Sementes de *Bidens pilosa* Submetido a Preparados Homeopáticos de *Bidens pilosa*. *Rev. Bras. De Agroecologia*. Vol. 4 No. 2/nov. 2009.

MELLO, S. C.M. DE; TEXEIRA, E.A.; BORGES NETO, C.R; Fungos e seus metabolitos no controle da tiririca. EMBRAPA. Brasilia, DF. 2003.

Paixão, J.L. de F.; Avaliação de Preparados Homeopáticos em Tiririca (*Cyperus rotundus* L.); 2p (Dissertação apresentada a Universidade Federal de Viçosa). Viçosa-MG, 2008.

ROSSI, F.; ARÉVALO, R. A.; AMBROSANO, E. J.; GUIRADO, N.; AMBROSANO, G. M. B.; MENDES, P. C. D.; MOTA B.; ATZINGEN, E. M. M. V.; MENUZZO, M. M.; VARELLA, A. S. Aplicação de preparado homeopático no controle da tiririca em área agroecológica. *Rev. Bras. Agroecologia*, v.2, n.1, fev. 2007.

SILVEIRA, J. C. da. e CASALI, V. W. D. Germinação de Sementes de Crotalária e Alface com o Preparado Homeopático de Ácido Giberélico. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2008. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia).

OLIVEIRA, J.S.B.; GOMES, S.M.T.P; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F ; MESQUINI, R.M; BONATO, C.M.; ROMANO, E.D.B. Patogenesisia do óleo essencial e homeopatas de *Eucalyptus citriodora* em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) *Rev. bras. plantas med.* vol.15 no.4 supl.1 Botucatu 2013.

SILVEIRA, HRO; FERRAZ, EO; MATOS, CC; HONÓRIO, ICG; ALVARENGA, ICA; GUILHERME, DO; TUFFI SANTOS, LD; MARTINS, ER; COSTA, CA.. Utilização de preparados homeopáticos no Manejo da tiririca (*Cyperus rotundus* L.). *Horticultura Brasileira* V. 27: S2420-S2424. 2009.

**COMPARAÇÃO DE 18 LINHAGENS ELITES DE MAMONEIRA  
POR MARCADOR MOLECULAR ISSR PARA IDENTIFICAÇÃO  
DE DIVERGENTES E COMO FONTES DE HIBRIDAÇÕES**

# COMPARAÇÃO DE 18 LINHAGENS ELITES DE MAMONEIRA POR MARCADOR MOLECULAR ISSR PARA IDENTIFICAÇÃO DE DIVERGENTES E COMO FONTES DE HIBRIDAÇÕES

Pesquisa Institucional desenvolvida na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, pertencente ao Grupo de Pesquisa Núcleo de Melhoramento Genético e Biotecnologia; Tese de Doutorado

Laurenice Araujo dos Santos<sup>1</sup>; Simone Alves Silva<sup>2\*</sup>; Helison Santos Brasileiro<sup>3</sup>; Alda Silva dos Reis<sup>4</sup>; Vanessa de Oliveira Almeida<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Pesquisadora PNPd - UFRB/NBIO, lasagro@hotmail.com

<sup>2</sup>Professor Doutor do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da UFRB. \*Orientador, Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq

<sup>3</sup>Aluno do Curso de Doutorado em Ciências Agrárias, bolsista CAPES, agr.brasileiro81@gmail.com

<sup>4</sup>Aluna do Curso de Mestrado em Ciências Agrárias, bolsista CAPES, aldareiss@gmail.com

<sup>5</sup>Pós-doutoranda em Ciências Agrárias pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Bolsista FAPESB/CAPES, voagro@hotmail.com

## Introdução

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) é uma espécie de oleaginosa pertencente à família da Euforbiácea, com provável centro de origem na Etiópia, no continente africano, onde se encontra alta diversidade genética da espécie (ANJANI, 2012), sendo cultivada em diversos países.

Entre as décadas de 70 e 80 a mamona ganhou muita importância entre as culturas brasileira, devido ao grande potencial encontrado no óleo extraído das sementes. Os derivados obtidos da planta podem ser utilizados na fabricação de biocombustíveis, lentes de contato, revestimentos, protetores, vidros resistentes entre tantas outras aplicações (SOUZA, 2007). A ampla utilização da matéria prima em diversos setores evidencia tamanha importância da cultura no cenário econômico e social do país.

No Brasil o melhoramento genético da mamona teve início em 1936, através do Instituto Agrônomo (IAC). Na Bahia esses estudos iniciaram-se em 1960 pelo Instituto de Pesquisa Agropecuária do Leste (IPEAL), seguida pela Empresa de Pesquisa Agropecuária da Bahia (EPAB) (VIEIRA et al., 2008). O Núcleo de Melhoramento Genético e Biotecnologia (NBIO) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia iniciou em 2005, seu programa de melhoramento da cultura, envolvendo hibridações, condução de populações segregantes por métodos de melhoramento clássico e monitorado pelos marcadores moleculares, com o desenvolvimento de várias linhagens promissoras.

Para ampliar a eficiência dos métodos de seleção, os programas de melhoramento genético tendem a associar técnicas clássicas com técnicas de biotecnologia, a exemplo dos marcadores de DNA, utilizadas como ferramenta auxiliar na seleção. Assim, os marcadores moleculares podem contribuir significativamente para o conhecimento genético da cultura, no conhecimento genético dos caracteres e ainda na obtenção de cultivares melhoradas, maximizando os ganhos genéticos almejados em programas de melhoramento (FERREIRA e GRATAPAGGLIA, 1998; MACHADO e SILVA, 2013).

Marcadores moleculares são características presentes no material genético do indivíduo que são herdadas geneticamente, capazes de diferencia-los entre os demais (MILACH, 1998). Existem vários tipos de marcadores moleculares que podem facilmente detectar os níveis de diversidade genética em populações naturais e materiais cultivados (NYBOM, 2004). Entre eles, encontra-se o marcador ISSR (*inter simple sequence repeat*), que é uma técnica baseada em PCR e tem sido amplamente utilizado por ser uma técnica simples, eficiente, possuir alta reprodutibilidade e gerar altos índices de polimorfismo (ZIETKIEWICZ et al., 1994; REDDY et al., 2002) e não necessitam de informações prévias da sequência genética para essas análises (ARCHAK et al., 2003; THIMMAPPAIAH et al., 2009). Além de terem sido usados com sucesso para a avaliação da diversidade genética, estudo filogenético e identificação de cultivares em diversas espécies (GALAN et al., 2003; NOOR CEMELLIA et al., 2012).

Com o grande potencial para a utilização da cultura como matéria prima na produção do biocombustível, estudos sobre a divergência genética da mamoneira utilizando ferramentas biotecnológicas, como os marcadores ISSR é pertinente, no intuito de obter mais informações para futuras recomendações técnicas e subsidiar pesquisas em programas de melhoramento da cultura. Diante do exposto o objetivo do trabalho foi estimar a diversidade genética através do marcador molecular ISSR, em 18 linhagens pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de *Ricinus communis* do NBIO/UFRB com o propósito de identificar e selecionar a mais divergente.

## **Metodologia**

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética e Biologia Molecular do Núcleo de Melhoramento Genético e Biotecnologia (NBIO), do Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas (CCAAB) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), localizado no campus de Cruz das Almas-BA.

Foram selecionadas 18 linhagens elites de mamoneira para análise ISSR, das 219 linhagens pertencentes ao programa de melhoramento genético do NBIO/UFRB, sendo elas: UFRB-11, UFRB-19, UFRB-23, UFRB-32, UFRB-86, UFRB-93, UFRB-160, UFRB-208, UFRB-214, UFRB-222, UFRB-227, UFRB-241, UFRB-242, UFRB-248, UFRB-151, UFRB-255, UFRB-258 e UFRB-264.

Para a obtenção do DNA genômico coletou-se amostras de tecido foliar jovem de cada linhagem estabelecida em campo. As amostras foram envoltas em papel alumínio, acondicionadas em caixa térmica contendo gelo e transportadas para o laboratório do NBIO, onde foram lavadas em água destilada e seca em papel toalha

para extração. O DNA total foi extraído de acordo com o protocolo CTAB (brometo de cetiltrimetilamonio) descrito por Doyle e Doyle (1990) modificado. Macerou-se aproximadamente 300 mg de tecido vegetal em almofariz na presença de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. O macerado foi transferido para microtubos de 2 mL, ao qual foram adicionados 800 µL do tampão de extração pré-aquecido a 65 °C (CTAB 2,0%, NaCl 1,4 M, Tris HCl 0,1 M pH 8,0, EDTA 20 mM, 2-mercaptoetanol 0,8%, PVP (Polivinilpirrolidona) 2,0% e água ultra-pura q.s.p).

As misturas foram homogeneizadas mecanicamente por 30 segundos e incubadas em banho-maria a 65°C por 45 minutos e a cada 15 minutos invertida cuidadosamente. Decorrido o tempo pré-estabelecido as amostras foram retirada do banho-maria e adicionaram-se 700 µL da mistura clorofórmio álcool isoamílico (24:1), logo após homogenizaram-se as amostras levando-as em seguida para centrifugação há 10.000 rpm por 10 minutos. Estas duas últimas etapas foram realizadas por duas vezes com a finalidade de melhorar a qualidade do material isolado.

Logo após essas etapas coletou-se o sobrenadante de cada amostra e transferiu-se para microtubos de 1,5 mL, aos quais adicionaram-se 450 µL de álcool Isopropílico gelado homogeneizando suavemente e incubando-os a -20 °C por três minutos.

Posteriormente a incubação, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000 rpm. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 600 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 + EDTA 1 mM), sendo incubado por 1:30 horas na geladeira para ressuspender o DNA. Em seguida, adicionaram-se 200 µL de acetato de amônio a 7,5 M, e as amostras foram invertidas suavemente para homogeneizar a solução, sendo posteriormente incubadas no gelo por 15 minutos, em seguida as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 8000 rpm.

Após estas etapas transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo de 1,5 mL e a este se adicionou 800 µL de etanol absoluto para, em seguida, incubá-lo por uma hora a -20°C. Decorrido esse tempo, o material foi centrifugado por 10 minutos a 12.000 rpm.

Em seguida o precipitado foi lavado por duas vezes com 500 µL de etanol 70% (v/v), procedendo-se a centrifugação por cinco minutos a 12000 rpm. Após a centrifugação, o álcool foi descartado e o precipitado colocado para secar. Depois de seco, o precipitado foi ressuscitado em 100 µL de TE com 2 µL de RNase (10 mg/ml) e incubado em banho-maria a 37°C por uma hora. Por fim, as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C para uso posterior.

Para a quantificação do DNA foi utilizado gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio, onde aplicou-se 5 µL do concentrado. Em seguida as amostras foram submetidas à eletroforese por 50 minutos a 60 V. Posteriormente foi feita a quantificação das amostras de DNA com um padrão conhecido (DNA do fago lambda de 50, 100 e 200 ng) em transluminador UV e fotodocumentados por sistema digital Vilber Lourmat. Após quantificação, as amostras foram diluídas em tampão TE para ajustar as suas concentrações para condição de trabalho (5ng/µL).

Foram testados 48 primers ISSR, em DNA genômico, em quatro linhagens para a amplificação. As reações de amplificação foram preparadas em um volume final de 25 µL, contendo cada uma: 2,5 µL de tampão 10 X (50 mM Tris-HCl, 20 mM KCl), 2 µL de dNTPs mix (dATP, dTTP, dGTP, dCTP, 2,5 mM de cada), 1,2 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 3,0 µL de primers ISSR (2,5 mM), 0,6 µL de Taq DNA polimerase (5U/µL-Invitrogen), 3,0 µL de DNA genômico (5 ng/µL) e água ultra pura q.s.p.

A PCR foi conduzida em termociclador Biocycler MJ96+/MJ96G (Biosystems), conforme protocolo estabelecido por Zietkiewicz et al. (1994). O programa de amplificação constou de uma etapa inicial de desnaturação a 94°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 40 segundos, anelamento a 48°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, seguido de extensão final a 72°C por 7 minutos.

Em seguida os produtos da amplificação foram separados por eletroforese horizontal, em gel de agarose 1,5% (p/v) corado com brometo de etídeo (0,5 µL/mL) em tampão TBE 1 X (89 mM Tris-Borato, 2 mM EDTA) sob tensão constante de 110 V por 2 horas. As amostras foram preparadas, adicionando-se 5 µL de solução corante de azul de bromofenol ao mix. E o peso molecular dos fragmentos gerados foram comparados ao padrão ladder de 1 Kb (invitrogen). Após eletroforese, o gel foi fotografado em equipamento de fotodocumentação transluminador molecular imaging – Loccus Biotecnologia / L-PIX.

As análises estatísticas foram realizadas com base no padrão dos produtos de ISSR amplificados. O padrão dos produtos de ISSR amplificados se comporta como marcadores dominantes e foram tabulados como presença (1) e ausência (0) de bandas polimórficas. O peso molecular de cada fragmento foi estimado com base no Marcador de DNA 1 kb (1kb Ladder Plus, Invitrogen).

Os marcadores obtidos foram analisados pelo programa GENES (CRUZ, 2008), no qual foi gerada uma matriz de similaridade genética utilizando o coeficiente de JACCARD, e através do programa STATISTICA (STATSOFT, 2005) foi gerado um dendrograma pelo método de agrupamento UPGMA. O número ideal de grupos foi determinado utilizando o critério pseudo-t<sup>2</sup> (MINGOTI, 2007; GONÇALVES et al., 2008), pelo programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011).

## **Resultados e Discussão**

Dentre os 48 primers testados para avaliar o padrão de amplificação, 32 apresentaram bons resultados e foram utilizados para genotipagem da população. Destes 32 primers, 9 foram utilizados no estudo de divergência genética por produzirem fragmentos polimórficos, os quais permitiram a obtenção de 69 fragmentos amplificados, obtendo-se 90,78% polimórficos (Tabela 1). O número de bandas polimórficas por primers variou de 3 a 12, com média de 6,1 bandas/primer, sendo semelhantes aos obtidos por Gajera et al. (2010) em trabalho desenvolvido para avaliar a divergência genética em 22 genótipos de mamoneira utilizando o marcador ISSR. Os autores relatam que cinco primers geraram de 8 a 13 bandas por primers, resultando em 60% de polimorfismo.



**Tabela 1.** Caracterização dos primers ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) utilizados na genotipagem das 43 linhagens de mamoneira. Cruz das Almas, Bahia, 2013.

Nº Primer	Nome do Primer	Sequência (5' - 3')	NTB	BP	P (%)
841	DiGA3'T	GAGAGAGAGAGAGAGAT	8	7	87,5
863	TriCAG3'YC	CAGCAGCAGCAGCAGYC	13	12	92,3
866	TriGTG	GTGGTGGTGGTGGTG	10	9	90
869	TriGTG5'CR	CRGTGGTGGTGGTGGTG	8	8	100
887	TriAGA3'RC	AGAAGAAGAAGAAGARC	10	8	80
907	TriCAC3'RC	CACCACCACCACCARC	4	3	75
925	TriGCA3'RC	GCAGCAGCAGCAGCARC	8	7	87,5
844	DiGA5'CR	CRGAGAGAGAGAGAGAGA	7	7	100
845	DiGA5'CY	CYGAGAGAGAGAGAGAGA	8	8	100

NTB: número total de bandas, BP: bandas polimórficas, P(%): porcentagem de bandas polimórficas, pares de bases; R = A ou G; Y = T ou C.

Para espécies correlatas, Silva et al. (2011) ao estimar a divergência genética intra e interespecífica de acessos de *Manihot* ssp. com vinte primers, ISSR, obtiveram 89,7% de polimorfismo. Já Grativol et al. (2011) avaliando a diversidade genética entre 332 acessos de pinhão-manso utilizou sete primers ISSR obtendo 91% de bandas polimórficas.

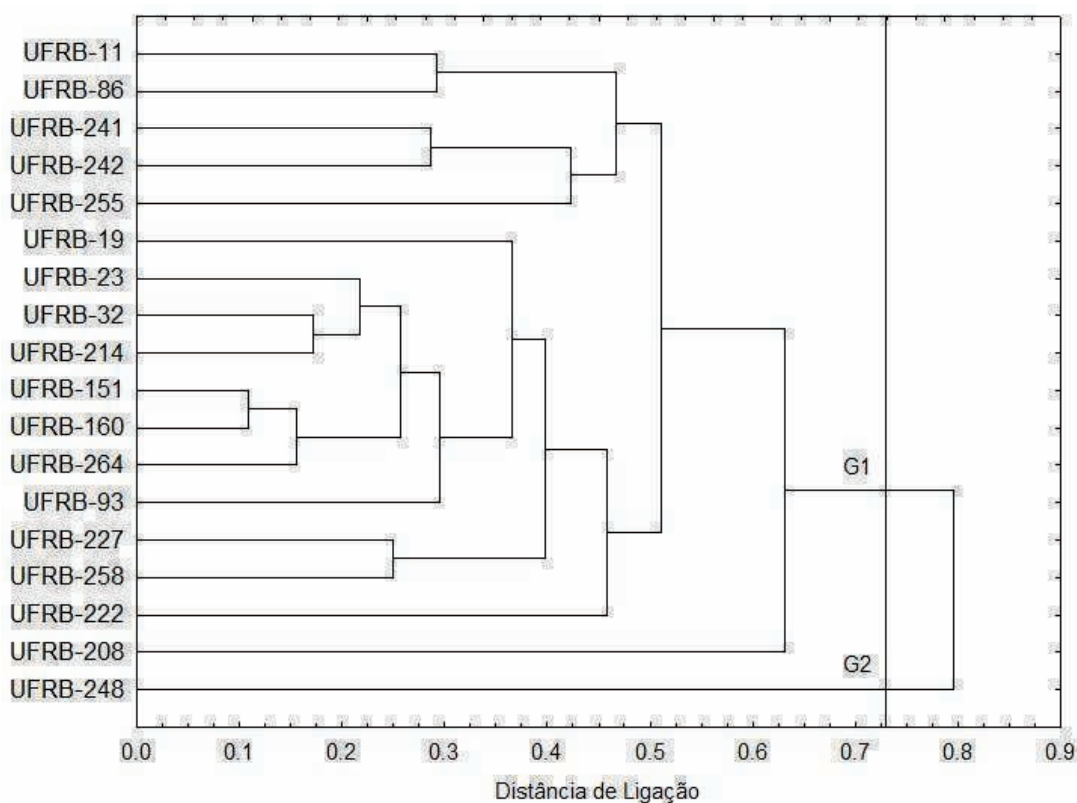
Machado et al. (2013) ao estudar a divergência genética entre cultivares de mamoneira utilizando o marcador do tipo RAPD obteve 552 fragmentos sendo que 311 foram polimórficos (56,3%), onde cada primers produziu em média 6,3 fragmentos polimórficos. Silva et al. (2012) também utilizando o marcado RAPD no estudo da divergência genética entre cinco cultivares de mamona obtiveram um total de 147 bandas, sendo 33 polimórficas e 114 monomórficas, evidenciando 22,45% de polimorfismo. E Gajera et al. (2010), em estudo com 22 genótipos de mamoneira utilizando 30 primers RAPD polimórficos obtiveram 205 fragmentos polimórficos com média de 6,83 por primers.

A presença de polimorfismo é um indicativo de divergência genética, o qual pode estar associado à utilização de parentais com maior divergência genética, resultando em ampla base genética dos híbridos (GAJERA et al., 2010). Desta forma, a detecção da variabilidade genética é uma importante ferramenta para a tomada de decisão tanto na escolha dos genitores a ser utilizado em cruzamentos, quanto para a seleção de linhagens ou cultivares distintas nos programas de melhoramento, evitando o lançamento de materiais duplicados, como objetivo deste trabalho.

O dendrograma obtido com base em marcadores ISSR (Figura 1), possibilitou a formação de dois grupos. O número ideal de grupos foi determinado com base no pacote *NbClust* do Programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011) de acordo com o índice pseudo- $t^2$  (MINGOTI, 2007; GONÇALVES et al., 2008). No grupo I participaram as linhagens UFRB-11, UFRB-86, UFRB-241, UFRB-242, UFRB-255, UFRB-19, UFRB-23, UFRB-32, UFRB-214, UFRB-151, UFRB-160, UFRB-264, UFRB-93, UFRB-227, UFRB-258, UFRB-222 e UFRB-208. O grupo II foi formado apenas pela linhagem UFRB-248, sendo importante ressaltar que este genótipo foi o que apresentou maior teor de óleo na semente em trabalhos anteriores, com valor

médio de 57,48 (SANTOS, 2013). Este resultado foi promissor, confirmando os achados morfológicos desta linhagem ser superior e por apresentar-se distinta das demais neste segundo grupo, fato importante para sua identificação e seleção para compor os ensaios de avaliações do Programa para possível lançamento de cultivar.

Estas linhagens foram resultados de hibridações utilizando cinco parentais analisados em trabalho de Silva et al. (2012) usando a técnica de marcadores moleculares RAPD com a formação de dois grupos. Estes parentais serviram como genitores para a realização de hibridações com o objetivo de ampliar a base genética, sendo estratégia promissora, confirmado em trabalho de Brasileiro (2014) ao avaliar 47 linhagens desta população de 219 linhagens por meio da utilização de 53 pares de iniciadores SSRs, mostrando 36 loci microssatélites como polimórficos e esses loci possibilitam o agrupamento das linhagens em sete grupos distintos, com alta variabilidade genética, dentre eles a linhagem UFRB 248.



**Figura 1** – Dendrograma gerado a partir de 18 linhagens de mamoneira obtido da análise de agrupamento, utilizando nove marcadores ISSR utilizando o método da média aritmética ponderada (UPGMA). Cruz das Almas, Bahia, 2015.

A análise de correlação cofenética demonstrou uma associação de 92% entre as distâncias obtidas pelo coeficiente de JACCARD (matriz de similaridade) e os agrupamentos do dendrograma. O valor cofenético obtido foi alto e adequado ( $r = 0,92$ ,  $P < 0,0001$ , 10.000 permutações), sendo que valores de  $r \geq 0,56$  são considerados ideais, refletindo boa concordância com os valores de similaridade genética (VAZ PATTO et al., 2004). Assim, o valor cofenético obtido neste trabalho, demonstra a eficiência da técnica de marcadores moleculares ISSR para a detecção da divergência genética nos genótipos de mamoneira.

A matriz de similaridade genética gerada pela análise de divergência genética mostrou as relações entre as 18 linhagens de mamoneira. Na matriz, verificou-se que a menor distância foi de 0,11 entre as linhagens UFRB-151 e UFRB-160 enquanto a maior distância foi de 0,92 entre as linhagens UFRB-248 e UFRB-258. A existência de distância genética entre as duas linhagens selecionadas é promissora para o programa de melhoramento genético da mamoneira com potencial de gerar, via hibridações, novas combinações genéticas.

Segundo Goulão e Oliveira (2001), os marcadores ISSR são bastante úteis na identificação de cultivares tendo vantagens em relação a outros métodos também baseados em PCR, tais como RAPD, devido à alta reprodutibilidade. Apesar de pouco utilizado na mamona e com poucos trabalhos publicados para essa cultura, esse marcador vem sendo utilizado na diferenciação rápida entre indivíduos aparentados de diversas espécies, devido ao elevado grau de polimorfismo, reprodutibilidade e baixo custo (BORBA et al., 2005). Como exemplo, encontram-se a cultura da maçã (GOULÃO e OLIVEIRA, 2001), pinhão-manso (SOARES, 2010), umbu-cajazeira (SANTANA et al., 2011), jenipapo (SANTOS, 2012) e amendoim (SANTOS et al., 2013).

## Conclusões

Existe potencial de novas hibridações entre as linhagens UFRB-248 e UFRB-258, para obtenções de distintas constituições genéticas de mamoneira.

A linhagem UFRB-248 é indicada para compor ensaios de avaliações do Programa de Melhoramento do NBIO, para possível desenvolvimento de cultivares.

**Palavras-Chave:** *Ricinus communis* L., marcadores moleculares, diversidade genética.

## Agradecimentos

A Petrobrás Biocombustível e ANP pelo apoio financeiro ao projeto, e a CAPES pela concessão da Bolsa para a primeira autora.

## Referências Bibliográficas

- ANJANI, K. Castor genetic resources: A primary gene pool for exploitation. **Industrial Crops and Products**, v. 35, p. 1–14, 2012.
- ARCHAK, S.; GAIKWAD, A. B.; GAUTAM, D.; RAO, E. V. V. B.; SWAMY, K. R. M. DNA fingerprinting of Indian cashew (*Anacardium occidentale* L.) varieties using RAPD and ISSR techniques. **Euphytica**, v. 230, p. 397- 404, 2003.
- BORBA, R. DA S.; GARCIA, M. S.; KOVALLESKI, A.; OLIVEIRA, A. C.; ZIMMER, P. D.; BRANCO, J. S. C.; MALONE, G. Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma Westwood* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. **Neotropical Entomology**, v.34, p. 565-569, 2005.
- BRASILEIRO, H. S. **Seleção de linhagens elites de mamoneira por meio de marcadores microssatélites e caracteres teor de óleo e peso de sementes por planta**, 2014. 76f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais)– Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2014.

- CRUZ, C. D. **Programa Genes (versão Windows): aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, 2008.
- DOYLE, J. J. e DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13–15, 1990.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa - CENARGEM, 3 ed., 220p, 1998.
- GAJERA, B. B.; KUMAR, N.; SINGH, A. S.; PUNVAR, B. S.; RAVIKIRAN, R.; SUBHASH, N.; JADEJA, G. C. Assessment of genetic diversity in castor (*Ricinus communis* L.) using RAPD and ISSR markers. **Industrial Crops and Products**, v.32, p. 491-498, 2010.
- GALVAN, M.Z.; BORNET, B.; BALATTI, P.A.; BRANCHARD, M. Inter simple sequence repeat (ISSR) markers as a tool for the assessment of both genetic diversity and gene pool origin in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Euphytica**, v. 132, p. 297-301, 2003.
- GRATIVOL, C.; LIRA-MEDEIROS, C. DA F.; HEMERLY, A.S.; FERREIRA, P.C.G. High efficiency and reliability of inter-simple sequence repeats (ISSR) markers for evaluation of genetic diversity in Brazilian cultivated *Jatropha curcas* L. accessions. **Molecular Biology Reports**, v. 38, n. 7, p. 42-45, 2011.
- GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C. M. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. **Euphytica**, v. 122, p. 81-89, 2001.
- GONÇALVES, L. S. A. Comparison of multivariate statistical algorithms to cluster tomato heirloom accessions. **Genetics and Molecular Research**, v. 07, p. 1289-1297, 2008.
- MACHADO, E. L.; SILVA, S. A. Desenho e validação de iniciadores microssatélites SSR para mamoneira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.48, n.11, p.1457-1463, 2013.
- MACHADO, E. L.; SILVA, S. A.; SANTOS A. de S.; BASTOS, L. A.; PESTANA, C. N.; SANTOS, K. S.; FERREIRA, C. F.; DIAMANTINO, M. S. A. S. Dissimilaridade genética entre cultivares de mamoneira por meio de marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.48, n.3, p.342-345, 2013.
- MILACH, S.C.K. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: MILACH, S.C.K. (Ed.). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p.17-28.
- MINGOTI, S. A. **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada**. Belo Horizonte: UFMG, 297 p, 2007.
- NOOR CEMELLIA, N. A.; THOHIRAH, L. A.; ABDULLAH, N.A.P. Genetic relationships and diversity of *Jatropha curcas* accessions in Malaysia. **African Journal of Biotechnology**, v.11, p. 3048-3054, 2012.
- NYBOM, H. Comparação de diferentes marcadores de DNA nuclear para estimar a diversidade genética intra-específica em plantas. **Ecologia Molecular**, v.13, p.1143-1195, 2004.
- R Development Core Team (2011). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, Dordrecht, v. 28, p. 9-17, 2002.

- SANTANA, I. B. B.; OLIVEIRA, E. J.; SOARES FILHO, W. S.; RITZINGER, R.; AMORIM, E. P.; COSTA, M. A. P. C.; MOREIRA, R. F. C. Variabilidade genética entre acessos de umbu-cajazeira mediante análise de marcadores ISSR. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 868-876, 2011.
- SANTOS, L. A. **Caracterização e seleção de linhagens elites de mamoneira (*Ricinus communis* L.) por meio do desempenho morfoagronômico e molecular no Estado da Bahia**, 2013. 86f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias)- Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2013.
- SANTOS, P. A. **Manejo do jenipapeiro (*Genipa americana* L.) para produção de madeira e avaliação da diversidade genética por meio de marcadores moleculares**, 2012. 40f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, UFRB, Cruz das Almas, 2012.
- SANTOS, R. C.I.; QUEIROZ, C. M.; BATISTA V. G. L.; SILVA, C. R. C.; PINHEIRO, M. P. N.; GALVÃO FILHO, A. L. A. MELO FILHO, P. A.; LIMA, L. M. Variabilidade de progênies F2 de amendoim geradas por meio de seleção de genitores ISSR-divergentes. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, n. 3, p. 578-586, 2013.
- SILVA, K. V. P.; ALVES, A. A. C.; MARTINS, M. I. G.; MELO, C. A. F.; CARVALHO, R. Variabilidade genética entre acessos do gênero *Manihot* por meio de marcadores moleculares ISSR. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.9, p.1082-1088, 2011.
- SILVA, S. A.; CERQUEIRA, L. S.; VILARINHOS, A. D.; AMORIM, E. P.; MOREIRA, R. F. C.; COSTA, M. A. P. C. Variabilidade genética em cultivares de mamona por meio de marcadores RAPD. **Magistra**, v. 24, n. 4, p. 341-347, 2012.
- SOARES, B. O. **Diversidade genética de genótipos de pinhão-manso por meio de RAPD e ISSR**. 2010. 54p. Dissertação (Mestrado em produção vegetal no semiárido) - UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLARO, UNIMONTES, Janaúba, 2010.
- SOUZA, L. A. de. **Teste de condutividade elétrica para avaliação da qualidade de sementes de mamona**. 2007. 53 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal de Lavras: UFLA, Lavras, 2007.
- THIMMAPPAIAH, S.; SHOBHA, W.G.; MELWYN, G.S. Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers. **Scientia Horticulturae**, v. 20, p.411-417, 2009.
- VAZ PATTO, M.C.; SATOVIC, Z.; PÊGO, S.; FEVEREIRO, P. Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germoplasm using microsatellite markers. **Euphytica**, Wageningen, v.137, n.1, p.63-72, 2004.
- VIEIRA, R. M.; LIMA, E. F. Importância socioeconômica e melhoramento genético em mamoneira no Brasil In: Queiroz, M. A. de; GOERDET, C. O.; RAMOS, S. R.R. (ED). **Recursos genético e melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro**. 1999.
- ZIETKIEWICZ, E.; RAFALKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polimerase chain reaction amplification. **Genomics**, 20 p. 176-183,1994.

**CONTROLE DA PODRIDÃO VERMELHA E COLONIZAÇÃO DE  
PLANTAS DE SISAL POR *Penicillium citrinum***



## CONTROLE DA PODRIDÃO VERMELHA E COLONIZAÇÃO DE PLANTAS DE SISAL POR *Penicillium citrinum*

Pesquisa Institucional desenvolvida no Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, pertencente ao Grupo de Pesquisa em Biotecnologia Microbiana Aplicada à Agricultura; Trabalho de Dissertação da primeira autora.

Caroline Lopes Damasceno<sup>1</sup>, Cristiano Oliveira do Carmo<sup>2</sup>, Elizabeth Amélia Alves Duarte<sup>3</sup>, Thiago Alves Santos de Oliveira<sup>4</sup>; Eliane Leal Candeias<sup>5</sup>, Fábio Nascimento de Jesus<sup>6</sup>, Lenaldo Muniz de Oliveira<sup>7</sup> e Ana Cristina Fermino Soares<sup>8</sup>.

<sup>1</sup>Doutoranda em Biotecnologia (UEFS) Aluno do Curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola, UFRB, bolsista CAPES, carolinedamas@yahoo.com.br;

<sup>2</sup>Discente de mestrando em Ciências Agrárias (UFRB), E-mail: cristian\_oli10@yahoo.com.br;

<sup>3,4</sup>Professor Bolsista PRODOC, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas/UFRB, E-mail: elizabethaad@gmail.com; oliveira.tas@gmail.com;

<sup>5,6</sup>Discente de doutorado em Ciências Agrárias (UFRB), E-mail: agrcandeias@hotmail.com; fabiorock222@yahoo.com.br;

<sup>7</sup>Professor Orientador /DCBIO/ Horto Florestal (UEFS), E-mail: lenaldo.uefs@gmail.com;

<sup>8</sup>Professora Orientadora, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas (UFRB); E-mail: ferminosoares@gmail.com;

### Introdução

O Brasil é atualmente o maior exportador de fibra de sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm) do mundo, com produção anual de aproximadamente 138 mil toneladas (IBGE, 2015). Sendo esta produção concentrada na região Nordeste, nos estados da Paraíba, Rio Grande do Norte, Ceará e Bahia, a qual contribui com cerca de 94% da produção nacional.

Cultivado principalmente por agricultores familiares, o sisal adquire importância socioeconômica, principalmente na produção de fibras como alternativa para evitar o êxodo rural. Tornou-se fonte de renda nas regiões semiáridas, nas quais as condições edafo-climáticas limitam a produção agrícola (SUINAGA et al., 2006; ADAB, 2013).

O sisal apresenta metabolismo fotossintético CAM, com epiderme cutinizada, folhas rígidas e carnosas, características fisiológicas estas que tornam esta *Agavacea*, adaptada à região semiárida e conferem uma barreira natural ao ataque de patógenos (MEDINA, 1954; COUTINHO et al., 2006).

Apesar de resistente ao ataque de pragas por causa de suas características fisiológicas, o sisal pode ser afetado por alguns patógenos que prejudicam a sua produção (BOCK, 1965). Até o momento no Brasil, foram descritas somente duas doenças que afetam o sisal: a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum agaves* (MEDINA, 1954), que não tem causado prejuízos econômicos, e a podridão vermelha do sisal (LIMA et al., 1998), que tem afetado esta cultura desde 1970, nos

estados produtores da Bahia, Paraíba e Rio Grande do Norte, passando a ser considerada a mais danosa para a cultura, a partir de 1998 (SUINAGA et al., 2006).

A podridão vermelha do caule de sisal apresenta incidência variando de 5 a 40% nos sisalais brasileiros (ALVES et al., 2004; ABREU, 2010). E não obstante as incertezas em relação ao ciclo e etiologia da doença, os fungos: *Pythium aphanidermatum*, *Lasiodiplodia theobromae* e *Aspergillus niger*, já foram relatados ocasionando podridões ao sisal: (BOCK, 1965; LIMA et al, 1998; IKITOO e KHAYRALLAH, 2001). Entretanto, até o presente, o agente causal da podridão vermelha do caule de sisal foi descrito como *A. niger* (SOARES et al., 2006). E por ser um micro-organismo que depende de condições ambientais e/ ou fisiológicas desfavoráveis ao hospedeiro para iniciar a infecção, ele é classificado como saprófita ou parasita fraco (LIMA et al., 1998, SOARES et al., 2006).

Dentre os sintomas que caracterizam a podridão vermelha do sisal, tem-se, o escurecimento dos tecidos internos; amarelecimento e murcha de folhas (SUINAGA et al., 2006). Em estádios avançados da doença, nota-se uma descoloração avermelhada do caule até a base das folhas e posterior apodrecimento deste, causando o desprendimento da planta do solo e morte desta (SÁ, 2009; LIMA et al., 1998). Essa doença acomete o sisal em todos os estádios fenológicos, desde rebentos a plantas no final do ciclo (ADAB, 2013).

Existe uma carência de produtos químicos registrados para o tratamento de patologias atribuídas a fungos presentes no solo, os quais, na maioria dos casos, possuem mecanismos de sobrevivência, podendo permanecer bastante tempo viável no solo. Também não são conhecidos procedimentos curativos para a podridão vermelha do sisal, sendo descritas apenas medidas preventivas para o manejo da doença (AZEVEDO, 2004; SUINAGA et al., 2006). Assim, a descoberta de métodos de controle desta doença é essencial, no intuito de viabilizar a continuidade do cultivo de sisal.

Dentre as potenciais estratégias de controle da podridão vermelha do caule de sisal, o controle biológico vem sendo avaliado, enquanto método menos prejudicial, em termos ambientais e com custo relativamente menor em relação ao controle químico. O biocontrole constitui-se na redução da densidade do inóculo ou de fatores determinantes da doença, pelo emprego de um ou mais patógenos ou parasitas em estado de atividade ou dormência, realizado naturalmente ou por manipulação ambiental, do hospedeiro, do antagonista, ou ainda através da introdução em massa de um ou mais antagonistas (BAKER e COOK, 1974 citado por BERGAMIN et al., 1995).

Os antagonistas são espécies ou raças apatogênicas, adaptados às mesmas condições ambientais do patógeno, com possibilidade de utilização na redução da população deste, no intuito de atenuar a fonte de inóculo e infecção para os hospedeiros, reduzindo, assim, os prejuízos, em comparação aos métodos químicos (MICHEREFF, 2008; GIROTTO et al., 2008).

Trabalhos anteriores realizados por este grupo no laboratório de Microbiologia Agrícola da UFRB (Dados não publicados), os quais visavam o isolamento de *A.*

*niger* de *Agave sisalana* com sintomas da podridão vermelha, resultaram diversas vezes no crescimento exclusivo de *Penicillium citrinum*, a partir de fragmentos de tecidos das plantas, desinfestados e plaqueados em meio de cultivo batata, dextrose ágar (BDA). Consonante com essas observações, algumas hipóteses foram formuladas, entre as quais: 1) *P. citrinum* é também o agente causal da doença; 2) *P. citrinum* pode estar agindo em sinergia com *A. niger*, causando sintomas de podridão vermelha do sisal; 3) *P. citrinum* inibe o crescimento de *A. niger*, sendo nesta última situação um micro-organismo antagônico ao patógeno e potencial agente de controle biológico. Resultados satisfatórios em diversos experimentos corroboram para a validação desta última hipótese, classificando assim *P. citrinum* como agente de biocontrole da podridão vermelha do caule de sisal (DAMASCENO et al., 2012).

Neste contexto, o uso de micro-organismos antagonistas, como *Penicillium citrinum*, endofítico de sisal e adaptado às condições da região semiárida pode constituir-se em uma estratégia de controle desta doença. Este trabalho teve o objetivo de avaliar o controle da podridão vermelha do sisal, em diferentes intervalos de tempo entre a aplicação de *P. citrinum* e *A. niger* e com reinoculação do antagonista.

## **Metodologia**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola da UFRB e em estufa agrícola do Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas, campus de Cruz das Almas.

### **Obtenção da suspensão de esporos de *Penicillium citrinum* e *Aspergillus niger***

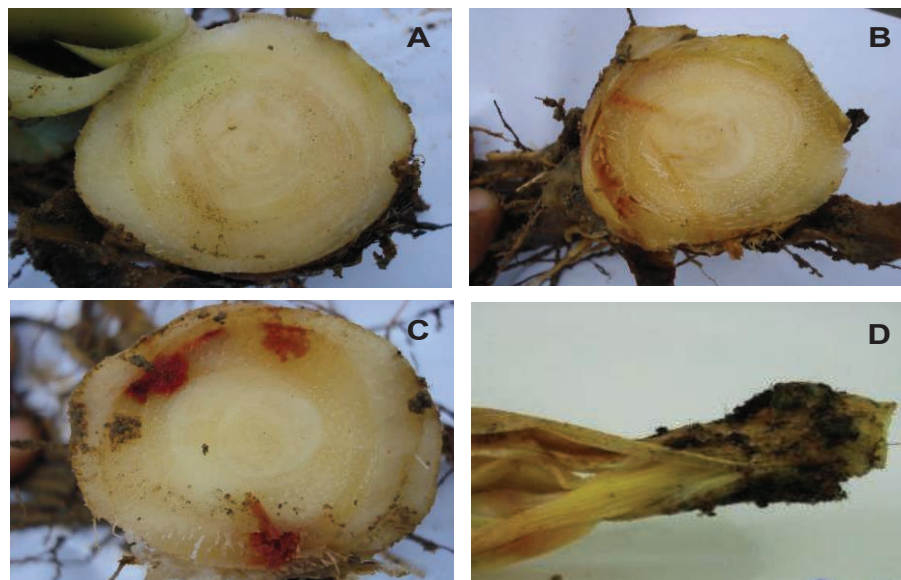
O micro-organismo foi repicado em placa de Petri contendo meio de cultivo BDA (Batata, dextrose e ágar) e incubado em câmara B.O.D. à temperatura de  $\pm 28$  °C. Após incubação por período de 7 dias, acrescentou-se 20 mL de água destilada esterilizada e duas gotas de Tween 20<sup>®</sup> na placa e com o auxílio de uma alça de Drigalsky, as colônias foram raspadas e a suspensão contendo esporos e micélio do fungo foi filtrada em gaze esterilizada. Para o ajuste da concentração de esporos, realizou-se contagem de esporos em câmara de Neubauer em microscópio óptico e quando necessário efetuou-se diluição com água destilada esterilizada, padronizando assim a concentração final da suspensão de esporos para  $10^7$  conídios.mL<sup>-1</sup>.

### **Teste de antagonismo em sisal**

Plantas de sisal foram lesionadas na região do caule com quatro furos padronizados para aplicação de  $10^7$  conídios.mL<sup>-1</sup> de *P. citrinum*. Estipulou-se o intervalo de 0, 7, 14 e 28 dias para inoculação do patógeno *A. niger* (T0, T7, T14 e T28), após a inoculação com *P. citrinum*. No tratamento T0 não houve intervalo de tempo entre a inoculação do antagonista e do patógeno. Foi inserido o tratamento com reinoculação (TR) de *P. citrinum* em intervalos quinzenais que totalizaram três aplicações. A testemunha consistiu na aplicação de água destilada estéril e o controle positivo da inoculação apenas por *A. niger* totalizando 30 repetições por tratamento.

A avaliação da severidade da doença iniciou-se a partir da observação das plantas mortas do controle positivo inoculadas com *A. niger*. Foi utilizada a escala de notas proposta por Sá (2009), na qual: (0) sem sintoma, (1) sintoma inicial, (2) sintoma avançado e (3) planta morta (Figura 1).

**Figura 1.** Escala de notas: (A) Planta sadia nota 0; (B) Sintoma inicial nota 1; (C) Sintoma avançado nota 2 e (D) Planta morta nota 3 (SÁ, 2009)



Com os dados obtidos pela avaliação dos sintomas internos com a escala de notas, calculou-se severidade da doença (SEV) através do índice de McKinney (1923), pela expressão:  $SEV = [\sum(\text{grau da escala} \times \text{frequência}) / (\text{número total de unidades} \times \text{grau máximo da escala})] \times 100$ . A incidência da doença (ID) foi calculada por:  $ID = [\sum(\text{quantidade de notas sintomáticas}) / (\text{número total de unidades})] \times 100$ .

#### **Colonização do tecido caulinar, foliar e radicular de sisal por *Penicillium citrinum***

Para avaliar a colonização das plantas por *P. citrinum* foram realizadas amostragens destrutivas das plantas, separando-se os tecidos de folha, caule (0,5 cm acima do ponto da lesão) e raiz. Em seguida foram realizados cortes transversais destes tecidos em fragmentos de 3 mm diâmetro que foram então desinfestados com álcool 70% por 2 minutos e hipoclorito de sódio 1% por 2 minutos, com posterior lavagem em água esterilizada (três lavagens). Foram plaqueados 10 fragmentos de cada tecido em placas de Petri contendo meio de cultivo BDA salino com 1 mL. L<sup>-1</sup> de oxitetraciclina, perfazendo três por tecido estudado.

O percentual de colonização foi realizado contando o número de fragmentos colonizados em cada repetição.

#### **Resultados e discussão**

Os testes em plantas de sisal em estufa agrícola indicaram que os tratamentos com intervalos de inoculação entre a aplicação de *P. citrinum* e *A. niger* apresentaram

diferenças percentuais no índice de severidade da podridão vermelha, principalmente quando o *P. citrinum* foi reinoculado em intervalos de 15 dias, onde provavelmente houve estabelecimento do fungo e maior colonização, quando comparado ao controle positivo (Tabela 1). A incidência da doença neste tratamento foi menor (30%) seguida do tratamento sem intervalo de tempo entre a inoculação do antagonista e do patógeno (T0) com 43% indicando ação antagonista em intervalos menores da aplicação do patógeno.

**Tabela 1.** Avaliação da severidade da podridão vermelha do caule em plantas de sisal tratadas com *Penicillium citrinum* e *Aspergillus niger* em diferentes intervalos de tempo entre a aplicação do antagonista e do patógeno (0, 7, 14, 28 dias e reinoculado) por meio do índice de McKinney.

Tratamento	Índice de Severidade da Doença (%)	Incidência da doença (%)
Testemunha (água destilada)	2	7
Controle positivo ( <i>Aspergillus niger</i> )	71	97
Tratamento 0 dias (T0)	28	43
Tratamento 7 dias (T7)	32	60
Tratamento 14 dias (T14)	51	73
Tratamento 28 dias (T28)	68	83
Tratamento reinoculado (TR)	20	30

O estágio de maturação da planta é um fator relevante nestes estudos, pois trabalhos deste grupo de pesquisa na UFRB (ainda não publicados) tem apresentado diferenças inferiores a 10% e 4% na severidade e incidência da doença, respectivamente no tratamento (T0) comparados com o controle positivo, indicando que, nestas condições de inoculação, não houve efeito do antagonista no controle da doença. Este efeito foi observado por Damasceno et al. (2012) utilizando mudas de sisal com aproximadamente 20 cm, enquanto que no presente estudo foram utilizadas plantas com 60 cm e a mesma metodologia de avaliação da doença.

No intervalo de tempo de sete dias, provavelmente o isolado de *P. citrinum* não consegue se estabelecer nos tecidos da planta e dessa maneira não consegue controlar a doença. Os intervalos de tempo utilizados, possivelmente não foram suficientes para o desenvolvimento de *P. citrinum*, reduzindo assim a atuação do micro-organismo antagônico por meio de mecanismos de controle biológico (MICHEREFF, 2008).

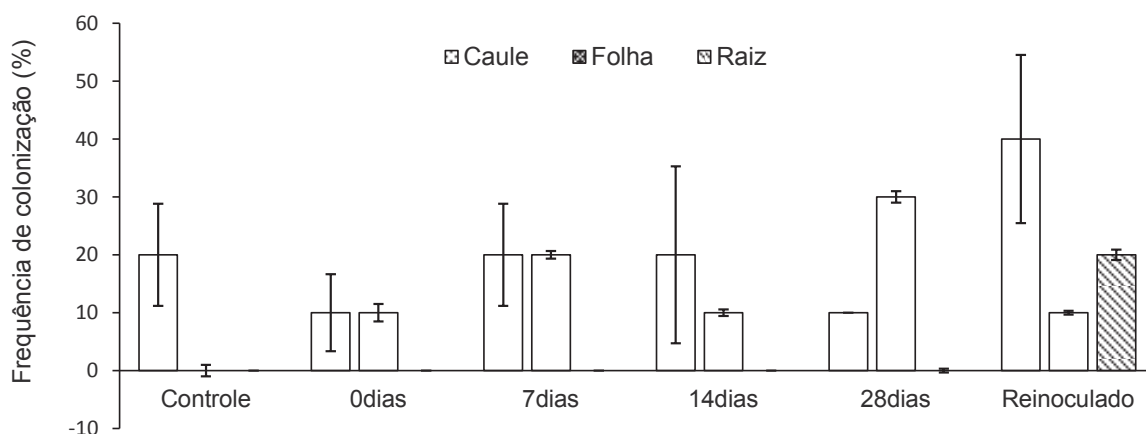
Em experimentos anteriores, Damasceno et al. (2012) observaram baixo desempenho do *P. citrinum* quando este era inoculado ao mesmo tempo que o patógeno em mudas de sisal. Neste estudo constatou-se que no tratamento de inoculação T0 em dias, *P. citrinum* reduziu em aproximadamente em 70% a severidade da doença, obtendo uma incidência de doença de 43%. O tratamento T0 pode ser considerado aquele com maior população do antagonista, por causa da



inoculação mais recente em relação aos demais tratamentos com intervalos. E esse fato pode ter sido responsável por uma maior inibição, possivelmente competição, com o patógeno, *Aspergillus niger*, que é um micro-organismo de crescimento rápido. Após cinco dias de inoculação, o *A. niger* já colonizou os tecidos internos do caule do sisal e causou sintomas da doença (SÁ, 2009).

Na avaliação da colonização de plantas de sisal por *P. citrinum* observou-se que este fungo estava presente nas plantas do tratamento controle, com frequência de colonização dos tecidos em 20%, sugerindo uma colonização endofítica vinda do campo, considerando que as mudas de sisal foram colhidas no campo (Figura 2). Os demais tratamentos inoculados com *P. citrinum* apresentaram também colonização em fragmentos de folhas, sendo esta frequência cerca de 30% aos 28 dias e 20% aos 7 dias após inoculação com o antagonista (Figura 2).

O tratamento reinoculado apresentou as maiores frequências de colonização dos fragmentos de caule, cerca de 40%, além de 20% nas raízes, sendo assim o único tratamento que proporcionou a colonização radicular pelo *P. citrinum* (Figura 2).



**Figura 2.** Frequência de colonização por *Penicillium citrinum* em fragmentos de raiz, caule e folha de sisal em diferentes intervalos de tempo entre a aplicação e a avaliação do experimento (0, 7, 14, 28 dias e reinoculado).

Em todos os tratamentos observou-se maior frequência de colonização do fungo no caule e folhas das plantas. Sendo a rizosfera um ambiente rico em exsudatos vegetais, essa região torna-se um local propício ao desenvolvimento de diversos micro-organismos, classificando-a como competitiva para o *P. citrinum*, o que pode explicar as menores porcentagens de colonização das raízes, em comparação ao tecidos de caule e folhas, locais de menor competição. Segundo Abreu (2010), os tecidos do caule são regiões de maior suscetibilidade à infecção e colonização por *A. niger*, principal patógeno da cultura do sisal, observação esta que pode ser semelhante ao ocorrido com o *P. citrinum*. Experimentos realizados anteriormente, demonstraram que *A. niger* não apresenta capacidade de penetração nas plantas de sisal pelas raízes, ocorrendo a infecção através do tecido caulinar (SÁ, 2009; ABREU, 2010).



Os resultados dos experimentos de controle da podridão vermelha do sisal pelo antagonista *P. citrinum* e a avaliação de colonização dos tecidos de raiz e caule de sisal indicam que este isolado de *P. citrinum* apresenta potencial para o controle da podridão vermelha e possui capacidade de colonização endofítica do sisal.

De maneira semelhante ao relatado por Damasceno et al. (2012), plantas de sisal inoculadas com *P. citrinum* não apresentaram sintomas visíveis da podridão vermelha do sisal, indicando que este provavelmente não é um fungo patogênico a esta cultura doente, nas condições em que este experimento foi conduzido (Figura 2).

Estes resultados indicam que o *P. citrinum* pode ser considerado um agente de biocontrole da podridão vermelha do sisal, promovendo o controle de até 80% da doença em plantas de sisal e corroboram com testes anteriores nos quais observou-se que a aplicação prévia do isolado de *P. citrinum* permitiu que este micro-organismo colonizasse os tecidos do sisal e exercesse ação antagônica a *A. niger*, para agir no controle da podridão vermelha do sisal, diminuindo severidade da doença. Entretanto, visando o aumento da eficiência de *P. citrinum* no controle da podridão vermelha, é aconselhável que o micro-organismo seja reaplicado periodicamente, garantindo maior sucesso da colonização e consequente melhor atuação no controle biológico.

## Conclusões

*Penicillium citrinum* tem efeito antagônico a *Aspergillus niger* e potencial de controle da podridão vermelha em mudas de sisal, quando inoculado entre 0 e 28 dias antes do contato com o patógeno. O *Penicillium citrinum* inoculado no caule pode colonizar tecidos da folha e somente se estabelece na raiz quando reinoculado.

**Palavras-Chave:** Biocontrole, fitopatologia, antagonismo, competição e *Agave sisalana*).

## Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES, FABESB e CNPq pela concessão de bolsas de estudo para os autores desse trabalho e financiamento do projeto, assim como a UFRB pela infraestrutura concedida para execução do projeto.

## Referências Bibliográficas

ABREU, K.C.L. de M. Epidemiologia da podridão vermelha do sisal no Estado da Bahia. **Tese (Doutorado), Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas**, 2010.

ADAB. **Podridão Vermelha do Sisal**. Disponível em: <[http://www.adab.ba.gov.br/modules/mastop\\_publish/?tac=168](http://www.adab.ba.gov.br/modules/mastop_publish/?tac=168)> (Acesso em: novembro de 2013).

ALVES, M. O.; SANTIAGO, E. G.; LIMA, A. R. M. Diagnóstico socioeconômico do setor sisaleiro no nordeste Brasileiro. **Documentos do Etene (Escritório técnico de recursos socioeconômicos do Nordeste)**, vol. 4, Fortaleza: Banco do Nordeste,

2004.

AZEVEDO, L. A. S. de. **Danos ocasionados por fungos e as estratégias de controle.** [2004]. Disponível em:< <http://www.feagri.unicamp.br/tomates/pdfs/danfungos.pdf>> (Acesso em: novembro de 2013)

BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. 3. ed. São Paulo: **Agronômica Ceres**, v.1, 1995.

BOCK, K. R. Diseases of sisal. **World Crops**, v.17, n.1, p.64-67, 1965.

COUTINHO, W.M.; LUZ, C.M.; SUASSUNA, N. D.; SILVA O.F.E.; SUINAGA, F.A. **A podridão vermelha do tronco do Sisal**, EMBRAPA, novembro/ 2006.

DAMASCENO, C. L. Potencial de *Penicillium citrinum* para o controle de *Aspergillus niger*, agente causal da podridão vermelha do sisal. **Monografia (Graduação), Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)**, Cruz das Almas, BA, 2012.

GIROTTO, M. J.; AQUINO, L. F. B.; PEREZ, R. B.; NEVES, M.F.; SACCO, S. R. O uso de fungos nematófagos no controle biológico de nematóides parasitas: revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, ano VI – Número 10 – Janeiro de 2008 – Periódico Semestral.

IBGE, 2015. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático da produção agrícola**, Rio de Janeiro v.29 n.01 p.1-83 janeiro, 2015. ISSN 0103-443X.

IKITOO, E.C.; KHAYRALLAH, W.A. Sisal: Past research results and present production practices in East Africa – present status, problems, opportunities and future prospects. Vienna: United Nations Industrial Development Organization, Common Fund for Commodities. **Technical Paper** no. 8, 2001.

LIMA, E.F. et al. Podridão vermelha do tronco do sisal (*Agave sisalana* Perr.) causada por *Botryodiplodia theobromae* Pat. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v.2, n.2, p.109-112, maio-ago. 1998.

MCKINNEY, H.H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 26, n. 5, p. 195-218, 1923.

MEDINA, J. C. **O Sisal**. São Paulo: Secretaria da Agricultura, Diretoria de Publicidade Agrícola, 1954, 286p.

MICHEREFF, S.J. Controle Biológico de Doenças de Plantas. **Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia**, 2008 - Área de fitossanidade (**FITOPATOLOGIA I**).

SÁ, J. O de. Patogênese de *Aspergillus niger* e biocontrole da podridão vermelha do sisal por *Trichoderma* spp. 2009. 53 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), Universidade Federal do Recôncavo da Bahia**, 2009.

SOARES, A. C. F.; SALOMÃO, M. S.; ALMEIDA, N. de S.; PEREZ, J. O.; GARRIDO, M. da S. *Aspergillus niger* como agente causal de manchas foliares e podridão do

pseudocaule do sisal. In: **Anais do XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, 2006, Salvador, BA.

SUINAGA, F. A.; SILVA, O. R. F. da; COUTINHO, W. M. Cultivo do sisal na região semiárida do Nordeste brasileiro. **Embrapa Algodão. Sistemas de Produção**, 5, novembro de 2006.

**Controle do *Aspergillus niger* e da podridão vermelha do sisal com extrato aquoso de pau de rato (*Caesalpinia pyramidalis*)**

## **Controle do *Aspergillus niger* e da podridão vermelha do sisal com extrato aquoso de pau de rato (*Caesalpinia pyramidalis*).**

Pesquisa Institucional desenvolvida no Centro de Ensino CCAAB, pertencente ao Grupo de Pesquisa Biotecnologia Aplicada à Agricultura; Projeto de pós graduação mestrando.

Rafael Mota da Silva<sup>1\*</sup>; Cristiano Oliveira do Carmo<sup>2</sup>; Filipe Costa Lima<sup>3</sup>; Carlos Artur Silva dos Santos<sup>4</sup>; Marcos de Souza Rodrigues<sup>5</sup>; Ana Cristina Fermino Soares<sup>6</sup>.

1 Doutorando do Programa de Pós Graduação em Ciência Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, [rafaelmotadasilva@hotmail.com](mailto:rafaelmotadasilva@hotmail.com)

2 Mestrando do Programa de Pós Graduação em Ciência Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB; [cristian\\_oli10@yahoo.com.br](mailto:cristian_oli10@yahoo.com.br)

3 Graduando do curso de Engenharia Agrônômica da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, [limafc.agro@gmail.com](mailto:limafc.agro@gmail.com)

4 Graduando do curso de Engenharia Agrônômica/ Bolsista Pet Agronomia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, [marcossouza1210@hotmail.com](mailto:marcossouza1210@hotmail.com)

5 Graduando do curso de Engenharia Agrônômica/ Bolsista Pet Agronomia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB; [c.artur247@gmail.com](mailto:c.artur247@gmail.com)

6 Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. do Programa de Pós Graduação em Ciência Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, [ferminosouza@gmail.com](mailto:ferminosouza@gmail.com)

### Resumo

O Sisal (*Agave sisalana* Perrine) é uma cultura que apresenta um importante papel socioeconômico para o semiárido nordestino, principalmente no estado da Bahia, onde se concentra sua produção no Brasil. Nas últimas décadas, tem ocorrido um decréscimo na produtividade de sisal devido à ocorrência da podridão vermelha do caule causada pelo *Aspergillus niger*. Na procura de métodos alternativos para controle de fitopatógenos, o uso de extratos vegetais, tem apresentados resultados satisfatórios além de ser de origem natural, menos tóxicos ao homem e ao ambiente. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* a atividade do extrato de folhas de pau de rato no controle de *A. niger* e da podridão vermelha do sisal. O extrato aquoso de pau de rato foi obtido após as folhas serem triturada em liquidificador (10g em 1000 mL de água destilada) por três minutos, obtendo-se um extrato aquoso nas concentrações de 100 % (p/v). Posteriormente o extrato foi filtrado e depois foi exposto por 10 minutos à radiação ultravioleta em câmara de fluxo laminar ultravioleta (UV). Em seguida 4 concentrações (0%, 25%, 50% e 75%) foram adicionadas ao meio BDA (Batata, Dextrose, Agar), no momento de serem vertidos em placas de Petri. Um disco de micélio de *A. niger*, foi transferido para o centro da placa e incubados a 28°C. A cada 48 horas, foi avaliado o crescimento micelial do fungo, por meio da medição do diâmetro da colônia. O extrato de pau de rato nas concentrações de 0%, 25%, 50% e 75%, apresentaram uma percentagem de inibição do crescimento micelial do *A. niger* respectivamente de 0%, 37%, 100% e 84% em meio de cultura batata dextrose agar. A esporulação do patógeno em placas de petri, nas concentrações de 0%, 25%, 50% e 75 % do extrato foram de  $3,4 \times 10^8$ ;  $1,72 \times 10^8$ ; 0 e 0 esporos/ml. O número de esporos de *A. niger* em disco de caule de sisal foram de  $1,86 \times 10^9$ ;  $0,68 \times 10^9$ ;  $0,52 \times 10^9$  e  $0,6 \times 10^9$  nas concentrações de 0%, 25%, 50% e 75%, respectivamente. O extrato de pau de rato apresenta ação antifúngica ao *A. niger*.

Palavras-chaves: Metabólitos secundários, fitopatógenos, controle alternativo,

## Introdução

O sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm) desempenha importante papel sócio econômico no semiárido baiano, com uma área plantada de 265.089 hectares e 240.322 toneladas colhidas, correspondendo a 96% da produção nacional (IBGE 2012). O Brasil é líder no mercado internacional de fibra de sisal, respondendo por 47% das exportações da fibra em 2009 (SECEX, 2009). A principal utilização do sisal consiste na extração das fibras contidas em suas folhas, dando origem à principal fibra dura produzida no mundo (EMBRAPA, 2003). Utilizada na fabricação de cordas, tapetes, artesanatos entre outros (PIZARRO et al., 1999) e é essencialmente destinada à exportação, sendo os Estados Unidos, China, México e Portugal os principais importadores (SECEX, 2009).

As condições climáticas no semiárido da Bahia são desfavoráveis a exploração de outras culturas de importância econômica e o sisal se destaca como a principal atividade agrícola, juntamente com culturas de subsistência como mandioca, milho e feijão. No estado da Bahia, o sisal é cultivado em 75 municípios e estima-se que esta cadeia produtiva empregue, direta e indiretamente, 700.000 pessoas em todo o estado (CONSOLI, 2009).

Entretanto, esta cultura vem tendo um declínio em sua produtividade e área plantada devido a vários fatores, dentre os quais, destaca-se a podridão vermelha do sisal, doença que está ameaçando a cultura na região e que apresenta uma incidência média variando de 5 a 65% (ABREU, 2010; COUTINHO et al, 2006)

As principais características desta doença são a murcha e amarelecimento das folhas, descoloração avermelhada dos tecidos internos do caule e base das folhas, podridão do caule, morte e tombamento da planta (COUTINHO et al., 2006).

A literatura tem registrado a eficiência diversos extratos, obtidos de uma gama de espécies botânicas, em promover a inibição do desenvolvimento de vários fitopatógenos de natureza fúngica (WILSON et al., 1997; KURITA et al., 1981). O emprego dos chamados fungicidas naturais aparece como mais uma opção ao uso dos fungicidas sintéticos, em termos de eficiência de controle (WILSON & WISNIEWSKI, 1994).

No território brasileiro existe uma enorme variedade de espécies vegetais e, em virtude desta grande diversidade, estão presentes recursos naturais especialmente na caatinga, com grande potencial o que desperta o interesse pela busca de novas substâncias e alternativas para o controle de doenças.

A utilização de extratos vegetais no controle alternativo de pragas e doenças de plantas vem ganhando espaço no meio científico, uma vez que a sociedade vem pressionando as autoridades para uma possível redução no uso indiscriminado de defensivos agrícolas, numa tentativa de mudança no modo de viver, com a busca por produtos mais saudáveis e livres de substâncias químicas que causam problemas de saúde (MAIRESSE e COSTA, 2009).

Segundo Carvalho et al (2002) os extratos de plantas medicinais que apresentam propriedades antifúngicas podem ser uma alternativa ecológica para substituir o uso



de defensivos químicos e estes ainda podem ser associados às práticas de manejo integrado de doenças o que pode atender à grande procura atual por produtos para a produção agroecológica.

*Caesalpinia pyramidalis* é uma espécie de ampla dispersão no semiárido nordestino, podendo ser encontrada em diversas associações vegetais, além de ser considerada endêmica do bioma Caatinga. Esta planta é conhecida também pelos nomes populares: catinga-de-porco, catingueira-das-folhas-largas, mussitaiba, pau-de-porco e pau-de-rato. Entre as múltiplas utilidades destacam-se o potencial madeireiro, medicinal, uso veterinário popular, restauração florestal, sistemas agroflorestais, forragem, aplicações industriais e potencial apícola (MAIA, 2004).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência do extrato aquoso de pau de rato (*Caesalpinia pyramidalis*) no controle do *Aspergillus niger* e da podridão vermelha do sisal.

## Material e métodos

Obtenção dos extrato aquoso pau de rato (*Caesalpinia Pyramidalis*) e preparo dos meios de cultivo

As amostras de pau de rato (*Caesalpinia Pyramidalis*) foram obtidas da região semiárida produtora de sisal, lavadas com água destilada e triturada em liquidificador (10g em 1000 mL de água destilada) por três minutos, obtendo-se um extrato aquoso nas concentrações de 100 % (p/v). O extrato foi filtrado primeiramente em peneira plástica, depois o mesmo foi exposto por 10 minutos à radiação ultravioleta em câmara de fluxo laminar. As outras concentrações estudadas dos extrato 25%, 50% e 75% foram obtidas diluindo os extrato aquoso de pau de rato na concentração inicial de 100% (p/v) e adicionando ao meio de cultura BDA, depois deste ter sido esterilizado em autoclave e quando se encontrava na temperatura próxima ao ponto de solidificação. Para não ocorrer à diluição do meio de cultura com a adição do extrato vegetal, no preparo deste meio de cultura, diminuiu-se o volume de água adicionado, de acordo com a quantidade de extrato que seria adicionado após a esterilização do meio.

Avaliação *in vitro* dos extrato aquoso pau de rato (*Caesalpinia Pyramidalis*). no crescimento micelial e esporulação do *A. niger*

O extrato vegetal foi misturado em meio de cultura BDA (batata, dextrose, ágar), em três diferentes concentrações, quando o meio de cultura se encontrava na temperatura próxima ao ponto de solidificação, o qual foi vertido em placas de Petri. O fungo *A. niger*, isolado de planta de sisal com sintomas de podridão vermelha, foi multiplicado em meio BDA por sete dias à temperatura ambiente ( $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Posteriormente, com uma alça de platina, uma pequena porção de esporos foi transferida assepticamente para o centro das placas contendo o meio BDA com as diferentes concentrações do extrato aquoso e foram incubados em câmara de crescimento tipo BOD à  $28^\circ\text{C}$ . A avaliação foi realizada a cada 2 dias, medindo-se o diâmetro da cultura, com uma régua milimetrada. A medição foi realizada até quando a cultura do tratamento controle atingiu as bordas da placa de Petri. Para a contagem de esporos nas culturas crescidas no meio BDA com diferentes

concentrações de extrato de pau de rato, foram adicionados 20 mL de solução salina esterilizada com duas gotas de Tween 20<sup>®</sup> sobre a cultura de *A. niger* e em seguida, a colônia foi raspada com uma alça de Drigalski para a obtenção da suspensão de esporos. A contagem de esporos de *A. niger* foi feita com uma câmara de Neubauer (hemacitômetro) e microscópio ótico com aumento de 100X, calculando-se a concentração no volume total de 20 mL. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com oito repetições. Os dados foram analisados por regressão com o programa estatística SISVAR.

Avaliação do extrato aquoso de pau-de-rato (*Caesalpinia Pyramidalis*) na esporulação do *A. niger* em discos do caule de mudas de sisal

Inicialmente foram cortados pedaços do caule de mudas de sisal em forma de discos (cortes transversais), com aproximadamente 17 mm de diâmetro x 5 mm de altura. Em seguida, os discos do caule de sisal foram lavados e desinfestados em álcool 70% e hipoclorito de sódio 1%, ambos por cinco minutos, seguido de duas lavagens com água destilada e esterilizada, conforme definido por SÁ, (2009). Os mesmos foram tratados por imersão nas diferentes concentrações do extrato vegetal durante doze horas. Posteriormente, esses discos foram colocados em potes de plástico descartáveis (potes com capacidade para 100 mL, um disco de sisal por pote), contendo fina camada de papel toalha esterilizado no fundo. Em seguida, foram inoculados, por meio de adição de 1 mL de uma suspensão de esporos de *A. niger* na concentração de  $10^7$  conídios. mL<sup>-1</sup>. Foi utilizado um controle positivo composto por discos de caule não inoculados, com o propósito de verificar a eficiência do processo de desinfestação desses discos. O material foi incubado em câmara de crescimento tipo BOD a 28 °C por cinco dias. Após a incubação, os discos de sisal foram transferidos para frascos de Erlenmeyer com capacidade de 50 mL, contendo 20 mL de solução salina (0,85% NaCl), com 100 µL de Tween 20, sendo estes agitados durante 1 minuto para obtenção da suspensão dos esporos da cultura de *A. niger* que cresceu nos discos de sisal. A contagem de esporos de *A. niger* dessa suspensão foi feita com uma câmara de Neubauer (hemacitômetro) e microscópio ótico com aumento 100X, calculando-se a concentração de esporos no volume total de 20 mL da solução salina. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com dez repetições. Os dados foram analisados por regressão, com o programa estatística SISVAR.

## Resultados e discussão

O extrato de pau de rato em BDA, esterilizado por luz ultravioleta, em todas as concentrações promoveu inibição no crescimento micelial do *A. niger*. A concentração de 25% causou 34% de inibição, enquanto que as concentrações de 50% e 75% inibiram o crescimento micelial do patógeno em 100% e 84% respectivamente (Figura1 e 3). Souza (2010), estudando extrato aquoso de alho (*Allium sativum* L.) evidenciou que o extrato aquoso nas concentrações de 1,75; 2,5 e 5% inibia o crescimento micelial de *A. niger* em 13,25; 44,5 e 100%, respectivamente.

O estudo desenvolvido por Brand et al. (2009), com o extrato aquoso de alho, apresentou 100% de controle de *Trichoderma* spp. e 94,4% de controle de *Aspergillus* spp. A aplicação de extrato de alho proporcionou estresse oxidativo em

células de *Candida albicans*, acarretando na inibição do crescimento das colônias do fungo e na desestruturação dos componentes celulares (LEMAR et al. 2005).

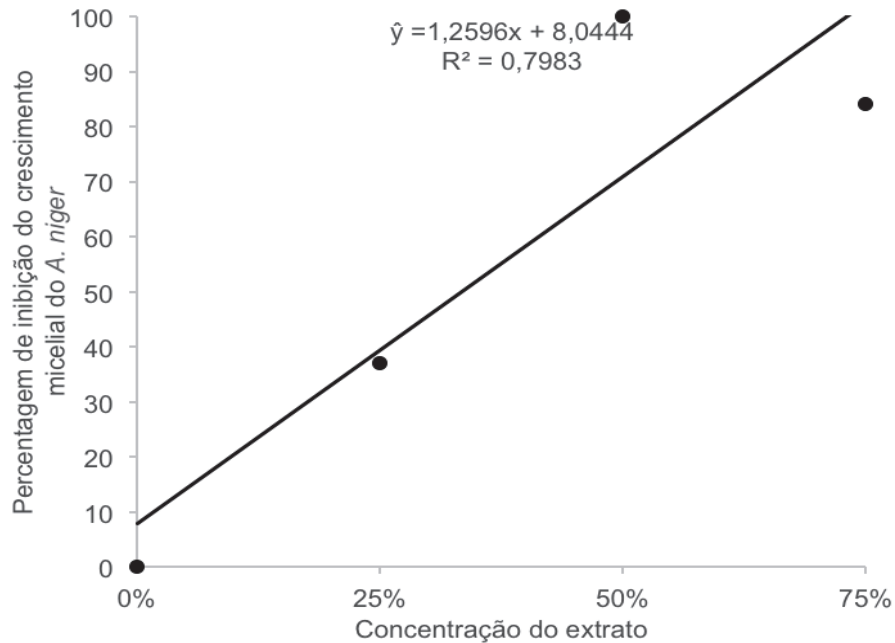


Figura 1. Percentagem de Inibição do crescimento micelial do *A. niger* em meio batata, dextrose e ágar (BDA) com Extrato aquoso de pau de rato em diferentes concentrações. A concentração 0 corresponde tratamento (-), apenas BDA.

Todos as concentrações do extrato aquoso de pau de rato causaram redução no diâmetro das colônias de *A. niger*, quando comparadas ao tratamento controle (BDA sem extrato). O controle apresentou o diâmetro de colônia de 9,0 cm, sendo que nas concentrações 25%, 50% e 75% diâmetros de colônia foram de 5,82cm; 0,0cm e 1,44cm (Figura 2 e 3).

As substâncias atuantes no extrato vegetal como antibactericidas, antifúngicos e antivirais são provenientes do metabolismo secundário e apresentam um importante papel na adaptação dos vegetais aos ecossistemas distintos (HARBORNE, 1988; AERTS et al., 1991).

A ação inibitória dos compostos fenólicos no crescimento micelial está correlacionado com a capacidade que as substâncias fenólicas apresentam de complexar-se a proteínas extracelulares da membrana, provocando a morte celular (COWAN, 1999).

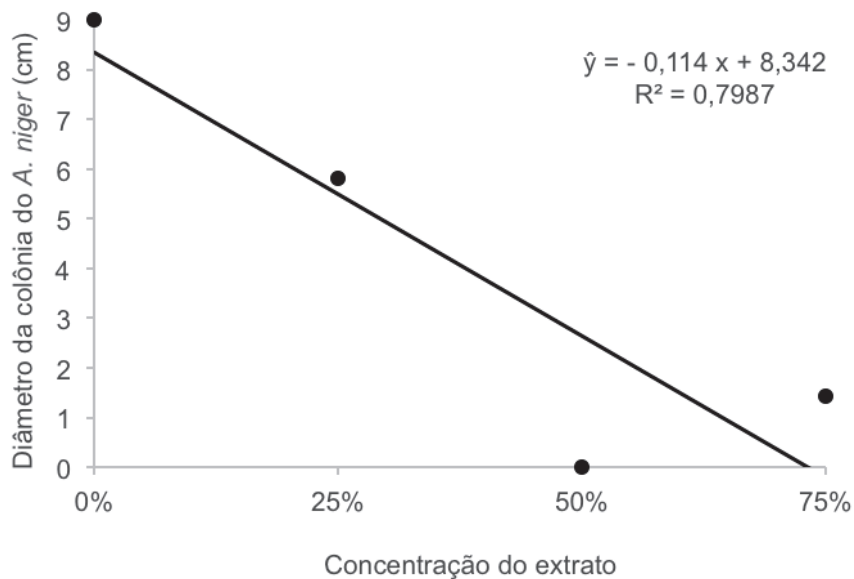


Figura 2. Diâmetro da colônia do *A. niger* em meio batata, dextrose e ágar (BDA) com extrato aquoso de pau de rato em diferentes concentrações. A concentração 0 corresponde tratamento (-), apenas BDA.

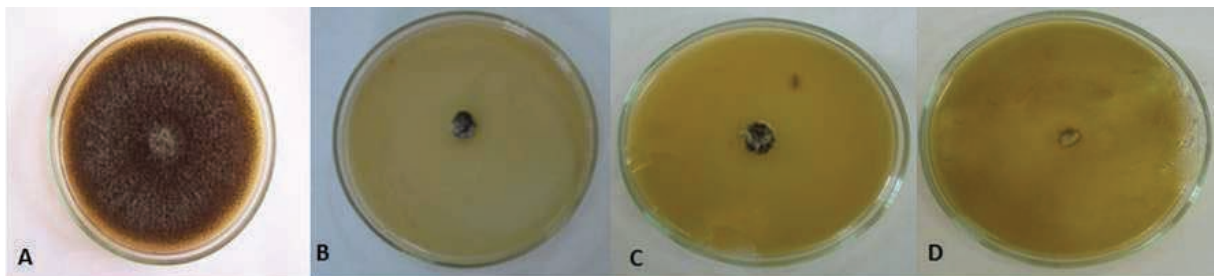


Figura 3. Diâmetro da colônia e esporulação de *A. niger* em placas de Petri em meio BDA com diferentes com diferentes concentrações de extrato de pau de rato: A) controle (-) apenas BDA; B) 25%; C) 50% e D) 75%.

Na avaliação da esporulação do patógeno em placas de Petri, os tratamentos com o extrato nas concentrações de 25%, 50% e 75 % obtiveram os números de  $1,72 \times 10^8$ ; 0 e 0 esporos/ml resultados bastante satisfatório quando comparado ao do controle que apresentou  $3,4 \times 10^8$  esporos/ml. Foi evidenciado na figura (3 e 4) a eficiência do extrato de pau de rato na inibição da esporulação do *A. niger*. Segundo Souza (2010), O extrato de alho esterilizado por filtração inibe a esporulação *in vitro* do *A. niger* em 100 % nas concentrações acima de 3 %.

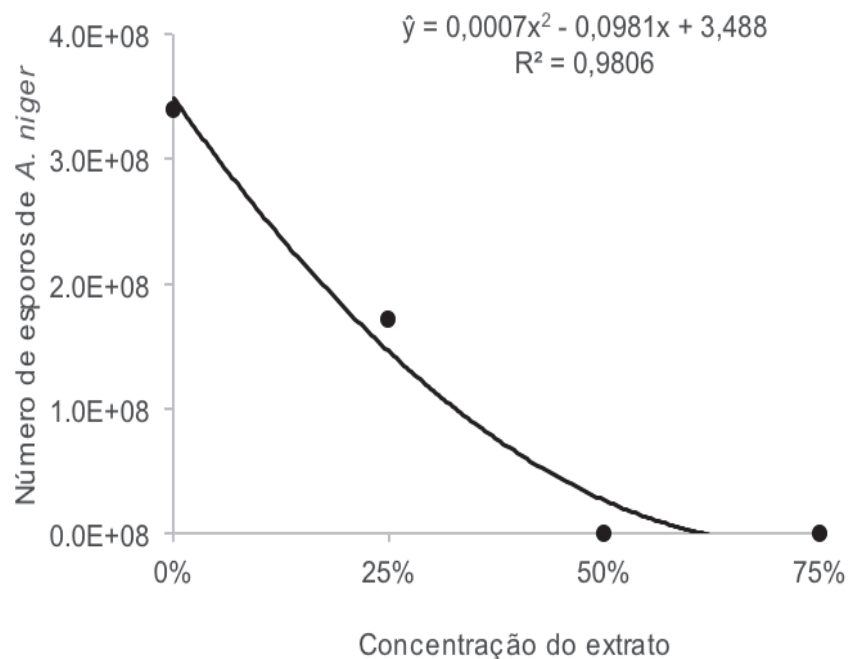


Figura 4. Número de esporos de *A. niger* em meio batata, dextrose e ágar (BDA) em diferentes concentrações de extrato aquoso de pau de rato. A concentração 0 corresponde tratamento (-), apenas BDA.

Os bons resultados quanto à inibição na esporulação do *A. niger* in vitro e em disco de caule de sisal estão associado aos metabolitos secundários e saponinas existentes no vegetal.

As fitoalexinas são metabolitos secundários, antimicrobiano, de baixo peso molecular e produzido pelas plantas em respostas a estresses físicos, químicos ou biológicos, sendo capazes de impedir ou reduzir a atividade micobriana de agentes patogênicos (PURKAYASTHA, 1995).

A esporulação em discos de sisal tratados por imersão durante 12 horas com as diferentes concentrações do extrato aquoso do pau de rato evidenciaram que todas as concentrações apresentaram ação inibitória na esporulação do *A. niger* quando comparado ao controle que utilizou apenas água destilada (figura 5 e 6). Entretanto, a concentração mais eficiente foi a de 50% que apresentou  $0,52 \times 10^9$  esporos/ml, sendo que a concentração de esporos noo tratamento controle foi de  $1,82 \times 10^9$  esporos/ml. Stangarlin et al. (2011), relata que extratos brutos de plantas apresentam potencial para o controle de fitopatógenos, em virtude da ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos.

Os compostos presentes nos extrato aquoso de pau de rato (*Caesalpinia Pyramidalis*) inibem a esporulação do *A. niger*, em disco de caule de sisal, em todos as doses. A ação das fitoalexinas sobre os fungos inclui a granulação citoplasmática, a desorganização dos conteúdos celulares, inibição da germinação e alongação do tubo germinativo por algumas enzimas, com conseqüente inibição ou redução do crescimento micelial (LO et al., 1996). Krugner e Bacchi (1995), descrevem que compostos secundários tais como saponinas e flavonóides, presentes nos extratos

aquosos ou em óleos essenciais, podem inibir ou estimular a esporulação e o crescimento micelial de fungos

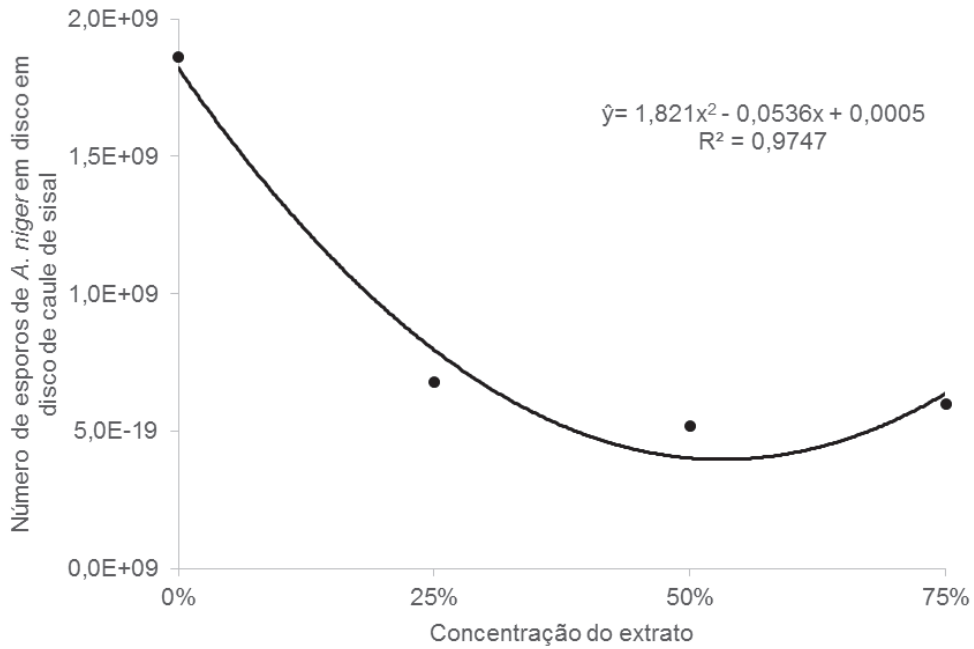


Figura 5. Número de esporos de *A. niger* em disco de sisal em diferentes concentrações de extrato aquoso de pau de rato. A concentração 0 corresponde tratamento (-) utilizando apenas água destilada

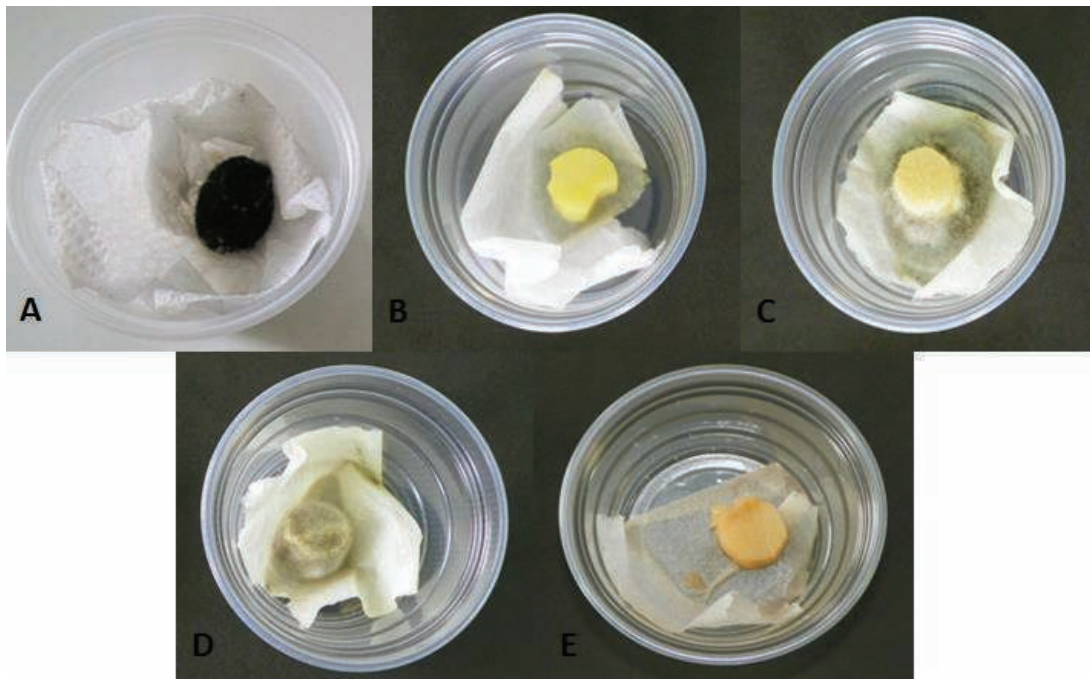


Figura 6. Discos desinfestados de caule de sisal, tratados por imersão com diferentes concentrações de extrato aquoso de pau de rato: A) controle (-); B) controle (+); C) 25%; D) 50% e E) 75%, inoculados com *A. niger* e incubados por cinco dias a  $28\pm 2^\circ\text{C}$ .



## Conclusão

O extrato de pau-de-rato (*Caesalpinia Pyramidalis*) esterilizado por luz ultravioleta apresenta potencial para o controle do *A. niger*.

O extrato aquoso de pau de rato inibiu o crescimento micelial e a esporulação do patógeno em BDA e disco de caule de sisal a partir da concentração de 25%.

Os testes em discos de caule de sisal mostraram o potencial de uso dos extrato de pau-de-rato para controle de *A. niger. in vitro* e em disco de caule de sisal. Entretanto é necessário mais estudos, para utilização no controle da podridão vermelha do sisal, e nos mecanismos de aplicação.

## Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da UFRB pela oportunidade. À CAPES e CNPq pelo financiamento e a FAPESB pela bolsa de doutorado.

## Referências bibliográficas

- ABREU, K. C. L. de M. Epidemiologia da podridão vermelha do sisal no Estado da Bahia. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, 2010.
- AERTS, R. J. et al. Allelopathic inhibition of seed-germination by Cinchona alkaloids. *Phytochemistry*. Oxford: Pergamon press, v. 30, p. 2947-295, 1991.
- BRAND, S. C.; JUNGES, E.; MILANESI, P.; BLUME, E. & MUNIZ, M.F. B. Extratos vegetais no controle de patógenos em sementes de cebola. 2006. Disponível em: [www.ufpel.edu.br/cic/2006/arquivos](http://www.ufpel.edu.br/cic/2006/arquivos). Acesso em: 23 fev.2009.
- CARVALHO, R. A.; LACERDA, J. T.; OLIVEIRA, E. F.; SANTOS, E. S. Extratos de plantas medicinais como estratégia para o controle de doenças fúngicas do inhame (*Dioscorea* sp.) no Nordeste. In: Simpósio Nacional sobre as culturas do inhame e do taro. João Pessoa, PB. João Pessoa: Anais Emepa. v.1, p.99-112. 2002. 312 p.
- COUTINHO, W. M.; LUZ, C. M.; SUASSUNA, N. D.; SILVA O. F. E.; SUINAGA, F. A. A podridão vermelha do tronco do Sisal, Embrapa, 2006.
- CONSOLI. M.A., SCARE, R. F., PINTO, M. J. A. MARKESTRAT. Plano de Melhoria Competitividade do APL dos Fornecedores da Indústria Automotiva. Ribeirão Preto, 2009, p.119.
- COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology* v.12, p. 564-582, 1999.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Sisal/CultivodoSisal/index.html>. Acesso em: Jan 2014.
- HARBORNE, J. B. Introduction to Ecological Biochemistry. London: Academic Press. 1988.
- IBGE, 2012. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento Sistemático da produção agrícola, Rio de Janeiro v.25 n.02, p.79, 2012.
- KURITA, N. et al. Antifungal activity of components of essential oils. *Agricultural and Biological Chemistry*, v.45, p.945-52, 1981.

LEMAR K.M.; PASSA O.; AON M.A. Allyl alcohol and garlic (*Allium sativum*) extract produces oxidative in *Candida albicans*. *Microbiology* (Reading, Engl.) v.151, p. 3257- 3265. 2005.

LO, S.C.; WEIERGANG, I.; BONHAM, C.; HIPSKIND, J.; WOOD, K.; NICHOLSON, R.L. Phytoalexin accumulation in sorghum: identification of a methyl ether of luteolinidin. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v.49, n.1, p.21-31, 1996.

MAIA, G. N. Catingueira. In: MAIA, G. N. Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades. São Paulo: Leitura e Arte, p.159-165. 2004.

MAIRESSE, L. A. S., COSTA, E. C. Contaminação ambiental pela agricultura e as novas perspectivas com a moderna biotecnologia. *Orium*, Santa Maria 159 p. 2009.

OLIVEIRA DE SÁ, J. Patogênese de *Aspergillus niger* e biocontrole da podridão vermelha do sisal por *Trichoderma* spp. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) Universidade Federal do Recôncavo da Bahia: Cruz das Almas. 2009. p. 65.

PIZARRO, A, P, B., OLIVEIRA FILHO, A, M., PARENTE, J, P. MELO, M.T.V., SANTOS, C. E., LIMA, P. R. O aproveitamento do resíduo da indústria do sisal no controle de larvas de mosquitos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 32, n.1, p. 23-29, 1999.

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

SECEX - SECRETÁRIA DE COMÉRCIO EXTERIOR. Exportações Brasileiras, 2009. Disponível em: [www.desenvolvimento.gov.br](http://www.desenvolvimento.gov.br) Acesso em: 17 de janeiro de 2014.

SOUZA, L. S. S. Extratos aquosos de alho (*Allium sativum* L.) e sisal (*Agave sisalana* Perrine) no controle de *Aspergillus niger* e da podridão vermelha do sisal, 2010, 91f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2010.

STANGARLIN, J. R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. *Scientia Agraria Paranaensis*. V. 10, número 1 - p. 18-46, 2011.

SOARES, A. C. F.; SALOMÃO, M. S.; ALMEIDA, N. de S.; PEREZ, J. O.; GARRIDO, M. da S. *Aspergillus niger* como agente causal de manchas foliares e podridão do pseudocaule do sisal. In: XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Salvador, Anais..., BA. 2006.

WILSON, C.L.; SOLAR, J.M.; GHOUTH, A.E.; WINIEWSKI, M.E. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*, v.81, p.204-210, 1997.

WILSON, C.L.; WISNIEWSKI, M.E. Biological control of postharvest plant diseases of fruits and vegetables: theory and practice. Boca Raton: CRC Press, 1994.

**CONTROLE DO MAL-DO-PANAMÁ EM BANANEIRA COM  
*Trichoderma* spp. E DIFERENTES PERIODOS DE INOCULAÇÃO**

## CONTROLE DO MAL-DO-PANAMÁ EM BANANEIRA COM *Trichoderma* spp. E DIFERENTES PERIODOS DE INOCULAÇÃO

Liane Santos Sales Souza 1; Ana Cristina Fermino Soares 2 ;Carlos Eduardo Crispim de Oliveira Ramos 3; Antônia Edina de Souza Silva 4; Quelli França Pimentel 4; Vanessa Ferreira de Jesus 5; Gilcimar Jesus das Candeias 5

1-Aluno de Doutorado em Ciências Agrárias da UFRB, salesliane@hotmail.com

2-Professor orientador do programa de pós graduação em Ciências Agrárias da UFRB, ferminosoares@gmail.com

3- Professor do CCAAB (Centro de Ciências Agrárias e Ambientais) da UFRB, jaguaricarlos@gmail.com

4-Aluno do curso de graduação em biologia da UFRB, edina91biologia@hotmail.com, quellipimentel@hotmail.com

5-Aluno do curso de graduação em agronomia da UFRB e bolsista PIBIC, vanessadejesus94@hotmail.com.br, gil.candeias@hotmail.com

### Introdução

A bananeira (*Musa cvs.*) é cultivada em todos os estados do Brasil, sendo o seu fruto um dos mais populares (LOPES e ALBUQUERQUE, 2005).

A cultura é atacada por diversos patógenos que causam queda na produtividade e morte prematura das plantas. Dentre as doenças que causam mais danos aos produtores pode-se citar o Mal-do-Panamá, causada pelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, que afeta o sistema vascular das plantas, causando danos irreversíveis, podendo este sobreviver no solo por até 50 anos (PEREIRA et al., 2005).

O *F. oxysporum* e outros patógenos fúngicos que sobrevivem no solo são de difícil controle, o que tem estimulado as pesquisas com controle biológico em diferentes culturas (SILVA e BETTIOL, 2005).

Dos fungos com ação antagônica a *F. oxysporum*, o gênero *Trichoderma* tem sido um dos mais estudados, por ser facilmente encontrado no solo, apresentando importante função ecológica, com ação na decomposição e mineralização dos resíduos vegetais, tornando os nutrientes disponíveis para as plantas (SAITO, et al., 2009). Os principais mecanismos de antagonismo deste fungo incluem a antibiose, parasitismo, competição e indução de resistência (Arras e Arru, 1997), com destaque para antibiose e, eventualmente, parasitismo e competição (KUPPER et al., 2009). A aplicação de *Trichoderma* no solo, em condições de casa de vegetação ou campo reduz a severidade de doenças, como também aumenta o crescimento das plantas (HARMANN, 2000).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação antagonista e periodos de inoculação de isolados de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* e a incidência e severidade do Mal-do-Panamá em bananeira.

### Metodologia

Em condições de casa de vegetação, foi instalado um experimento com 280 mudas de bananeira da cultivar 'Prata Maravilha', inoculadas com diferentes

isolados de *Trichoderma* spp., variando o período e a frequência de inoculação, em bandejas tipo tubete. Essas mudas foram transplantadas para sacos de muda com capacidade de 2L, contendo solo esterilizado, infestado e incubado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

O solo foi coletado na área de pastagem do campus de cruz das Almas da UFRB, na camada de 0 a 20 cm de profundidade, peneirado e esterilizado quimicamente com Basamid®, seguindo as recomendações do fabricante. Antes da infestação com o patógeno, o solo ficou em repouso por 90 dias, para que não houvesse nenhum resíduo do tratamento químico. Para a infestação do solo, após a sua esterilização, fez-se uma inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, isolado codificado como 0801 obtido da coleção da EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, adicionando-se ao solo, com agitação manual, 10 mL da suspensão de inoculo contendo  $10^6$  conídios/mL em cada um dos sacos. O solo infestado foi incubado por 30 dias a temperatura ambiente sendo umedecido a cada 7 dias.

As mudas de bananeira da cultivar 'Prata Maravilha' foram obtidas da biofábrica de mudas micropropagadas de bananeira, empresa Campo, localizada nas dependências da Embrapa Mandioca e Fruticultura, já aclimatadas em bandejas tipo tubete em casa de vegetação. As mudas de bananeira foram mantidas nas bandejas tipo tubete, com 128 células de  $20\text{ cm}^3$  de volume, altura de 4,6 cm e largura na superfície do tubete de 3,1 cm, com fibra de coco. Estas foram inoculadas com isolados de *Trichoderma* spp. da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Agrícola da UFRB, utilizando-se 1mL de suspensão de conídios, na concentração de  $10^6$  conídios/mL. A inoculação foi realizada em três períodos distintos (apenas uma inoculação no início do experimento, inoculação repetida a cada sete dias e inoculação repetida a cada 15 dias), durante um mês. Portanto, o tratamento 1 recebeu uma inoculação com *Trichoderma*, o tratamento 2 recebeu quatro inoculações e o tratamento 3 recebeu duas inoculações.

Após 7 dias a última inoculação com *Trichoderma* spp., as mudas foram transferidas para os sacos contendo o solo incubado com *F. oxysporum* f. sp. *cubense* e foram mantidas em casa de vegetação com irrigação em dias alternados, com água potável não estéril durante 30 dias.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, totalizando 20 blocos com 14 plantas por parcela experimental, com esquema fatorial  $4 \times 3 + 2$  e 20 repetições. Foram utilizados quatro isolados de *Trichoderma* spp., codificados como TCS 10, TCS 29, TCS 40 e TCS 78, com três períodos de inoculação e dois controles. O controle positivo foi constituído por apenas solo esterilizado e irrigação com água potável e o controle negativo foi constituído por solo esterilizado e infestado com *F. oxysporum*.

O experimento foi coletado e avaliado 75 dias após o plantio das mudas de bananeira nos sacos, para a análise da produção de matéria fresca e seca da parte aérea e raízes, incidência e severidade da doença, calculando-se o índice de doença nas mudas, com base na escala de notas proposta por CORDEIRO e DANTAS (1993). O índice de infecção (ID) por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* foi calculado de acordo com a equação proposta por CIRULLI e ALEXANDER (1966),  $ID = 100[\sum (\text{nota} \times \text{n}^\circ \text{ de mudas}) / (\text{nota máxima} \times \text{n}^\circ \text{ de repetições})]$ , atribuindo-se notas de 1 a 6, de acordo com escala de notas citada acima.

Determinou-se também a população do patógeno no solo infestado 30 dias após a incubação e no final do experimento, pela metodologia de diluição seriada e contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) no solo. Amostras de solo foram retiradas de todos os tratamentos e repetições e 10 g de cada amostra de solo

foram resuspendidas em 90 ml de solução salina esterilizada e agitadas por 30 min em agitador orbital. A partir dessa suspensão de solo foram preparadas as diluições seriadas e alíquota de 0,1 ml foram transferidas para placas de Petri contendo meio batata dextrose ágar (BDA) com 1 ml.L de Tormicina®. O inoculo foi espalhado nas placas com uma alça de Drigalski esterilizada por flambagem e estas foram incubadas em câmara de crescimento tipo BOD a 25° C, por três dias. Após o período de incubação fez-se a contagem das UFC e o calculo da população de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* por grama de solo, utilizando-se a seguinte equação:  $UFC/g = N \times F \times Y$  sendo: N = o número de colônias, F = 10 (fator de correção do plaqueamento de 100 µl de suspensão por placa para 1 ml), Y = fator de diluição da amostra. Para a análise estatística, os dados foram transformados em  $\log(x + 1)$ , em que x corresponde ao número de UFC.

## Resultados e discussão

Após 30 dias de incubação do solo infestado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* e antes do plantio das mudas de bananeira, obteve-se uma população de  $9,95 \times 10^7$  UFC.g do patógeno no solo. Após 75 dias do plantio das mudas de bananeira, foram observados os maiores valores de população do patógeno no solo, para os tratamentos com mudas de bananeira inoculadas com o isolado TCS 78 de *Trichoderma* spp., nos três intervalos de inoculação, com o isolado TCS 29 com apenas uma inoculação, e com o isolado TCS 10 inoculado a cada sete dias. Com exceção do tratamento com o isolado TCS 78, a inoculação a cada 15 dias com *Trichoderma* spp., proporcionou valores mais baixos da população de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* no solo (Tabela 1).

**Tabela 1.** População de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. (UFC g<sup>-1</sup> de solo), após 75 dias de incubação.

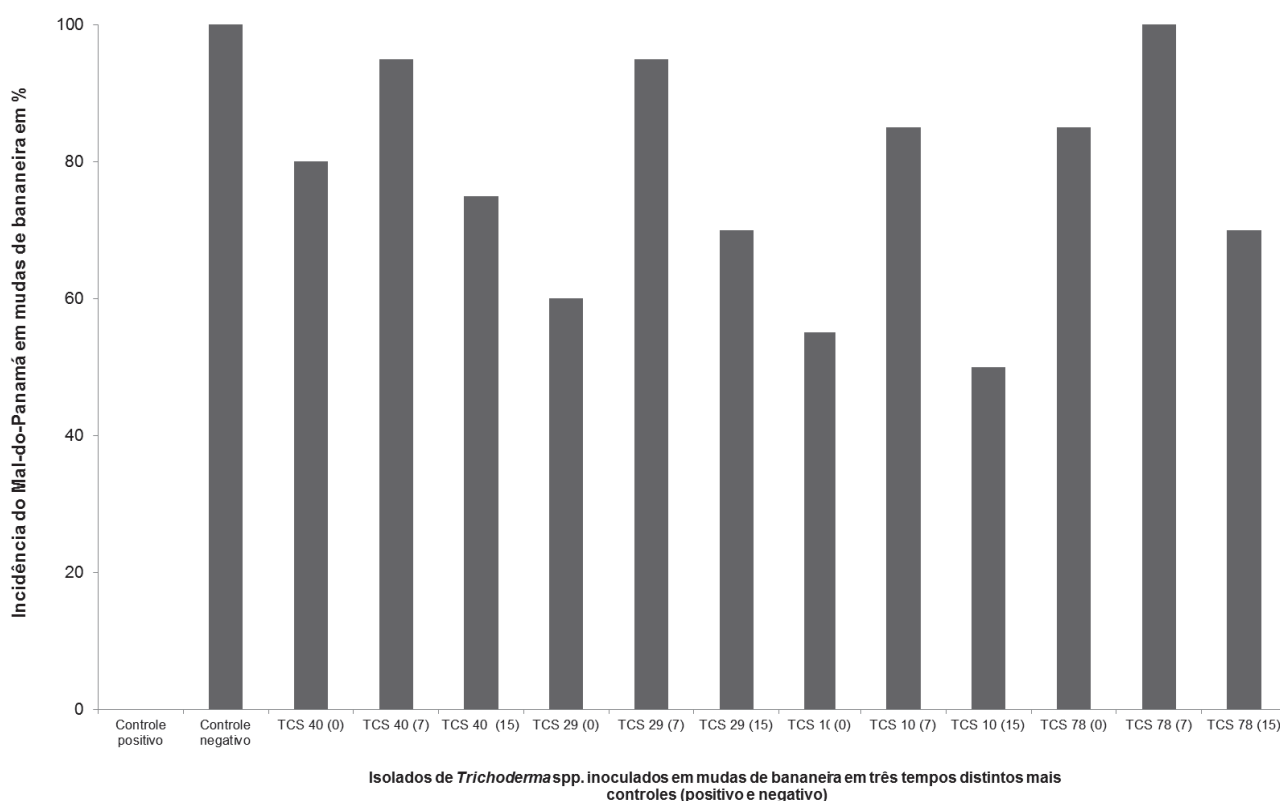
Tratamentos		<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i> UFC.g de solo
<i>Trichoderma</i> spp.	Inoculação*	(Avaliação ao final do experimento)**
TCS 10	0	$1,16 \times 10^6$
TCS 10	7	$41,7 \times 10^6$
TCS 10	15	$0,58 \times 10^6$
TCS 29	0	$75,0 \times 10^6$
TCS 29	7	$5,0 \times 10^6$
TCS 29	15	$0,50 \times 10^6$
TCS 40	0	$11,70 \times 10^6$
TCS 40	7	$1,25 \times 10^6$
TCS 40	15	$0,75 \times 10^6$
TCS 78	0	$58,33 \times 10^6$
TCS 78	7	$36,66 \times 10^6$
TCS 78	15	$58,33 \times 10^6$
Controle +		0
Controle -		$1,25 \times 10^6$



\* 0 - inoculação no dia do plantio das mudas de bananeira nas bandejas tubetes; 7 – quatro inoculações sendo cada uma em intervalos de 7 dias; 15 – duas inoculações em intervalos de 15 dias.

\*\* Avaliação da população de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* no solo, 75 dias após o plantio das mudas de bananeira tratadas com *Trichoderma* spp.

Com relação à incidência do Mal-do-Panamá nas mudas de bananeira, o isolado TCS 10 nos tempos de aplicação 0, e a cada 15 dias, apresentaram os menores índices. Os demais tratamentos apresentaram índices a partir de 50% (Figura 1).



**Figura 1.** Incidência do Mal-do-Panamá em mudas de bananeira inoculadas com isolados de *Trichoderma* spp. em diferentes períodos e intervalos de tempo e plantadas em solo com FOC 0801 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*), após 75 dias de plantio no solo infestado com FOC. Controle positivo (C+) sem inoculação dos isolados de antagonista e patógeno e Controle negativo (C-) inoculado apenas o patógeno

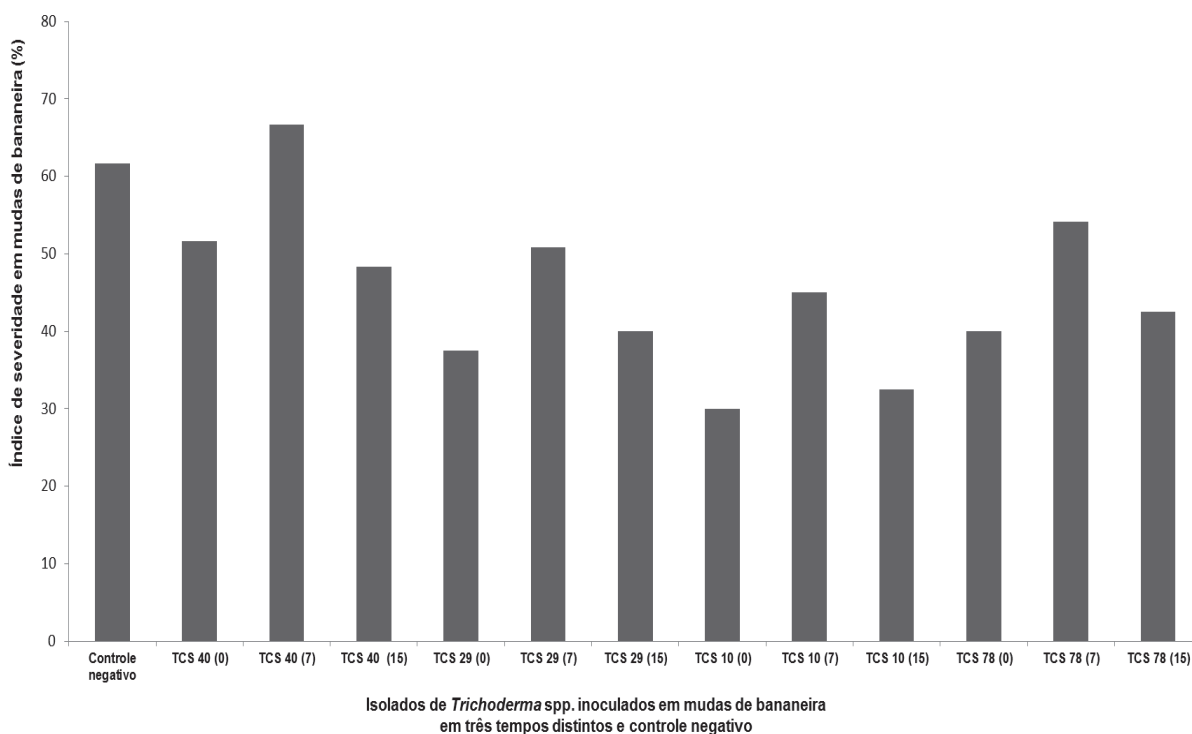
O índice de severidade da doença, avaliado por escala de notas com base nas lesões nos tecidos vasculares das mudas de bananeira tratadas com isolados de *Trichoderma* spp., indica que o isolado TCS 10, nos tempos de aplicações 0 e a cada 15 dias, promoveu os melhores resultados comparados aos outros tratamentos, com um maior número de plantas sem sintomas do Mal-do-Panamá ou com sintomas do tipo 2 ou 3 baseando-se na escala de notas proposta por CORDEIRO e DANTAS (1993) (Figura 2).

O tratamento com o isolado TCS 78, mesmo apresentando um número elevado de UFC do patógeno no solo, apresentou um incidência da doença em torno de 60 %, com a inoculação do antagonista a cada 15 dias e com valores de severidade em torno de 40 % nos tratamentos com apenas uma inoculação.

Os tratamentos com os isolados TCS10, TSC 78 e TCS 29 apresentaram menores taxas de índices de severidade da doença quando inoculados apenas uma vez (Figura 2).

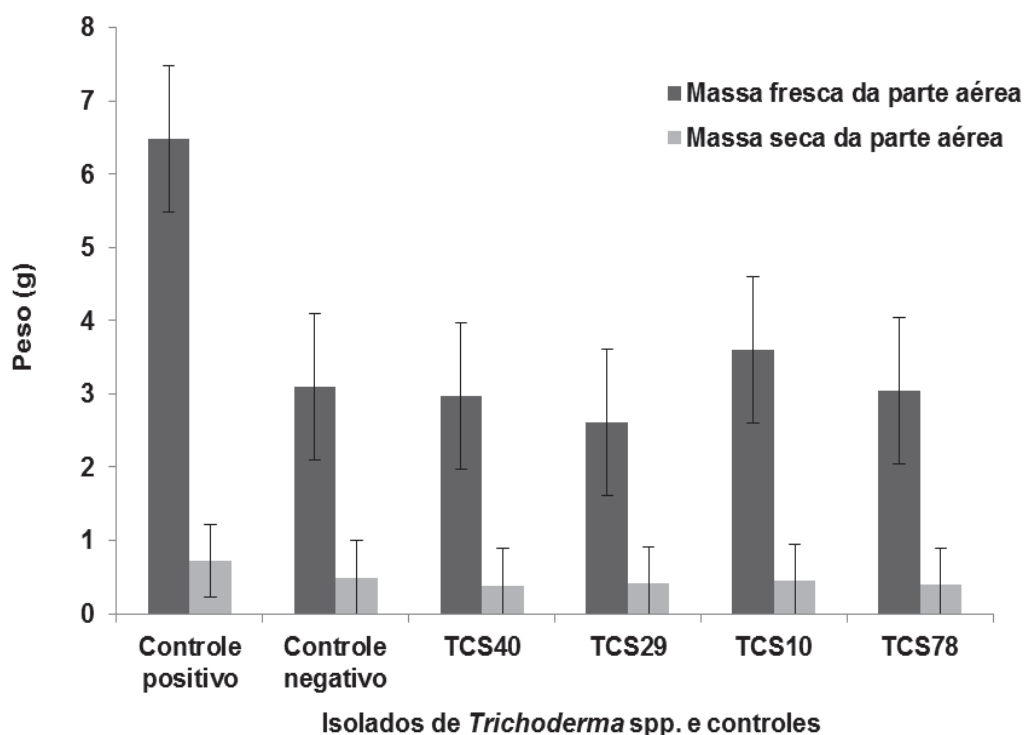
Hernández et al. (2011) em testes de biocontrole ao Mal-do-panamá usando isolados endofíticos de *Trichoderma* spp. TC9, TD3, TD6, TC12, TCL1, TC8 e TJ5 em mudas de bananeira da variedade 'Gros Michel' (AAA) obtiveram redução da severidade dos sintomas internos em 74% e 63% na descoloração dos tecidos internos quando comparados a outros tratamentos.

Em testes com isolados de *Trichoderma harzianum* A34 observou-se a redução da incidência e dos sintomas externos do Mal-do-Panamá em plantas CEMSA Bluggoe -ABB, FHIA 03 -AABB e FHIA 23 -AAAB, mantendo sua produção por mais cinco anos em solos propensos a doença (PEREZ et al. 2009).



**Figura 2.** Índice de severidade de Mal-do-Panamá em mudas de bananeira com base na escala de notas proposta por CORDEIRO e DANTAS (1993), inoculadas com isolados de *Trichoderma* spp. em diferentes intervalos de tempo e plantadas em solo infestado com FOC 0801 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) após 75 dias de plantio das mudas no solo infestado com FOC. Controle negativo (C-) inoculado apenas o patógeno.

Com relação à produção de massa fresca da parte aérea das mudas de bananeira, o isolado TCS 10 promoveu os melhores resultados, quando comparados com os demais tratamentos. Entretanto, os resultados de massa seca da parte aérea não apresentaram diferença significativa ( $p \geq 0,05$ ) (Figura 3).

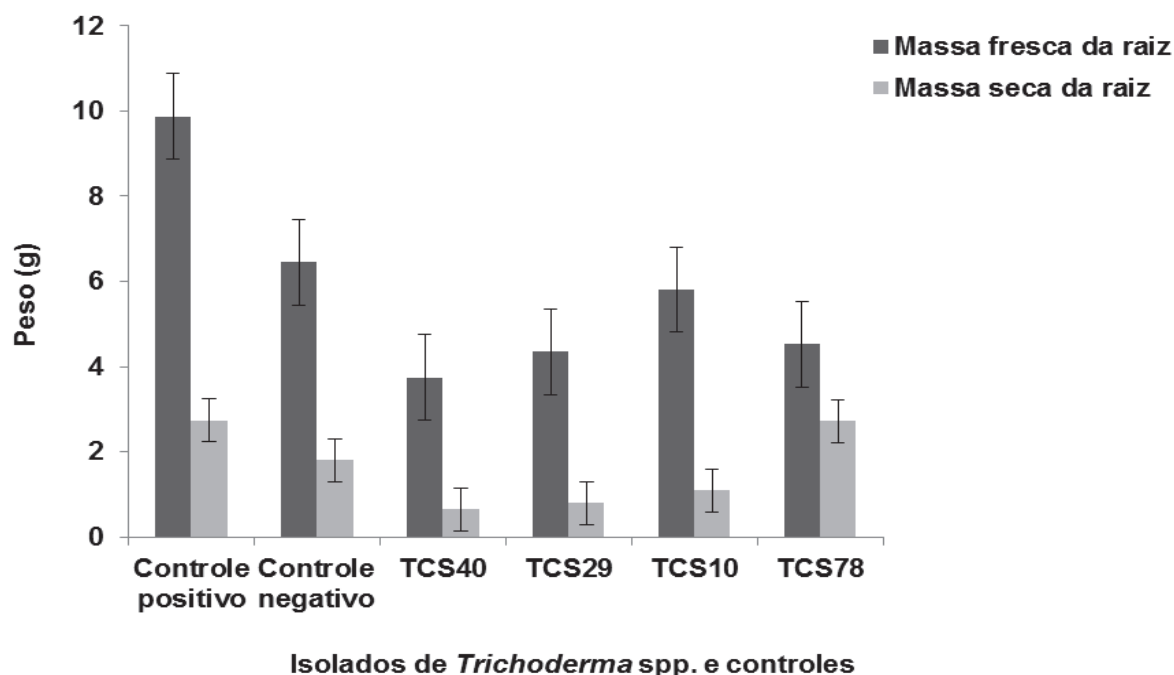


**Figura 3.** Peso da massa fresca e seca da parte aérea de mudas de bananeira após 75 dias de incubação os isolados de *Trichoderma* spp. , FOC (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense*). Controle positivo (C+) sem inoculação dos isolados de antagonista e patógeno e Controle negativo (C-) inoculado apenas com o patógeno

Fungos do gênero *Trichoderma* têm sido citados na literatura científica como promotores do crescimento vegetal, por diversos mecanismos a exemplo da solubilização de fosfato e outros minerais e disponibilização de nutrientes para as plantas, produzindo também substâncias com ação análoga a auxina (VINALE et al., 2008).

Com relação à massa fresca da raiz, o isolado TCS 10 também promoveu os melhores resultados, quando comparados com os demais tratamentos (Figura 4). O isolado TCS 78 promoveu resultados significativos com relação a massa seca da raiz, comparado aos demais isolados de *Trichoderma* spp. Entretanto, o resultado não diferiu significativamente quando comparado ao controle positivo (Figura 4), sugerindo que, apesar deste isolado ter proporcionado resultados positivos em termos de produção da parte aérea e raiz das plantas de bananeira, estas ainda apresentaram crescimento reduzido na presença do *F. oxysporum* f. sp. *cupense* na variedade de bananeira 'Prata Maravilha'.

Em estudos com isolados endofíticos de *Trichoderma* spp. TCL 1 em biocontrole ao *F. oxysporum* observou-se o aumento da massa da raiz e folhas de plantas de bananeira da variedade 'Gros Michel' (AAA) com variações de 109 a 148% quando comparados ao controle absoluto (HERNÁNDEZ et al. 2011).



**Figura 4.** Massa fresca e seca da raiz de mudas de bananeira após 75 dias de incubação os isolados de *Trichoderma* spp. , FOC (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense*). Controle positivo (C+) sem inoculação dos isolados de antagonista e patógeno e Controle negativo (C-) inoculado apenas o patógeno

Os tratamentos com os isolados TCS 10, TCS 29 e TCS 78, com relação a produção de massa seca e fresca da parte aérea e raiz, pode está relacionado as menores taxas de índice e severidade da doenças nas mudas de bananeira quando tratados com os mesmos isolados.

Apesar do destaque obtido pelos isolados TCS 10, TCS 29 e TCS 78, com relação à produção de massa seca e fresca da parte aérea e raiz, não houve diferença significativa entre os tratamentos, pelo teste de Modelos Lineares Generalizados com distribuição gama e função de ligação log. A distribuição das variáveis massa fresca e seca da parte aérea e da raiz, não foi normal conforme teste de Shapiro-Wilk ( $p < 0,05$ ).

## Conclusões

Os isolados de *Trichoderma* spp. não controlaram o Mal-do-Panamá em mudas de bananeira da variedade 'Prata Maravilha'. Entretanto, o isolado TCS10 promoveu uma redução na incidência da doença em dois intervalos de tempo de aplicação.

Não foi observado efeito significativo com relação à variação nos tempos de aplicação do antagonista (uma aplicação, a cada 7 e 15 dias) em solo infestado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense*. Entretanto, nota-se a diminuição da incidência e severidade do Mal-do-Panamá em mudas de bananeira na variedade 'Prata Maravilha'.

**Palavras-Chave:** Mal- do-Panamá, biocontrole, antagonismo, patógeno

## **Agradecimentos**

Agradecimentos à Universidade Federal do Recôncavo da Bahia pelo apoio concedido e espaço cedido para a realização dos experimentos. A Capes, CNPq e FAPESB pela concessão de bolsas de apoio a pesquisa.

## **Referências Bibliográficas**

ARRAS, G.; ARRU, S. Mechanism of action of some microbial antagonists against fungal pathogens. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**, Milan, v.47, p.97-120, 1997.

CIRULLI, M.; ALEXANDER, L.J. A comparison of pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* f. *licopersici* and different sources of resistance in tomato. **Phytopathology**, v.56, p.1301-1304, 1966.

CORDEIRO Z.J.M.; KIMATI, H. Doenças da bananeira. In: KIMATI H., AMORIM L., BERGAMIN FILHO A., CAMARGO L.E.A.; REZENDE J.A.M. Manual de Fitopatologia. Vol. 2. Doenças das plantas cultivadas. 3ª Ed. São Paulo SP. **Agronômica Ceres**. p. 112-136. 1995.

HARMAN, G. E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**. v.2, p.4356, 2004.

HERNÁNDEZ, A. J. C.; ENAMORADO, L. E. P.; CASANOVES, F.; AVELINO, J.; T.FERNÁNDEZ, A. C.; ORTIZ, J. L. Using Isolates Endophytic *Trichoderma* spp., for the Panamá Disease biocontrole (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) race 1 in *Gros Michel* (AAA) cropper of banana vitro-plants with greenhouse conditions. **RCASAE WORKING PAPER** . 2011. Disponível em: <http://ageconsearch.umn.edu/bitstream/116033/2/Control%20Biol%20B3gico%20de%20la%20enfermadad%20Mal%20de%20Panam%20A1.pdf>. Acesso em: 12/10/14.

KUPPER, K. C.; BELLOTTE, J. A. M.; GOES, A. Controle alternativo de *Colletotrichum acutatum* agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal , v. 31, n. 4, dez. 2009 . Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S010029452009000400013&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010029452009000400013&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em 25 jun. 2014.

LOPES E.B.; ALBUQUERQUE I.C. Doenças da Bananeira com ênfase a Sigatoka Negra. In: **Produção e Processamento de Frutas Tropicais na Agricultura Familiar**. João Pessoa PB. EMEPA. 2005.

PEREIRA, J. C. R.; PEREIRA, J. R.; CASTRO, M. E. A.; GASPAROTTO, L. Ocorrência do Mal-do-Panamá em Bananeira do Subgrupo Figo, em Piau, Minas Gerais. **Fitopatologia brasileira**. 30(5), set - out 2005.

PEREZ, L., BATLLE, A., CHACON, J., MONTENEGRO, V. Eficácia de *Trichoderma harzianum* A34 en el biocontrol de *Fusarium oxysporum* f. sp.  *cubense*, agente causal de la marchitez por *Fusarium* o Mal de Panama de los bananos en Cuba. **Fitosanidad** . 13 (4), 259-263. 2009. Disponível em: <http://www.redalyc.org/pdf/2091/209114853006.pdf>. Acesso em: 11/03/2015.

SAITO, L. R.; SALES, L. L. S. R.; MARTINCKOSKI, L.; ROYER, R.; DE RAMOS, M. S.; REFFATTI, T. Aspectos dos efeitos do fungo *Trichoderma* spp. no biocontrole de patógenos de culturas agrícolas. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia** v.2 n3 Set.-Dez.2009. Disponível em: <http://revistas.unicentro.br/index.php/repaa/article/viewFile/1515/1393>. Acesso em: 25 de junho de 2014.

SILVA, J.C. da; BETTIOL, W. Potential of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* isolates for control of *Fusarium* wilt of tomato. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.409-412, 2005.

VINALE F.; SIVASITHAMPARAM K.; GHISALBERTI E.L.; MARRA R.; WOO S.L.; LORITO M. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. **Soil Biology & Biochemistry** 40:1-10. (2008).



**ENRAIZAMENTO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth. (LAMIACEAE)**

## ENRAIZAMENTO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth. (LAMIACEAE)

Flávia Pereira de Sousa<sup>1</sup>, Jaqueline Pereira Almeida<sup>2</sup> e Lenaldo Muniz de Oliveira<sup>3</sup>.

Aluna do Curso de Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), flavia.sousa.ufba@gmail.com; Aluna do Curso de Ciências Biológicas, Bolsista PIBIC/FAPESB, (UEFS), jaquelinepereiraalmeida@gmail.com e Professor Orientador, Doutor em Fisiologia Vegetal, Curso de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, (UEFS), lenaldo.uefs@gmail.com.

### 1 INTRODUÇÃO

*Hyptis* Jacq. é um gênero que pertence à família Lamiaceae e inclui cerca de aproximadamente 400 espécies de hábitos bastante variados desde ervas, subarbustos, arbustos e até mesmo árvores de pequeno porte, ocorrentes desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina (FALCÃO; MENEZES, 2003). Estima-se que no Brasil ocorram 118 espécies, dentre elas 78 endêmicas, sendo distribuídas em todas as regiões brasileiras e adaptando-se as mais variadas condições edafoclimáticas (HARLEY et al., 2015). Entre as espécies nativas do Brasil têm-se *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth. uma planta de hábito arbustivo, cuja ocorrência é registrada nos estados da Bahia, Espírito Santo e Minas Gerais (HARLEY et al., 2015), é encontrada principalmente nas margens de rios ou locais sujeitos a alagamentos.

A importância de *Hyptis* abrange tanto a área química como a farmacológica. Do ponto de vista químico, através da produção de um grande número de classes de micromoléculas, existindo representantes da via do ácido acético, da via do ácido chiquímico e oriundos de biossíntese mista (FALCÃO; MENEZES, 2003). Ainda tem ampla utilização na indústria alimentícia, pois são comercializadas para o uso como importantes condimentos na culinária de diversas regiões, sendo apreciadas pelo aroma e sabor que atribuem aos alimentos. Contudo, sua maior importância advém de seu elevado teor de óleos essenciais aromáticos, com propriedades terapêuticas comprovadas, sendo compostos basicamente por monoterpenos e sesquiterpenos (FALCÃO; MENEZES, 2003). Além dos óleos essenciais, o gênero produz também diterpenos, triterpenos, lignanas e pironas (PEREDA-MIRANDA et al., 1990).

A utilização das espécies de *Hyptis* para fins medicinais não se restringe apenas ao Brasil, mas também é realizada por diferentes países e a maioria desses usos medicinais tem encontrado respaldo na literatura científica, uma vez que essas espécies são compostas por substâncias com potencial farmacológico muito interessante com atividade antimicrobiana, antinociceptiva, antidematogênica, antisséptica, anticancerígena, antifúngica, citotóxica, antiinflamatória, anti-HIV e inseticida (FALCÃO; MENEZES, 2003).

Diante do valor medicinal do gênero, torna-se imprescindível o estudo de formas de propagação comercial para suas espécies. Apesar das mesmas se propagarem naturalmente, por meio da via sexuada, a propagação por sementes tem sido pouco utilizada, em virtude da sazonalidade da produção, tamanho reduzido das suas sementes, perda rápida da viabilidade das sementes produzidas, além de problemas relacionados à dormência (MAIA et al., 2008). Ainda, quando o

intuito é a propagação de genótipos selecionados, a variabilidade genética decorrente da multiplicação via sementes pode afetar a utilização desta espécie para fins farmacêuticos, em decorrência da variação na composição química dos metabólitos extraídos (OLIVEIRA et al., 2008).

Nesse contexto, a cultura de tecidos representa uma importante ferramenta para a multiplicação e conservação de espécies medicinais nativas. A cultura de tecidos vegetais é um conjunto de técnicas que apresenta grande aplicabilidade em sistemas vegetais. Consiste basicamente em cultivar em ambiente asséptico, com temperatura e iluminação controlada, qualquer parte da planta, em frascos de vidro específicos contendo meio nutritivo adequado, o que proporciona à produção em larga escala de plantas inteiras idênticas a planta mãe (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Dentre as técnicas da cultura de tecidos tem-se a micropropagação que possibilita a multiplicação rápida de genótipos selecionados, mantendo a identidade genética dos mesmos, e já vem sendo utilizada para a multiplicação de várias espécies de *Hyptis*, como: *H. pectinata* (L.) Poit. (FEITOSA, 2012), *H. marruboides* Epl. (BOTREL, 2013), *H. leucocephala* Mart. ex Benth (NEPOMUCENO, 2012) e *H. suaveolens* (L.) Poit. (MANDAL, 2013).

Para Murashige (1974), o sistema de micropropagação de plantas pode ser dividido em três etapas sucessivas. A primeira consiste na seleção do explante, sua desinfestação e a seleção do meio de cultura e das condições de cultivo a serem empregadas. Posteriormente, é realizada a indução de brotos a partir dos explantes através de estímulos específicos e subcultivos sucessivos (multiplicação). Finalmente, é feita a indução da formação de raízes (enraizamento) e a transferência das microplantas *in vitro* para o ambiente *ex vitro* (aclimatização). Entretanto, a iniciação e o sucesso de um protocolo de micropropagação dependem do genótipo, da fonte de explantes e das condições de cultivo (CALDAS et al., 1998).

Dependendo da fonte de explante escolhida para dar início aos cultivos, a regeneração das microplantas *in vitro* ocorre por dois processos: organogênese e embriogênese somática (PASQUAL et al., 1997). A organogênese consiste na formação de estruturas a partir de células e/ou tecidos, e pode ocorrer sob duas vias: via direta, através da regeneração de microplantas oriundas de tecidos meristemáticos, sem passar pelo estágio intermediário de calo, apresentando alta fidelidade genética; ou por via indireta, quando o processo de regeneração de gemas é precedido pela formação de um estágio intermediário de calo (massa amorfa de células não organizadas, formada pela intensa divisão das células do explante), a partir do qual surgem gemas adventícias que crescem e se desenvolvem em novas partes aéreas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1988).

A embriogênese somática consiste no desenvolvimento de embriões a partir de células somáticas embriologicamente competentes *in vitro* e, como a organogênese, também pode ocorrer de forma direta ou indireta (AHUJA, 1992). A embriogênese somática indireta tem sido preconizada como a forma mais adequada para a multiplicação *in vitro*, pois possibilita elevada taxa de multiplicação. Contudo, a obtenção de calos friáveis, fase inicial de obtenção dos embriões somáticos, é uma etapa crucial a ser ajustada (LANDA et al., 2000).

Independentemente da via morfogênica utilizada, as condições de cultivo, em especial a composição do meio de cultura, são decisivos para o sucesso da regeneração *in vitro*. O meio de cultura é composto por sais minerais, fonte de carbono, vitaminas e reguladores vegetais, que são essenciais para a manutenção da divisão celular e proliferação dos explantes (KERBAUY, 1997). Os reguladores

vegetais são considerados os principais controladores da morfogênese *in vitro*, atuando como mensageiros químicos capazes de promover, modificar e inibir quantitativamente o crescimento, além de ser capaz de alterar a produtividade e metabolismo secundário, afetando até mesmo o teor de óleos essenciais (SHUKLA; FAROOQI, 1990; MOURA et al., 2001). As classes de reguladores mais usadas em cultura de tecidos são as auxinas e as citocininas (SKOOG; MILLER, 1957).

As auxinas são frequentemente utilizadas para induzir a formação de calos e de raízes adventícias, sendo o ácido indol-3-acético (IAA), ácido indol-3-butírico (IBA), ácido  $\alpha$ -naftalenoacético (NAA) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D) os mais utilizados no cultivo *in vitro* (CARVALHO, 1999). Já as citocininas induzem a divisão celular e, quando em elevadas concentrações, estimulam a formação de brotos adventícios e inibem a formação de raízes; as mais frequentes são: kinetina (KIN), zeatina (ZEA) (citocinina natural), 6- benzilaminopurina (BAP) e isopentenil adenina (2ip) (CARVALHO, 1999). A disponibilidade e a interação dessas duas classes de reguladores vegetais regulam a formação de raiz, broto e calo em cultura de tecidos (SKOOG; MILLER, 1957).

O carvão ativado é outra substância geralmente acrescida ao meio de cultura, com a finalidade de melhorar o crescimento e desenvolvimento celular nas distintas etapas do cultivo *in vitro* (VIEITEZ et al., 2009). O efeito favorável do carvão se deve, em parte, a sua capacidade de adsorção. Desse modo, ele altera a composição e o pH do meio de cultura, podendo melhorar ou regular o crescimento *in vitro* (THOMAS, 2008). Além disso, o carvão proporciona uma condição de escuro favorável ao desenvolvimento das raízes adventícias, simulando as condições do solo (MOSHKOV et al., 2008).

Assim, a composição do meio de cultura aliada às demais condições de cultivo, tais como luz, temperatura e recipiente de cultivo são a base da tecnologia da cultura de tecidos vegetais (KERBAUY, 1997). Dessa forma, o domínio dos componentes do meio de cultura associado às condições de cultivo permitem o estabelecimento de protocolos que visem à otimização da produção de plantas em larga escala (KERBAUY, 1997),

O uso da técnica de micropropagação, além da produção de grande quantidade de plantas em curto período de tempo, permite a obtenção de plantas livres de doenças e a propagação de espécies difíceis de serem multiplicadas por outros métodos. Outra vantagem do ponto de vista prático da micropropagação está relacionada à restauração da competência de enraizamento, resultado do rejuvenescimento obtido pelos sucessivos subcultivos e pelo uso de reguladores de crescimento (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Além da combinação de reguladores, a transferência das microplantas para o ambiente *ex vitro* apresenta várias limitações, sendo, na maioria das vezes, necessária uma etapa de rustificação, onde as microplantas desenvolvem características adaptativas ao ambiente *ex vitro*, estimulando-se o desenvolvimento da fotoautotrofia, através da redução de sacarose no meio de cultura e/ou do aumento da aeração dos recipientes, através do uso de tamponamentos alternativos, originando microplantas com características anátomo-fisiológicas mais adaptadas à aclimatização (THORPE et al., 2008).

Dessa forma, considerando a importância do gênero *Hyptis* e a ausência de estudos para a espécie *Hyptis ramosa*, o objetivo do presente estudo foi estabelecer um protocolo de enraizamento *in vitro* e aclimatização para a espécie.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Local de realização dos experimentos**

Os ensaios fisiológicos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais localizados na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

### **2.2 Enraizamento *in vitro* de brotos de *Hyptis ramosa***

Para a indução de raízes foram utilizadas brotações de *H. ramosa* provenientes do meio de cultura suplementado com oito  $\mu\text{M}$  de BAP. Os brotos foram individualizados e transferidos para tubos de ensaio contendo 10mL de meio de cultura MS/2, suplementado com diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB) (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 $\mu\text{M}$ ), na presença (1,0 g. L<sup>-1</sup>) e ausência de carvão ativado. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 2 (quatro concentrações da auxina AIB x duas concentrações de carvão ativado), totalizando oito tratamentos. Cada tratamento foi constituído de cinco repetições, sendo cada repetição composta por quatro tubos contendo um broto cada. Ao final de 45 dias foi quantificado as seguintes variáveis; porcentagem de brotos enraizados, comprimento da maior raiz e porcentagem de sobrevivência dos brotos.

### **2.3 Aclimatização das microplantas de *Hyptis ramosa***

Para rustificação das microplantas após a etapa de enraizamento, as microplantas foram mantidas em tubos de ensaio contendo 15mL do meio de cultura MS/2, com diferentes condições de vedação (filme de PVC e tampão de algodão) durante 45 dias, sendo, posteriormente, transferidas para tubetes plásticos (13cm de altura x 3cm de diâmetro) contendo o substrato comercial Plantmax®. Após o plantio as microplantas foram cobertas com copos plásticos transparentes (200 mL) e mantidas em casa-de-vegetação com nebulização intermitente (nebulizações de 5 minutos com intervalos de 1 hora). Após 15 dias nessas condições os copos foram retirados, mantendo-se as microplantas por mais 15 dias no ambiente sob nebulização. Após 30 dias foi avaliada a taxa de sobrevivência das microplantas em condições *ex vitro*.

### **2.4 Análise estatística**

Os dados foram avaliados estatisticamente, mediante análise de variância, comparando-se as médias pelo Teste de *Tukey* a 5% de probabilidade de erro para os fatores qualitativos. Para os fatores quantitativos utilizou-se ajustes de equações de regressão polinomial. Os dados foram analisados com auxílio do programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

### **2.5 Resultados e discussão**

Os resultados obtidos para os parâmetros de enraizamento demonstraram interação dupla (concentração de AIB e concentração de carvão ativado) altamente significativa ( $p < 0,01$ ) para as variáveis comprimento da maior raiz e porcentagem de sobrevivência dos brotos. Para a porcentagem de enraizamento não houve interação significativa, sendo influenciada de modo significativo apenas pelo carvão ativado ( $p > 0,01$ ). Contudo, para porcentagem de enraizamento dos brotos não foi possível o

ajuste de um modelo matemático significativo para a variável em análise, tanto na presença quanto na ausência de carvão ativado (TABELA 1).

**TABELA 1:** Porcentagem de enraizamento de brotos de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth em diferentes concentrações de AIB (0,0; 1,0; 2,0; e 3,0 $\mu$ M) e carvão ativado (CA) (0,0 e 1,0 g L<sup>-1</sup>) em meio de cultura MS/2 aos 45 dias de inoculação. UEFS. Feira de Santana, BA, 2015.

Concentração AIB ( $\mu$ M)	Carvão ativado (g L <sup>-1</sup> )	
	0,0	1,0
0,0	95a	95a
1,0	90a	90a
2,0	95a	90a
3,0	100a	65b

\*Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de *Tukey*.

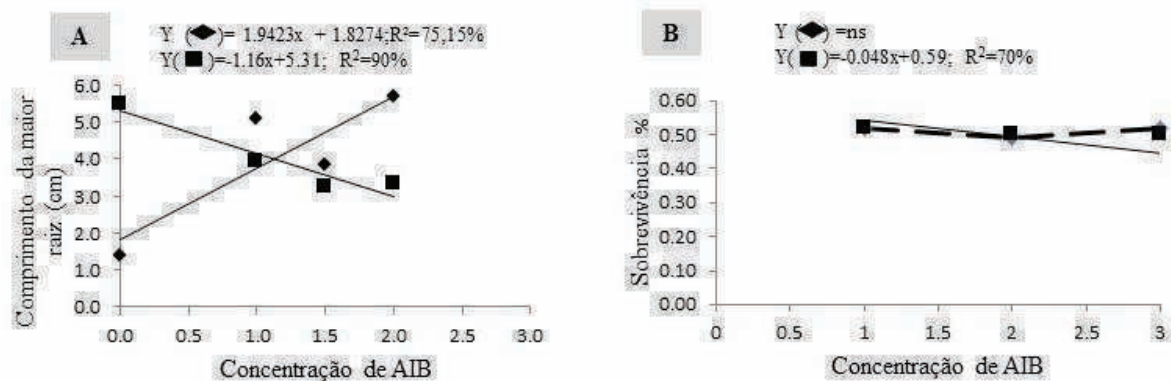
A taxa de enraizamento dos brotos de *H. ramosa* variou de 90 a 100% nos tratamentos testados (TABELA 1), independente da suplementação do meio de cultura com o carvão ativado. Entretanto, a adição do carvão ativado ao meio de cultura resultou em uma menor taxa de enraizamento quando o meio de cultura foi suplementado com 3.0 $\mu$ M de AIB (65%). As porcentagens de enraizamento encontradas para *H. ramosa* foram superiores a observada para *Prunus salicina* Lindl (43,3%) (CANLI; TIAN, 2009). Verificou-se a formação de raízes em todas as microplantas cultivadas em meio sem a adição de auxinas, sendo observadas taxas acima de 90% independente da adição de carvão ativado (TABELA 1). Esse resultado corrobora com o reportado por Iapichino e Airò (2008), para culturas de *Metrosideros excelsa* Sol. ex Gaertn, onde também observaram a formação de raízes em meio isento de regulador vegetal (33%).

Para o comprimento da maior raiz observou-se uma resposta linear ( $p < 0,01$ ) crescente para os efeitos das concentrações de AIB utilizadas, na ausência de carvão ativado. Já na presença de carvão ativado obteve-se um modelo linear ( $p < 0,05$ ) decrescente para o efeito das concentrações de AIB utilizadas (FIGURA 6A). O AIB tem sido o fitoregulador mais utilizado dentre as auxinas sintéticas para a indução da rizogênese *in vitro* de espécies vegetais (MELO et al., 2001) em decorrência da sua elevada estabilidade em relação a outros fitoreguladores, a exemplo do AIA (ASSIS; TEIXIERA, 1998; SOUZA; PEREIRA, 2007). Contudo, as respostas na rizogênese variam de acordo com a espécie estudada (ASSIS; TEIXIERA, 1998). A utilização do AIB mostrou-se benéfica para o comprimento das raízes de macieira (*Malus domestica* Borkh), sendo que na concentração de 1  $\mu$ M o AIB promoveu resultados superiores aos obtidos com ANA e AIA, produzindo raízes com comprimento médio de 23 mm (SCHUCH; PETERS, 2002). Resultados contrários aos obtidos neste experimento foram observados para *Bauhinia cheilanta* (Bong.) Steud (GUTIERREZ, 2012) e *Lavandula angustifolia* Miller (MACHADO et al., 2013), em que a utilização de maiores concentrações de AIB resultaram em um menor comprimento de raízes.

Os resultados obtidos para a taxa de sobrevivência dos brotos durante a fase de enraizamento de *H. ramosa* mostraram um comportamento linear ( $p < 0,01$ ) decrescente para o efeito das concentrações de AIB utilizadas, na presença de



carvão ativado, enquanto que, na ausência do carvão ativado não se obteve um modelo matemático representativo (Figura 6B). Resultados observados por Vieitez et al. (2009) mostraram que a taxa de sobrevivência dos brotos de *Quercus* spp. foi maior com a adição de carvão ativado ao meio de enraizamento. Entretanto, os resultados observados para *H. ramosa* foi superior ao reportado por Sudha et al. (2005), no qual taxas de sobrevivência dos brotos de *Decalepis arayalpathra* J. Joseph & V. Chandras não superaram 28%, independente da concentração de AIB adicionada ao meio de cultura na ausência de carvão ativado. Os resultados obtidos demonstram que a adição do carvão ativado ao meio de cultura não foi eficiente para melhorar a etapa de enraizamento de *H. ramosa*, provavelmente em função da capacidade do carvão ativado de modificar o pH e a composição do meio de cultura, devido ao seu poder de adsorção de cátions, nutrientes e reguladores vegetais, que são fundamentais para o enraizamento dos brotos, conforme sugerido por Gutiérrez (2010).



**FIGURA 1:** Comprimento da maior raiz (A) e porcentagem de sobrevivência de brotos (B) de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth, cultivada em meio de cultura MS/2 suplementado com diferentes concentrações de AIB (0,0; 1,0; 2,0; e 3,0 μM) e carvão ativado (CA) (0,0 e 1,0 g L<sup>-1</sup>) (Com CA ◆ e sem CA ■) UEFS, Feira de Santana, BA, 2015.

Durante a fase de aclimatização de *H. ramosa* não se detectou efeito da fase de pré-aclimatização, com uso de tamponamento de PVC ou algodão, sobre o percentual de sobrevivência das plantas (dados não mostrados) Em todos os tratamentos testados as taxas de sobrevivência durante a fase de aclimatização foi de 100% (dados não mostrados). Esses resultados são muito promissores, pois a baixa taxa de sobrevivência de plantas quando transferidas do meio de cultura para o ambiente *ex vitro* é um dos maiores limitantes à produção comercial das microplantas (DONNELLY; VIDAVER, 1984).

#### 4 CONCLUSÕES

O enraizamento *in vitro* ocorre mesmo na ausência de auxinas no meio de cultura. A espécie apresenta grande resistência à etapa de aclimatização, com sobrevivência de 100%, independentemente da realização da fase pré-aclimatização.

## REFERÊNCIAS

- AHUJA, M. R. Micropropagation of woody plants. London: Kluwer Academic Publishers, 1992. v. 41, 507 p.
- ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C. CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Orgs.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa, 1998. p. 261-296.
- BOTREL, P.P. Micropropagação, Teor e Composição Química Volátil de *Hyptis marrubioides* Epl. e Atividade Inseticida. 2013. 119f. Tese (Doutorado em Agronomia/ Fitotecnia) Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2013.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: SPI/Embrapa-CNPH, v.1, 1998. p.87-132.
- CANLI, F. A.; TIAN, L. Regeneration of adventitious shoots from mature stored cotyledons of Japanese plum (*Prunus salicina* Lind.). **Scientia Horticulturae**, v. 120, p. 64–69, 2009.
- CARVALHO, J.M.F.C. de. **Técnicas de micropropagação**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 1999. 39p. (Embrapa Algodão. Documentos, 64).
- FALCÃO, D. Q.; MENEZES, F. S. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.84, n.3, p.69-74, 2003.
- FEITOSA, R.B. et al.. Propagação in vitro de *Hyptis pectinata*. Ciclo de palestras sobre cultivo in vitro de plantas. In: Ciclo de palestras da Embrapa, 3. **Anais eletrônicos...** Sergipe: Embrapa. Disponível em< [http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes\\_2012/III\\_ciclo\\_de\\_palestras\\_final.pdf](http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2012/III_ciclo_de_palestras_final.pdf)>. Acesso em: 17 abr. 2012.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**. v.35, n.6, p. 1039-1042, 2011.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. 1998. Micropropagacao. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Orgs.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH. p.:183-260.
- GUTIÉRREZ, I.E.M. **Micropropagação de *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud. (Fabaceae).2010.85f**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2010.
- GUTIÉRREZ, I.E.M. Regeneração *in vitro* via organogênese direta de *Bauhinia cheilantha*. **Ciência Rural**, v. 41,p. 260–265, 2012.
- HARLEY, R. et al. Lamiaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB142>>. Acesso em: 19 Fev. 2015.

IAPICHINO, G.; AIRÒ, M. Micropropagation of *Metrosideros excelsa*. In **Vitro Cellular and Developmental Biology**. *Plant*, Wallingford, UK, v. 44, p. 330-337, 2008.

KERBAUY, G.B. Clonagem de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 1, n. 1, p. 30-33, 1997.

LANDA, F.S.L. et al. Crescimento inicial de mudas de Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequizeiro “mentrasto forma florífera”. **Ciência Agrônômica**, v. 34, n.1, 2000.

MACHADO, P.M. et al. Propagação *in vitro* e caracterização química do óleo essencial de *Lavandula angustifolia* cultivada no Sul do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria v.43, n.2,p.283-289, 2013.

MAIA, S.S.S. et al. Germinação de sementes de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae) em função da luz e da temperatura. **Caatinga**, v.21, n.4, p.212-8, 2008.

MANDAL, J. In Vitro Flowering and Micropropagation of *Hyptis suaveolens* (Linn.) Poit.—An Important Medicinal Herb. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants** v. 19, n 3, p. 233-247, 2013.

MELO, B. et al. Efeitos de ANA e AIB *in vitro* e crescimento de parte aérea de Guarirubeira (*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc). **Bioscience Journal.**, v.17, n.1,p.49-59,2001.

MOSHKOV, I. E. et al. Plant Growth Regulators III: Gibberellins, Ethylene, Abscisic Acid, their Analogues and Inhibitors; Miscellaneous Compounds. In: GEORGE, E. F. et al. (Ed.), *Plant Propagation by Tissue Culture*, v. 1, 3.ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 277-282.

MOURA, T.L.; ALMEIDA, W.A.B; MENDES, B.M.J.; MOURÃO FILHO, F.A.A. Organogênese *in vitro* de *Citrus* em função de concentrações de BAP e seccionamento do explante. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.2, p.240-245, 2001.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. *Annals. Revista. Plant Physiology* v.25, p.135-166, 1974.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. v.15, p.493-497, 1969.

NEPOMUCENO, C. **Propagação e Conservação *in vitro* de *Martianthus leucocephalus* (MART. Ex BENTH.) J.F.B. PASTORE**. 2012.180f. Tese (Doutorado em Botânica). Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, 2012.

OLIVEIRA, C. M. A. et al. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Hyptis ovalifolia* Benth. (Lamiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 5, p. 756-759, 2008.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicação**. Lavras: UFLA, 1997. 159p.

PEREDA-MIRANDA, R.; DELGADO, G. Chemical studies on Mexican *Hyptis* species. Part 2. Triterpenoids and flavonoids from *Hyptis albida*. **Journal of Natural Products**, v. 53, n.182-185, 1990.

SHUKLA A, FAROOQI. AHAE. Review article: Utilization of plant growth regulators in aromatic plant production. **Current Research Medicinal & Aromatic Plants**, v. 12, n. 3, p. 152-7, 1990.

SKOOG, F; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. Symp. Soc. Exp. Biol. 11, 118–131, 1957.

SOUZA, A. V.; PEREIRA, A. M. S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista de Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, SP, v. 9, n. 4, p. 103-117, 2007.

SUDHA, C. G. et al. *In vitro* propagation of *Decalepis arayalpathra*, a critically endangered ethnomedicinal plant. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Wallingford, UK, v. 41, n. 5, p. 648-654, set. 2005.

THOMAS, T. D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 618-631, 2008.

THORPE, T. et al. The Components of Plant Tissue Culture Media II: Organic Additions, Osmotic and pH Effects, and Support Systems. In: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G-J. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Dordrecht: Springer, 3rd Edition. p.:205-226, 2008.

VIEITEZ, A. M. et al. *In vitro* regeneration of the important North American oak species *Quercus alba*, *Quercus bicolor* and *Quercus rubra*. **Plant Cell Tiss Organ Culture**, v. 98, p. 135–145, 2009.

**EXTRATO AQUOSO DE SISAL NO CONTROLE DE *Meloidogyne javanica* NO TOMATEIRO**

## EXTRATO AQUOSO DE SISAL NO CONTROLE DE *MELOIDOGYNE JAVANICA* NO TOMATEIRO

Pesquisa Institucional desenvolvida no Centro de Ensino de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, pertencente ao Grupo de Pesquisa Biotecnologia Microbiana Aplicada à Agricultura; parte da Tese de Doutorado do primeiro autor.

Josilda Cavalcante Amorim Damasceno<sup>1</sup>; Ana Cristina Fermino Soares<sup>2</sup>; Fábio Nascimento de Jesus<sup>3</sup>; Rosane da Silva Sant'Ana<sup>4</sup>; Thiago Braúlio do Carmo<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Doutora em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, bolsista PNPd/CAPES, E-mail: josildadamasceno@gmail.com; <sup>2</sup> Doutora em Produção Vegetal, Professora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, do Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas da UFRB, Orientadora, ferminosoares@gmail.com; <sup>3</sup>Aluno do Curso de Doutorado em Ciências Agrárias, UFRB, bolsista CAPES, fabiorock222@yahoo.com.br.; <sup>4</sup> Aluno do Curso de Mestrado em Ciências Agrárias, UFRB, bolsista CAPES, rosa\_silvas@hotmail.com; <sup>5</sup> Aluno do Curso de Graduação em Biologia, UFRB, bamor@hotmail.com

### Introdução

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*), originário da região Andina e pertencente à família Solanaceae, é uma hortaliça cosmopolita, conhecida e consumida em todo o mundo, devido sua multiplicidade na alimentação humana e ativa participação na cadeia comercial (ALVARENGA, 2004). Entretanto, diversos problemas fitossanitários afetam esta cultura, dentre esses, os nematoides apresentam considerável importância.

Nematoides pertencentes ao gênero *Meloidogyne* Goeldi (1887) são os mais importantes nematoides fitopatogênicos, pois, apresentam ampla distribuição geográfica e causam consideráveis prejuízos econômicos a uma ampla gama de culturas em todo o mundo (REGAIEG et al., 2010). Os nematicidas para o controle do nematoides-das-galhas são altamente tóxicos e de longo efeito residual. O uso destes produtos onera o custo de produção e contamina o meio ambiente.

Um composto orgânico que pode ser utilizado como controle alternativo de nematoses é o resíduo do desfibramento das folhas de sisal. *Agave sisalana* Perrine ex. Engelm, popularmente conhecida como sisal, pertencente à família Agavaceae, compreende mais de 650 espécies distribuídas nas regiões áridas de clima tropical do mundo (ABDEL-GAWAD et al., 1999).

O principal produto da exploração do sisal é sua fibra e esta, naturalmente resistente e de fácil industrialização, tem sido procurada por muitos investidores e tem ocupado lugar de destaque na cadeia de produção. O Brasil é, atualmente, o maior produtor e exportador de fibras e manufaturados de sisal e o cultivo ocorre em 112 municípios do Nordeste, sendo a Bahia o maior produtor nacional dessa fibra, concentrando 95% da produção sisaleira do País (SECTI, 2014).



A fibra de sisal representa somente 4% da folha e os resíduos sólidos e aquosos constituem os restantes 96% (SUINAGA et al., 2006), que são abandonados nas propriedades rurais, sem qualquer aproveitamento. Estes, no entanto, poderiam ser utilizados como matéria-prima abundante e de baixo custo para fins agrícolas e industriais.

O resíduo líquido de sisal, tem como principais constituintes do metabolismo secundário: alcaloides, compostos fenólicos, glicosídeos, cumarinas, saponinas, flavonoides e taninos (BARRETO, 2010). As saponinas desempenham um papel importante na defesa contra insetos e micro-organismos (AGRELL et al., 2003), bem como interagem com as proteínas da cutícula do nematoide promovendo efeito nematicida (ARGENTIERE et al., 2008).

Resultados promissores tem sido relatados com o resíduo líquido do sisal no controle do ácaro rajado e da lagarta-do-cartucho (POTENZA et al., 2006; SOUZA, 2009), no nematoides em caprinos (DOMINGUES et al., 2010; BOTURA et al., 2011). O aumento nas concentrações de resíduo de *A. americana* inibiu a germinação de conídios de *Alternaria brassicae* (GULERIA e KUMAR, 2009).

Significativa redução do número de galhas e massas de ovos em raízes de tomateiro inoculados com *M. javanica* e tratados com o resíduo líquido fresco e fermentado de sisal foi observada por DAMASCENO et al., (2015). O resíduo líquido fresco de sisal reduziu o número de galhas e massas de ovos de alface inoculadas com *M. javanica* (SOARES e DAMASCENO, 2011).

Santos et al. (2012) utilizaram o resíduo líquido de sisal a 20%, 40%, 60%, 80% e 100% no controle do nematoide da casca preta do inhame (*Scutellonema bradys*) sob condições *in vitro*. Observaram que o resíduo líquido de sisal apresentou efeito nematicida nas concentrações a partir de 20%.

Este trabalho teve o objetivo de avaliar a eficiência do extrato aquoso de sisal na mortalidade de indivíduos de *M. javanica* sob condições *in vitro* e no controle desse nematoide em tomateiro.

## **Material e métodos**

### **Obtenção de ovos e juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica***

Os ovos dos nematoides foram extraídos de raízes de tomateiro, mantidas em casa de vegetação, pelo método de Hussey & Barker (1973), modificado por Boneti & Ferraz (1981). A suspensão de ovos/juvenis foi calibrada em câmara de contagem (lâmina de Peters) com o auxílio de microscópio estereoscópio.

### **Obtenção do pó proveniente do resíduo sólido de sisal**

O resíduo sólido de sisal foi coletado no campo, no momento do desfibramento das folhas, colocado em sacos de plástico e transportado para o Laboratório de Microbiologia Agrícola da UFRB, onde o material foi colocado para secar em estufa de ventilação forçada a 65°C até a obtenção de massa constante e, em seguida, foi triturado em Micro Moinho.

### **Obtenção do extrato aquoso de sisal**

Na obtenção do extrato aquoso proveniente do resíduo sólido, foram medidos 10 g do material triturado e adicionados 10 mL de água destilada. A suspensão permaneceu em repouso por 24 horas em frascos de Erlenmeyer envolvidos em papel alumínio e mantidos à temperatura ambiente. Após este período, o material foi macerado em almofariz e centrifugado por 2 minutos a 1800 rpm. O sobrenadante foi recolhido em Becker para utilização nos ensaios e o pellet foi descartado.

### **Extrato aquoso de sisal proveniente do resíduo sólido seco no controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiro**

Em casa-de-vegetação, mudas de tomateiro grupo Santa Cruz Kada cultivadas em bandeja contendo o substrato Vivatto Slim<sup>®</sup>, foram transplantadas com 20 dias de idade para vasos contendo 2 L de solo misturado com areia na proporção de 1:1(v/v), esterilizado em autoclave a 120°C por 1 hora e 30 minutos por duas vezes, em dias alternados.

Aos sete dias após o transplante, realizou-se a inoculação com 4000 indivíduos de *M. javanica*. Dois dias após a inoculação, procedeu-se a aplicação de 100 mL do extrato aquoso obtido do resíduo sólido seco e moído e duas aplicações posteriores foram realizadas a cada dez dias, após a data de aplicação da primeira. O ensaio foi instalado em blocos inteiramente ao acaso, com sete tratamentos e 15 repetições.

Foram testadas as seguintes concentrações do extrato aquoso de sisal: 0%, 10%, 20%, 30% e 40%, além de dois tratamentos testemunha (água destilada e o nematicida Carbofuran (Furadan 350 SC) na dose de 0,5 g por vaso. A parcela experimental foi constituída por um vaso contendo uma muda de tomateiro. Aos quarenta dias após inoculação, procedeu-se a coleta do tomateiro, avaliando-se a massa da matéria seca da parte aérea e das raízes.

Para a contagem dos números de galhas e de massas de ovos, o sistema radicular foi lavado em água corrente e corado de vermelho, por imersão durante 15 minutos em solução a 1% do corante artificial de ponceau 4R e vermelho 40 e, posteriormente, deixado em água por 10 minutos à temperatura ambiente ( $28 \pm 2$  °C). O excesso de água foi removido, colocando-se as raízes sobre papel toalha por 15 minutos, seguido da contagem dos números de galhas e de massas de ovos.

Os dados foram submetidos às análises de variância e de regressão em função das concentrações do extrato. Fez-se, também, a análise de contrastes ortogonais comparando as concentrações do extrato e o nematicida. Para estas análises, foi utilizado o programa estatístico SISVAR.

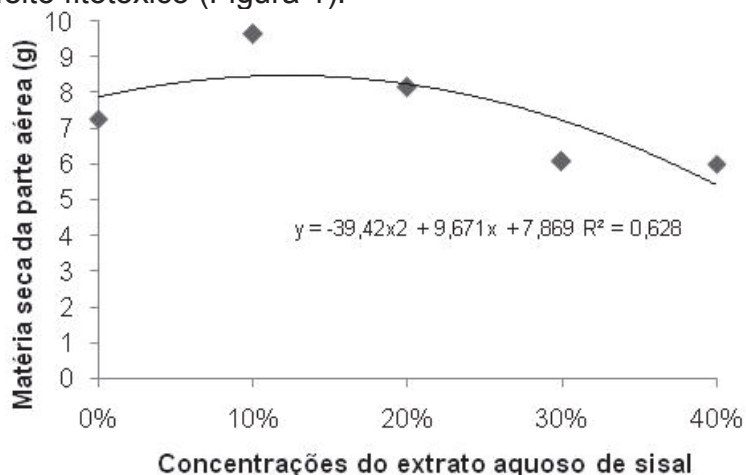
### **Resultados e discussão**

#### **Extrato aquoso de sisal proveniente do resíduo sólido seco no controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiro**

A concentração do extrato aquoso influenciou a produção de matéria seca da parte aérea e das raízes do tomateiro, com diferenças significativas entre os tratamentos (Figuras 1 e 2).

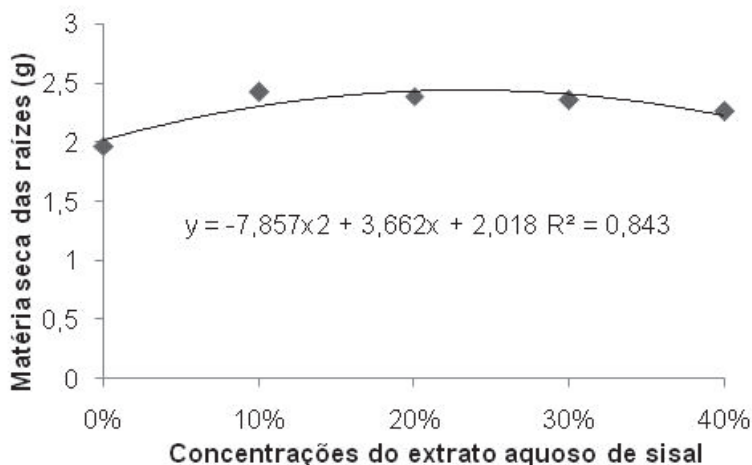
A maior quantidade de matéria seca da parte aérea foi obtida no tratamento com

10% do extrato aquoso, com incrementos de 33% em relação ao tratamento controle (0%). O aumento na concentração do extrato aquoso causou redução na massa da matéria seca da parte aérea, conforme verificado no modelo quadrático da regressão. Nas concentrações de 30% e 40%, essa redução foi de 48%, indicando que houve efeito fitotóxico (Figura 1).



**Figura 1.** Massa da matéria seca da parte aérea de tomateiros tratados com extrato aquoso de sisal.

A massa da matéria seca das raízes das plantas tratadas com o extrato aquoso foi superior ao tratamento controle (0%), em todas as concentrações, com incrementos de até 23% (Figura 2).



**Figura 2.** Massa da matéria seca das raízes de tomateiros tratados com extrato aquoso de sisal.

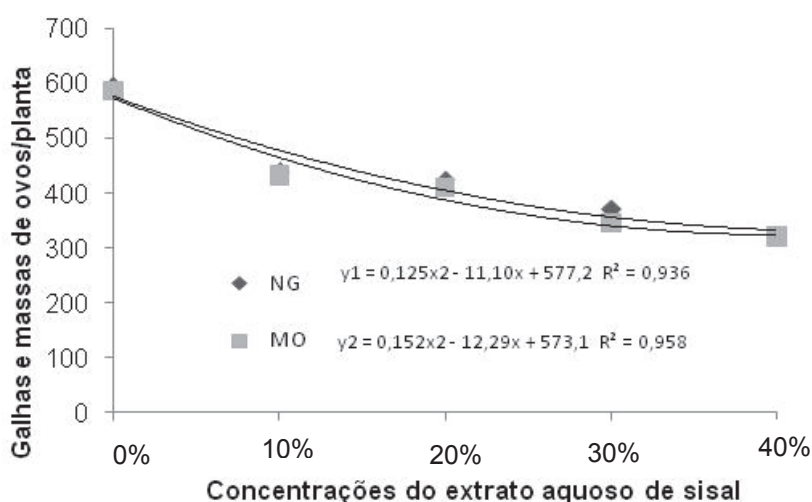
A avaliação dos contrastes ortogonais, não apresentou diferença significativa entre os resultados obtidos com o extrato aquoso de sisal e com o nematicida, em todas as concentrações para a massa da matéria seca das raízes dos tomateiros. Para a massa da matéria seca da parte aérea, exceto o extrato na concentração a 10%, as demais diferiram estatisticamente do tratamento com o nematicida. As plantas submetidas aos tratamentos com o extrato nas concentrações a 30% e a 40% apresentaram biomassa da parte aérea inferior ao tratamento com o nematicida (Tabela 1), indicando efeito fitotóxico do extrato ao tomateiro.

**Tabela 1.** Estimativas dos contrastes (nematicida x concentrações do extrato aquoso) e significância para as variáveis massas das matérias secas da parte aérea (MMSPA) e das raízes (MMSR), avaliados no controle de *Meloidogyne javanica* no tomateiro.

CONTRASTES	MMSPA(g)	MMSR(g)
10% X Nematicida	1.195 <sup>ns</sup>	0.011 <sup>ns</sup>
20% X Nematicida	-2.674 <sup>**</sup>	-0.037 <sup>ns</sup>
30% X Nematicida	-4.771 <sup>**</sup>	0.051 <sup>ns</sup>
40% X Nematicida	-4.841 <sup>**</sup>	0.245 <sup>ns</sup>

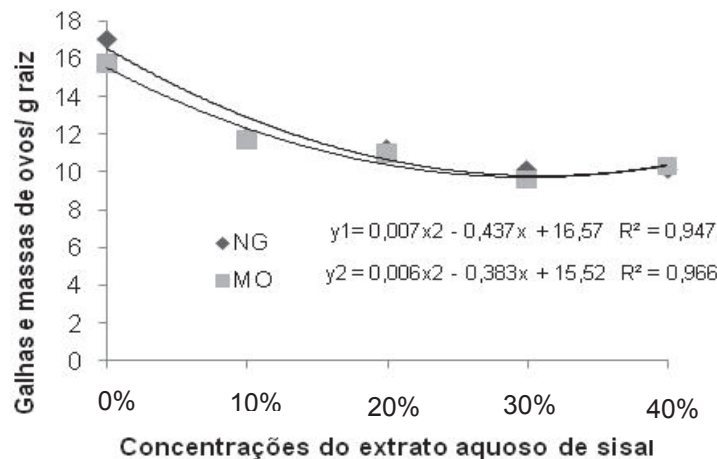
\*\* - significativo a 1% ns- não significativo a 5%.

O extrato aquoso do sisal, em todas as concentrações, causou significativa redução no número de galhas e massas de ovos por planta, com valores variando de 26% até 46% e de 26% até 45%, respectivamente, quando comparados com o tratamento sem extrato (Figura 3).



**Figura 3.** Número de galhas por planta (NG) e de massas de ovos (MO) por planta de tomateiros tratados com extrato aquoso de sisal.

A redução de galhas e massas de ovos por grama de raízes foi de até 37% e 39%, respectivamente, em relação ao tratamento sem extrato, não havendo diferença significativa entre as concentrações testadas (Figura 4). Entretanto, nos tratamentos com extrato aquoso a 30% e 40% houve efeito fitotóxico para as plantas.



**Figura 4.** Número de galhas (NG) por grama de raízes e de massas de ovos (MO) por grama de raízes de tomateiros tratados com extrato aquoso de sisal.

Ribeiro et al. (2012) testaram cinco doses do resíduo obtido da casca e polpa externa de pequi (0; 7,5; 15 e 30 g/por 4 kg de solo) no controle de *M. javanica* em tomateiro. Segundo os autores houve redução de 55% e de 52% na altura e na massa da matéria seca da parte aérea, respectivamente, com a dose de 30 g em relação à testemunha, indicando efeito de fitotoxicidade. O aumento das doses do resíduo causou redução no número de galhas, de massas de ovos e de ovos de *M. javanica* no sistema radicular de tomateiros.

Costa et al. (2000) avaliaram a patogenicidade e a reprodução de *M. incognita* em tomateiros tratados com filtrados fúngicos, extratos de plantas e esterco animais. Observaram que o extrato obtido de *Coffea arabica* L. (cafeeiro) causou redução na biomassa da parte aérea da planta e também causou redução no número de ovos. Segundo os autores, a mesma substância responsável pela redução do número de ovos pode ter causado toxidez ao tomateiro.

Não houve diferença entre as plantas tratadas com nematicida e com o extrato, nas concentrações de 30% e 40%, com relação aos números de galhas e de massas de ovos por planta. Entretanto, o nematicida foi superior ao extrato nas concentrações iguais ou inferiores a 30%, para o número de galhas por planta. Para o número de galhas e de massas de ovos por grama de raízes, o nematicida foi superior ao extrato em todas as concentrações. Para as concentrações de 10% e 20% do extrato, observou-se que o nematicida promoveu melhor resultado, com maior redução do número de massas de ovos por planta (Tabela 2).

**Tabela 2.** Estimativas dos contrastes (nematicida x concentrações do extrato aquoso do sisal) e significância para os variáveis (NG – Número de galhas e MO- Número de massas de ovos) avaliadas no controle de *Meloidogyne javanica* em raízes de tomateiro.

CONTRASTES	NG/planta	NG/g raiz	MO/planta	MO/g raiz
10% X Nematicida	188,571**	6,714**	210,285**	6,857**
20% X Nematicida	175,142**	5,710**	188,428**	6,142**
30% X Nematicida	122,428**	5,142**	123,142 <sup>ns</sup>	4,855**
40% X Nematicida	72,714 <sup>ns</sup>	4,857**	97,857 <sup>ns</sup>	5,857**

\*\* - significativo a 1% ns- não significativo a 5%.

Em experimentos *in vitro*, Olabiyi et al. (2008) verificaram que os extratos aquosos de espinho-de-cristo (*Euphorbia hirta* L.), quebra-pedra (*Phyllanthus amarus* L.) e fedegoso (*Cassia obtusifolia* L.) a 0,15 e 0,20 g mL<sup>-1</sup> ocasionaram até 100% de mortalidade de J2 de *M. incognita*. Em análises fitoquímicas nas plantas estudadas, os autores verificaram que estas possuem taninos, flavonoides, alcaloides, esteróis e glicosídeos que podem exercer atividade nematicida. Segundo os autores a redução na taxa de reprodução e na infectividade deste nematóide, possa ser devido à presença de flavonoides nas raízes destas plantas

Dentre os fitoquímicos isolados do sisal, destacam-se ácidos graxos, esteroides, taninos, alcaloides, cumarinas, saponinas, compostos fenólicos, terpenos e flavonoides (ZOU et al., 2006; CHEN et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2009; BARRETO et al. 2010; BOTURA 2011).

O efeito nematicida pode estar associado à ação de metabólitos secundários com atividade biológica, presentes no resíduo do sisal (ZULLO et al., 1989; FRANCIS et al., 2002). As saponinas presentes na fração aquosa de *A. sisalana* interagem com as proteínas da cutícula do nematoide promovendo efeito nematicida (ARGENTIERE et al., 2008). Botura (2011) mencionou que o efeito das saponinas sobre a motilidade de juvenis de *Haemonchus contortus* em caprinos, pode estar associado à interação dessas substâncias com proteínas da cutícula do parasito ou à sua ação de desestabilização das membranas celulares e consequente aumento da permeabilidade celular.

Para Mello e Santos (2002), dentre as hipóteses sobre os mecanismos da ação antimicrobiana dos taninos, destacam-se a inibição de enzimas, a modificação do metabolismo celular pela atuação nas membranas e a complexação com íons metálicos com consequente diminuição da sua disponibilidade para o metabolismo dos micro-organismos. A eficácia antiparasitária dos taninos parece estar associada a sua ação sobre as proteínas encontradas na cutícula, cavidade oral, esôfago, cloaca e vulva de nematoides, alterando suas propriedades físico-químicas (OLIVEIRA et al., 2009). Ademola et al. (2004) relataram que a ação de metabólitos secundários, incluindo saponinas, flavonoides, taninos condensados e alcaloides de *Khaya senegalensis* A. Juss (mogno africano) inibiram o desenvolvimento *in vitro* de juvenis de *H. contortus*.

## Conclusões

1. Concentrações acima de 30% do extrato aquoso de sisal promovem efeito fitotóxico ao tomateiro;
2. O extrato aquoso do sisal controla *M. javanica*, reduzindo o número de galhas e de massas de ovos nas plantas;
3. Este subproduto do sisal apresenta elevado potencial para utilização em sistemas de produção agrícola ambientalmente mais sustentáveis, mediante a geração de um produto bioativo.

**Palavras-chave:** *Agave sisalana* Perrine ex Engelm; nematóide das galhas, controle cultural.



## Agradecimentos

À CAPES pela concessão de bolsas de estudo.

## Referências Bibliográficas

- ABDEL-GAWAD, M.M.; EL-SAYED, M.M. ABDEL-HAMED, E.S. Molluscicidal steroidal saponins and lipid content of *Agave decipiens*. **Revista Fitoterapia**, v.70, p. 371-381, 1999.
- ADEMOLA, I.O.; FAGBEMI, B.O.; IDOWU, S.O. Evaluation of the anthelmintic activity of *Khaya senegalensis* extract against gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. **Veterinary Parasitology**, v. 122, p. 151-164, 2004.
- ALVARENGA, M.A.R. **Tomate: produção em campo, casa-de-vegetação e em hidroponia**. Lavras: UFLA. 2004. 400p.
- ARGENTIERI, M.P.; D'ADDABBO, T.; TAVA, A.; AGOSTINELLI, A. JURZYSTA, M.; AVATO, P. Evaluation of nematicidal properties of saponins from *Medicago* spp. **European Journal of Plant Pathology**, v. 120, p. 189-197, 2008.
- BANDEIRA, D.A.; SILVA, O.R.R.F. Aproveitamento de resíduos. In: ANDRADE, W. (Ed.). **O sisal do Brasil**. Salvador: Sindifibras; Brasília: APEX, 2006. p.58-61.
- BARRÊTO, A.F.; ARAÚJO, E.; BONIFÁCIO, B.F. Eficiência de extratos de *Agave sisalana* (Perrine) sobre o ácaro rajado *Tetranychus urticae* (Koch) e ocorrência de fitotoxidez em plantas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L. r *latifolium* Hutch). **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 5, p. 207-215, 2010.
- BONETTI, J.I.S.; FERRAZ, S. Modificações do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua*, em raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, p. 533, 1981.
- BOTURA, M.B.; SILVA, G.D.; LIMA H.G.; OLIVEIRA, J.V.A.; SOUZA, T.S.; SANTOS J.D.G.; BRANCO, A.; MOREIRA, E.L.T.; ALMEIDA, M.A.O.; BATATINHA, M.J.M. *In vivo* anthelmintic activity of an aqueous extract from sisal waste (*Agave sisalana* Perr.) against gastrointestinal nematodes in goats. **Veterinary Parasitology**, v.177, p. 104-110, 2011.
- CHEN, P.Y.; KUO, Y.C.; CHEN, C.H.; KUO, Y.H.; LEE, C.K. Isolation and immunomodulatory effect of homoisoflavones and flavones from *Agave sisalana* Perrine ex Engelm. **Molecules**, v.14, p.1789-1795, 2009.
- COSTA, M.J.N.; CAMPOS, V.P.; PFENNING, L.H.; OLIVEIRA, D.F. Patogenicidade e reprodução de *Meloidogyne incognita* em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) com aplicação de filtrados fúngicos ou extratos de plantas e de esterco animais. **Nematologia Brasileira**, v. 24, p. 219-226, 2000.
- DAMASCENO, J. C. A. ; SOARES, A. C. F. ; Jesus, F.N. ; SANTANA, R. S. . Sisal leaf decortication liquid residue for controlling *Meloidogyne javanica* in tomato plants. **Horticultura Brasileira (Impresso)**, v. 33, p. 155-162, 2015.
- DOMINGUES, L.F.; BOTURA, M.B.; CRUZ, A.C.F.G.; YUKI, C.C.; SILVA, G.D.; COSTA, M.S.; MURPHY, G.; MOREIRA, E.L.T.; MENESES, I.D.S.; ALMEIDA, M.G.A.R.; BRANCO, A.; ALMEIDA, M.A.O.; BATATINHA, M.J.M. Evaluation of anthelmintic activity of liquid waste of *Agave sisalana* (sisal) in goats. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, p. 270-272, 2010.
- FRANCIS, G.; KEREM, Z.; MAKKAR, H.P.; BECKER, K. The biological action of saponins in animal systems: a review. **British Journal of Nutrition**, v. 88, p. 587-605, 2002.

GULERIA, S.; KUMAR, A. Antifungal activity of *Agave americana* leaf extract against *Alternaria brassicae*, causal agent of *Alternaria* blight of Indian mustard (*Brassica juncea*). **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v.42, p. 370-375, 2009.

MELLO, C. P. SANTOS, S. C. Taninos. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Organizado por Cláudia Maria Oliveira Simões et al. 4 ed. Porto Alegre / Florianópolis: Editora Universitária / UFRGS / Ed. da UFSC, 2002. 950 p

OLABIYI, T.I.; OYEDUNMADE, E.E.A.; IBIKUNLE, G.L.; OJO, O.A., ADESINA, G.O.; ADELASOYE, K.A.; OGUNNIRAN, T.A. Chemical composition and bio-nematicidal potential of some weed extracts on *Meloidogyne incognita* under laboratory conditions. **Plant Sciences Research**, v. 1, p. 30-35, 2008.

OLIVEIRA, L.M.B.; BEVILAQUA, C.M.L.; COSTA, C.T.C.; MACEDO, I.T.F.; BARROS, R.S.; RODRIGUES, A.C.M.; CAMURCA VASCONCELOS, A.L.F.; MORAIS, S.M.; LIMA, Y.C.; VIEIRA, L.S.; NAVARRO, A.M.C. Anthelmintic activity of *Cocos nucifera* L. against sheep gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 159, p. 55-59, 2009.

POTENZA, M.R.; GOMES, R.C.O.; JOCYS, T.; TAKEMATSU, A.P.; RAMOS, A.C.O. Avaliação de produtos naturais para o controle do ácaro rajado *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) (Acari: Tetranychidae) em casa de vegetação. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.73, p.455-459, 2006.

REGAIEG, H.; CIANCIO, A.; RAOUANI, N. H.; GRASSO, G.; ROSSO, L. Effects of culture filtrates from the nematophagous fungus *Verticillium leptobactrum* on viability of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 2285-2289, 2010.

RIBEIRO, H.B.; RIBEIRO, R.C.F.; XAVIER, A.A.; CAMPOS, V.P.; DIAS-ARIEIRA, C.R.; MIZOBUTSI, E.H. Resíduos de frutos de pequi no controle do nematóide das galhas em tomateiro. **Horticultura Brasileira**, v. 30, p. 453-458, 2012.

SANTOS, J.F.; SOUSA, C.S; SOARES, A.C.F.; LIMA, F.S. Efeito nematicida de extratos de resíduos orgânicos sobre *Scutellonema bradys*. In: **XXXV CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA**, 2012, Jaguariúna SP.

SECTI. Projeto Sisal de Base Tecnológica. Disponível em: <http://www.secti.ba.gov.br/wp-content/uploads/2013/01/PROJETO-SISAL-DE-BASE-TECNOLOGICA.pdf>. Acesso em 05 jan. 2014.

SOARES, A.C.F ; DAMASCENO, J.C.A . Control of *Meloidogyne javanica* in lettuce plants with sisal (*Agave sisalana*) liquid waste. In: III Congreso Latinoamericano de Agroecología: Para alcanzar la soberanía alimentaria en un planeta en crisis ambiental, energética y climática, Mexico, 2011.

SOUZA, M.F. **Atividade inseticida de extratos obtidos a partir do resíduo líquido de *Agave sisalana* Perrine no controle da praga *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: noctuidae) em milho**. 2009. 77f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, BA. 2009.

SUINAGA, F.A.; SILVA, O.R.R.F.; COUTINHO, W.M. Cultivo de Sisal na região Semi-árida do nordeste brasileiro. Campina Grande: EMBRAPA Algodão, v.5, 42p, 2006.

ZOU, P.; FU, J.; YU, H.S.; ZHANG, J.; KANG, L.P.; MA, B.P.; YAN, X.Z. The NMR studies on two new furostanol saponins from *Agave sisalana* leaves. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v.44, n.12, p.1090-1095, 2006.

**FUNGOS ENDOFÍTICOS DE RAÍZES DE SISAL NO MUNICÍPIO  
DE CONCEIÇÃO DO COITÉ, BAHIA, BRASIL**

## FUNGOS ENDOFÍTICOS DE RAÍZES DE SISAL NO MUNICÍPIO DE CONCEIÇÃO DO COITÉ, BAHIA, BRASIL

Pesquisa Institucional desenvolvida no Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, pertencente ao Grupo de Pesquisa em Biotecnologia Microbiana Aplicada à Agricultura; Trabalho de tese da primeira autora.

Eliane Leal Candeias<sup>1</sup>, Maria Luíza do Carmo Santos<sup>2</sup>, Cristiane Duarte dos Santos<sup>3</sup>, Elizabeth Amélia A. Duarte<sup>4</sup>, Thiago Alves Santos de Oliveira<sup>5</sup>, José Luiz Bezerra<sup>6</sup>, Ana Cristina S. Fermino<sup>7</sup>

<sup>1,3</sup>Doutoranda em Ciências Agrárias (UFRB). E-mail: [agrcandeias@hotmail.com](mailto:agrcandeias@hotmail.com); [agrocristiane@yahoo.com.br](mailto:agrocristiane@yahoo.com.br)

<sup>2</sup>Graduanda de Biologia (UFRB). E-mail: [mluizadocarmo@gmail.com](mailto:mluizadocarmo@gmail.com)

<sup>4,5</sup>PNPD-CAPES/UFRB. Email: [elizabethaad@gmail.com](mailto:elizabethaad@gmail.com); [oliveira.tas@gmail.com](mailto:oliveira.tas@gmail.com)

<sup>6</sup>Professor orientador, Departamento de Micologia/UFPE. E-mail: [jlulabezerra@hotmail.com](mailto:jlulabezerra@hotmail.com)

<sup>7</sup>Professora orientadora, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas/UFRB. E-mail: [ferminosoares@gmail.com](mailto:ferminosoares@gmail.com)

### Abstract

Ten isolates of endofitic fungi from *Agave sisalana* ex Elgelm roots were morphologically characterized and identified: *Myceliophthora* cf. *lutea*, *Periconia* sp., *Chaetomium* sp. 1, *Sesquicillium* sp. 1, *Sesquicillium* sp. 2., *Chaetomium* sp. 2, *Chaetomium* sp. 3 e *Phaeosclera* sp. Each isolate was confronted to *Aspergillus niger*, causal agent of red bole disease of *A. sisalana*. All isolates showed antagonistic interactions of the types overgrowth, dead-lock, entanglement of hyphae and antibiosis. None of the isolates showed patogenity against *A. sisalana* leaves.

**Keywords:** *Agave sisalana*, red root disease, antagonistic fungi and biological Control.

### Introdução

A planta *Agave sisalana* Perrine ex Engelm, monocotiledônea pertencente à família *Agavaceae*, conhecida popularmente como agave e sisal, é cultivada em locais como o semiárido baiano devido às suas características de rusticidade e resistência à seca. O gênero *Agave* compreende cerca de 300 espécies que são nativas de zonas tropicais e subtropicais da América do Sul e do Norte (MEDINA, 1954a; SANCHES POTES et al., 1991). Tem como centro de origem a península de Yucatan no México e, embora não seja uma planta brasileira, adaptou-se bem ao semiárido nordestino, onde o cultivo ocorre em larga escala apesar das altas temperaturas e secas prolongadas (SUINAGA et al., 2006). Estudos conduzidos nas condições do nordeste brasileiro comprovaram o bom desenvolvimento das plantações de agave estabelecidas em locais com altitude de até 600 metros, regime

de precipitação pluvial de 450 a 1200 mm/ano e em solos alcalinos com média de pH 7,0 (BELTRÃO, 2006).

A Bahia é o maior Estado produtor de sisal no Brasil e ocupa a décima posição na linha de exportação da fibra que atingiu 29,7 mil toneladas no ano de 2013 (CONAB, 2014). Em 74 municípios da região do semiárido baiano, o cultivo do sisal proporciona renda a aproximadamente 700 mil pessoas e ocupa cerca de 290 (CONAB, 2008). Esses municípios apresentam condições edafoclimáticas desfavoráveis a outras culturas, sendo assim, o sisal é a melhor alternativa de fonte de renda para esta população (SEAGRI, 2012).

Contudo, os plantios de sisal da Bahia estão sendo acometidos pela podridão vermelha, doença causada pelo fungo *Aspergillus niger* v. Tieghem que tem ocasionado perdas de 75% na produção. (COUTINHO et al., 2006; SOARES et al., 2006; ABREU, 2010). Este fungo pertence à ordem Eurotiales, Família Trichocomaceae e Filo Ascomycota (DEEPAKE, 2009). Seu crescimento é aeróbico sendo encontrado comumente na serrapilheira e na matéria orgânica em decomposição (SCHUSTER et al., 2002). É um patógeno facultativo que necessita de lesões de origem mecânica e/ou aberturas naturais (lenticelas, estômatos para causar a infecção no hospedeiro (LIMA et. al., 1998). Neste aspecto, os estudos de micro-organismos com ação de biocontrole vem sendo realizado com a finalidade de desenvolvimento de sistemas de proteção de plantas ecologicamente sustentável (COMPANT et al., 2005; SOUSA; SOARES; GARRIDO, 2009).

A partir de 1970, estudos com fungos endófitos em inúmeras plantas cultivadas e não cultivadas vem sendo estudados visando seu emprego como agentes de controle biológico, despertando também interesse na indústria farmacêutica devido às suas propriedades farmacológicas (RODRIGUES & SAMUELS, 1999; NALINI et al., 2014; AMIN et al., 2014). A palavra endófito é originada do grego, *endon* e *phyton*, que significa “interior da planta”, abrangendo em sua definição principalmente fungos e bactérias que interagem de maneira simbiótica com a planta hospedeira (SCHULZ & BOYLE, 2005). Os fungos endófitos não provocam sintomas aparentes em seus hospedeiros, podendo ser mutualísticos, latentes, comensalistas e/ou sapróbios (KOGEL et al., 2006). Estes não ocorrem em hospedeiros específicos, mas muitos preferem locais (tecidos) distintos da planta, podendo desse modo possuir uma relação com o conteúdo do tecido vegetal (PETRINI et al., 1992; SILVA, 2014). Espécies de fungos comprovadamente fitopatogênicas podem em determinadas situações se comportarem como endófitas (LIMA, 2014).

Fungos endófitos são geralmente isolados a partir de raízes, ramos, folhas, caules, ovários, anteras, sementes, estames e estruturas florais como pólen (ARAÚJO et al., 2002). Muitos fungos endófitos de raízes podem sobreviver no solo, especialmente na rizosfera que é uma fonte excelente de endófitos apesar da presença constante de fungos habitantes comuns do solo e de eventuais fungos fitopatogênicos que sobrevivem ou completam parte do seu ciclo vital no solo (GERMIDA et al., 1998; PRELL & DAY, 2000; SESSITSCH et al., 2002). Neste último caso temos o fungo *Aspergillus niger*, que possui ampla capacidade de sobreviver e até crescer limitadamente nas condições de solo das plantações de sisal (PRELL & DAY, 2000).

Atualmente é possível encontrar muitos trabalhos que comprovam a atuação dos fungos endófitos no controle biológico de doenças e pragas, contribuindo também para o aumento da tolerância a estresses abióticos e na promoção do crescimento da planta (SCHULZ et al., 2002; ZHANG et al., 2014).

Acredita-se que algumas substâncias bioativas que ocorrem nas plantas podem ser produzidas por estes microrganismos associados, porém a relação física e bioquímica entre os endófitos e a planta é algo que ainda não está esclarecido (STROBEL, 2003; AMIN et al., 2014).

O controle biológico é um método que tem por princípio, manter um equilíbrio no agroecossistema, de modo que o hospedeiro, na presença do agente patogênico, não sofra danos significativos, em função da ação controladora dos organismos benéficos do sistema (GRIGOLETTI Jr, 2000). Alguns microrganismos endófitos atuam inibindo os patógenos por competição por nutrientes, parasitismo direto e pela produção de metabólitos (GRIGOLETTI Jr, et al. 2000; RUBINI et al., 2005).

O conhecimento científico dos fungos endófitos do sisal ainda é escasso e necessita, portanto, de mais estudos biológicos, morfológicos e moleculares para melhor caracterização dos isolados existentes e a serem encontrados futuramente, a fim de se estabelecer a variação de virulência desses isolados e até a ocorrência de isolados não patogênicos que possam ser mais competitivos do que os isolados patogênicos (LIMA, 2014). Do ponto de vista taxonômico e de diversidade das espécies de fungos encontrados no ecossistema sisaleiro é necessário descobrir as que estão melhor representadas na micota associada ao sisal, pertencentes aos filos mais importantes do reino Fungi: Ascomycota e Basidiomycota (anarmofos e teleomorfos). A ordem Mucorales (filo incerta sedis) precisa ser investigada nas plantações de sisal porque abrange espécies decompositoras primárias, bem como, algumas espécies fitopatogênicas, sendo que entre as primeiras podem ser encontrados agentes potenciais de controle biológico de doenças de plantas. (SCHULZ & BOYLE, 2005). As ferramentas moleculares, como a metagenômica, possibilitam a identificação de espécies difíceis de serem encontradas pelos métodos morfológicos, além de encurtar o tempo necessário para inventariar a micota associada às plantações de sisal e de outras plantas.

Neste estudo foi realizada a prospecção e identificação de fungos endofíticos de raízes de plantas sadias de *A. sisalana* coletadas no município de Conceição do Coité, Bahia, Brasil utilizando-se o método de isolamento em meio de cultura e posterior identificação das espécies por meio da taxonomia clássica. Alguns gêneros de fungo de difícil ocorrência foram detectados, como *Phaeosclera* e *Myceliophthora* que precisam ser submetidos a estudos de DNA a fim de terem suas identificações confirmadas.

## **Metodologia**

### **Local de coleta**

As amostras de raízes do sisal foram coletadas de forma aleatória a partir de 80 plantas sadias, utilizando o método de caminhamento em "W". As coletas ocorreram no município de Conceição do Coité, Bahia no período de estiagem do ano de 2014. Foram escolhidas quatro áreas de acordo com relatos de alta e baixa incidência da



doença para cultivos de *A. sisalana*.

### **Isolamento dos fungos endófitos de sisal**

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, no Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas, Cruz das Almas/BA.

As raízes foram lavadas em água corrente e sabão neutro e posteriormente fragmentadas com 5 mm de comprimento para proceder a desinfestação superficial em álcool 70% por um minuto, seguido de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 3% por 4 minutos e novamente em álcool 70% por 30 segundos. Em seguida foram lavados em água destilada e esterilizada e, então, seis fragmentos foram transferidos para placas de Petri com meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e cloranfenicol ( $50\text{mg L}^{-1}$ ), incubadas à temperatura ambiente ( $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ). O experimento foi realizado com três repetições incluindo o controle negativo (50  $\mu\text{L}$  da última água de lavagem das raízes plaqueado em meio BDA). As placas foram verificadas diariamente por até 15 dias quanto ao crescimento de colônias fúngicas circundantes ao fragmento da raiz.

Os isolados obtidos foram preservados pelo método Castellani (1967) para os estudos posteriores e em ultrafreezer para os estudos moleculares.

### **Caracterização e identificação dos fungos endófitos**

A análise macroscópica possibilitou a observação das culturas em meio BDA, quanto ao aspecto do micélio aéreo, a coloração da colônia (verso e reverso), forma, odor e crescimento micelial durante 10 dias de incubação em BOD ( $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

A caracterização morfológica foi realizada por meio de preparações microscópicas contendo fragmentos das culturas visualizadas ao microscópio de luz (Leica<sup>®</sup> DM750). As estruturas foram esboçadas a lápis para melhor interpretação das mesmas e também microfotografadas ao microscópio com auxílio de uma câmara fotográfica (Leica<sup>®</sup> ICC50HD). Os fungos foram identificados por meio de chaves analíticas, inicialmente quanto ao gênero e posteriormente quanto à espécie. Utilizou-se também a técnica de microcultivo adaptada (Riddell, 1950) para observação da conidiogênese. Foram utilizados trabalhos específicos na classificação dos táxons (ELLIS, 1971; 1976; SUTTON, 1980; DOMSCH et al., 1993).

### **Resultados e Discussão**

Foram isolados 176 fungos, sendo 78 isolados da área de plantio com *A. sisalana*, em área de baixa incidência e 98 isolados em área de alta incidência da podridão vermelha. A morfologia das colônias e as estruturas microscópicas principais de cada isolado são apresentadas na Figura 1.

Entre os fungos endófitos identificados até o momento, constam três isolados do gênero *Chaetomium*, provavelmente da mesma espécie, dois isolados de *Sesquicillium* sp. provavelmente de espécies diferentes e um isolado de cada um dos gêneros *Myceliophthora*, *Periconia* e *Phaeosclera* (Tabela 1).

Os isolados identificados apresentaram esporos de vários tipos, como: ascósporos (*Chaetomium*), fialoconídios (*Sesquicillium*), blastoconídios (*Periconia*), aleurioconídios (*Myceliophthora* e *Phaeosclera*) Os tipos de esporos e de esporogênese são essenciais para identificar classificar gêneros e espécies de fungos.

**Tabela 1** - Identificação dos isolados de fungos endofíticos de raízes de *A. sisalana* da região de Conceição de Coité, BA, Brasil.

Isolados	Táxons
F 74.4	<i>Myceliophthora</i> cf. <i>lutea</i>
F 52.3	<i>Periconia</i> sp.
F 66.4	<i>Phaeosclera</i> sp.
F 29.2	<i>Sesquicillium</i> sp.
F 50.4	<i>Sesquicillium</i> sp.
F 53.6	<i>Chaetomium</i> aff. <i>britannicum</i>
F 44.2	<i>Chaetomium</i> aff. <i>britannicum</i>
F 62.8	<i>Chaetomium</i> aff. <i>britannicum</i>

A presença abundante de clamidósporos nos isolados de *Myceliophthora* e *Phaeosclera* é própria das espécies que sobrevivem longos períodos no solo e outros substratos sendo uma característica particularmente desejável para fungos utilizados no controle biológico de doenças (BETTIOL, 1995). O isolado de *Phaeosclera dematioides*, única espécie do gênero, apresenta alguns detalhes morfológicas discrepantes da espécie tipo, havendo necessidade de estudos moleculares para confirmar se o isolado estudado corresponde a uma nova espécie desse gênero.

O fungo *Chaetomium* aff. *britannicum* apresenta diferenças morfológicas, sobretudo, quanto à assimetria dos ascósporos quando comparado com a única descrição desse gênero feita por Ames (1961). Tal gênero é relatado como efetivo no biocontrole de doenças de plantas (SOYTONG et al., 2001; REISSINGER et al., 2003) assim como *Sesquicillium* sp. e *Periconia* sp. (TURHAN, 1993).

Os demais isolados estão sendo estudados morfológicamente e serão submetidos à análise molecular de no mínimo três genes para efetiva identificação ao nível de espécies de fungos aqui relatadas constam na literatura como potenciais biocontroladores de patógenos de plantas sendo o seu estudo, portanto, de grande importância para a cultura de sisal.

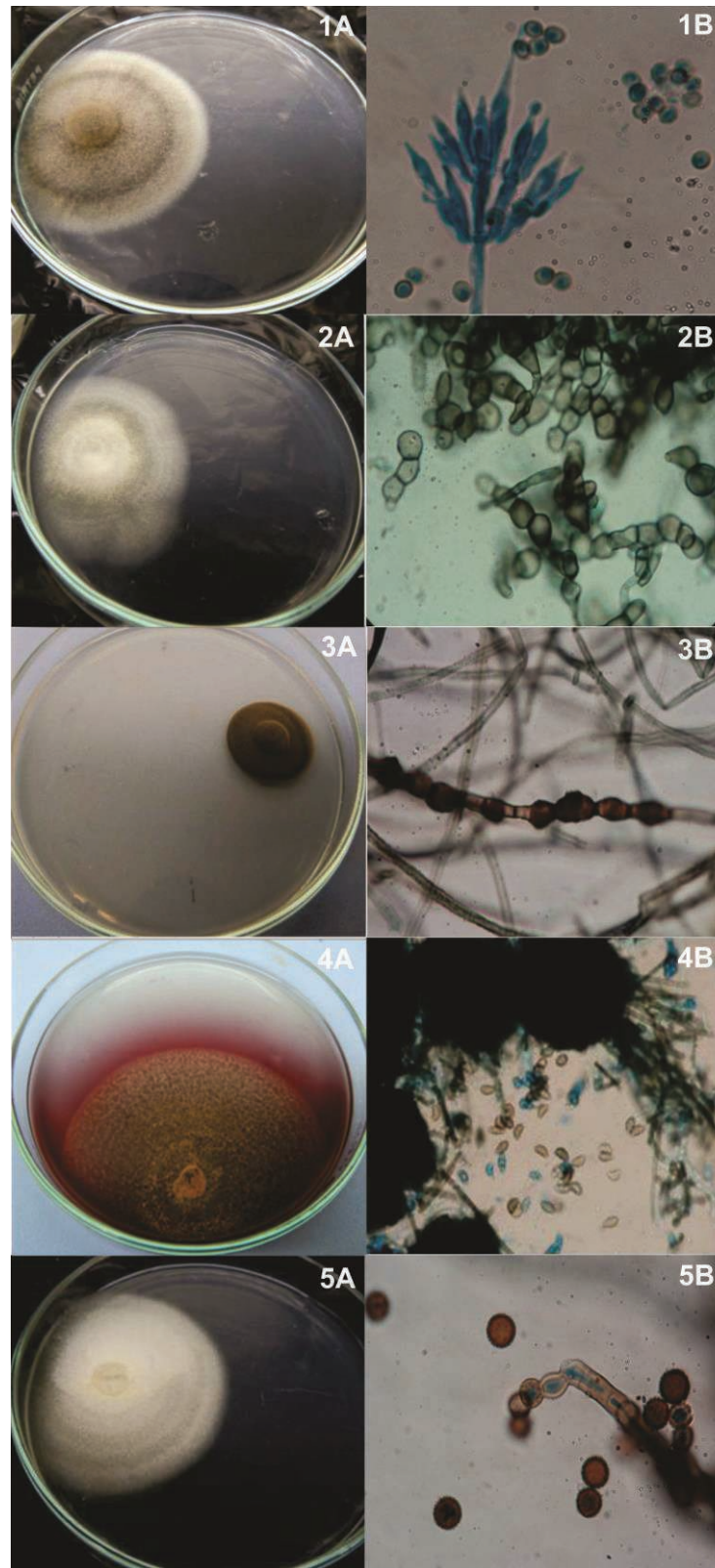


Figura 1. Cultura (A) e estruturas microscópicas (B) dos fungos endófitos estudados. 1 A-B - *Sesquicillium* sp.; 2 A-B - *Phaeosclera* sp.; 3 A-B - *Myceliophthora* cf. *lútea*; 4 A-B - *Chaetomium* aff. *britannicum*; 5 A-B - *Periconia* sp.

## Conclusões

- Oito isolados de cinco gêneros de fungos endofíticos foram encontrados em plantas de sisal na Bahia os quais podem eventualmente mostrar potencial para o controle biológico da podridão vermelha do sisal.

**Palavras-Chave:** *Agave sisalana*, endofíticos, biocontroladores.

## Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES, FABESB e CNPq pela concessão de bolsas de estudo para os autores desse trabalho e financiamento do projeto, assim como a UFRB pela infraestrutura. As técnicas do laboratório de microbiologia Zozilene Teles e Carolina Yamamoto, pela valiosa ajuda no desenvolvimento do trabalho.

## Referências Bibliográficas

ABREU, K. C. L. M. 2010. Epidemiologia da podridão vermelha do sisal no estado da Bahia. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia). Cruz das Almas – BA, 106 p.

AMES, L.M. 1961. *A Monograph of the Chaetomiaceae*. US Army Research and Development Series 2: i-ix, 1-125.

AMIN, N., SALAM, M., JUNAID, M., ASMAN and BCO, M. S. 2014. Isolation and characterization of endophytic fungi from VSDM.05 and VSDM.01 in Southlawesi, Indonesia. International Journal Current Microbiology and Applied Sciences 3:(2: 459-67).

ARAÚJO, W.L., MARCON, J., MACCHERONI JUNIOR, W., ELSAS, J.D. VAN, VUURDE, J.W.L. VAN, AZEVEDO, J.L. 2002. Diversity of endophytic bacterial populations and their interactions with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. Applied and Environmental Microbiology 68: 4906-4914.

BELTRÃO, N.E.M. A planta. In: ANDRADE, W.(Ed.) 2006. O Sisal do Brasil. 1.ed. Salvador: SINDIFIBRAS; Brasília: APEX-Brasil, p.25-28.

BETTIOL, W.; GHINI, R. 1995. Controle biológico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 1. p. 718.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. Volume exportado e geração de divisas do sisal em 2008. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 16 de Março de 2014.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. Volume exportado e geração de divisas do sisal em 2014. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 17 de Março de 2014.

COUTINHO, W.M.; LUZ, C.H.; SUASSUNA, N.D.; SILVA, O.R.R.F.; SUINAGA, F.A. 2006. A podridão do tronco do sisal. Campina Grande: Embrapa Algodão, 4p. (Comunicado Técnico, 281).

COMPANT, S. et al. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future perspectives. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 71, n. 9, p. 4951-4959.

DEEPAKE, U. 2009. Aero-microbiological studies of Moisture Affected Buildings in the Indoor Environmecnt. *Journal of Young Investigators*. Vol. 19, Issue 11.

DOMSCH, K.H., Gams, W., Anderson, T.H. 1993. *Compendium of soil fungi*. Verlag : IHW, 1264p.

ELLIS, M.B. 1971. *Dematiaceous Hyphomycetes*. England. Commonwealth Mycological Institute, Kew, 608p.

ELLIS, M.B. 1976. *More Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, 507p.

GERMIDA, J.J., SICILIANO, S.D., FREITAS, J.R., SEIB, A.M. 1998. Diversity of root-associated bacteria associated with held-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiology Ecology* 26: 43-50.

GRIGOLETTI JR., A.; SANTOS, A. F.; AUER, C. G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. *Revista Floresta*, v.30, p.155-165, 2000.

KOGEL, K.H., FRANKEN, P., HÜCKELHOVEN, R. 2006. Endophyte or parasite – what decides? *Current Opinion in Plant Biology* 9: 358-363.

LIMA, E.F.; MOREIRA, J. de A.N.; BATISTA, F.A.S.; SILVA, O.R.R.F.da; FARIAS, F.J.C.; ARAÚJO, A.E. 1998. Podridão vermelha do tronco do sisal (*Agave sisalana* Perr.) causada por *Botryodiplodia theobromae* Pat. *Revista de Oleaginosas e Fibrosas*, Campina Grande, v.2, n.2, p.109-112.

LIMA, T. E. F. 2014. *Micobiota da rizosfera, rizoplano e endofita de Vitis labrusca L. cv. Isabel*. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco.

MEDINA, J.C. *Sisal*. 1954. São Paulo: Secretaria da Agricultura, do Estado de São Paulo, 285p.

NALINI MS, SUNAYANA N, PRAKASH HS. 2014. Endophytic fungal diversity in medicinal plants of Western Ghats, India. *International Journal of Biodiversity*. doi.org/10.1155/2014/494213.

PETRINI, O., SIEBER, T., TOTI, L., VIRET, O. 1992. Ecology, metabolite production and substrat utilization in endophytic fungi. *Natural Toxins* 1: 185-196.

PRELL, H.H., DAY, P.R. 2000. *Plant-Fungal Pathogen Interaction. A Classical and Molecular View*. Springer Verlag, Berlin.

REISSINGER A. WINTER S. STECKELBROECK S. HARTUNG W. SIKORA R. A. 2003. Infection of barley roots by *Chaetomium globosum*: evidence for a protective role of the exodermis. *Mycological Research* 107: 1094-1102



RIDELL, R.W. 1950. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia* 1 (42): 265.

RODRIGUES, K.F., SAMUELS, G.J. 1999. Fungal endophytes of *Spondias mombin* leaves in Brazil. *Journal Basic of Microbiology* 2(39): 131-135.

RUBINI, M. R., SILVA-RIBEIRO, R. T., POMELLA, A. W. V., MAKI, C. S., ARAÚJO, W. L., SANTOS, D. R. dos, AZEVEDO, J. L. 2005. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. *International Journal of Biological Sciences* 1:24-33. doi:10.7150/ijbs.1.24.

SANCHES POTES, A.; KIRCHNGR SALINAS, F.R.; LOPEZ GONSÁLEZ, E.; PAULIN TORRES, N.;USAMI OLMOS, C. 1991. Manuales para educación agropecuária: cultivos de fibras. México: Trillas, 84p.

SCHULZ, B., BOYLE, C., DRAEGER, S., AUST, H. J., RÖMMERT, A.K., KROHN, K. 2002. Endophytic fungi: a source of novel biological active secondary metabolites. *Mycological Research* 106: 996-1004.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. 2005. The endophytic continuum. *Mycological Research*. Cambridge, v. 109, p. 661- 686.

SCHUSTER,S., PFEI FFER,T., MOLDENHAUER,F., KOCH,I. AND DANDEKAR,T. 2002. Exploring the pathway structure of metabolism: Decomposition into subnetworks and application to *Mycoplasma pneumoniae*, *Bioinformatics*, 18, 351-361.

SECRETARIA DA AGRICULTURA, PECUÁRIA, IRRIGAÇÃO, REFORMA AGRÁRIA, PESCA E AQUICULTURA-SEAGRI. Estiagem prolongada atinge duramente produção de sisal em 2013. Disponível em: <http://www.seagri.ba.gov.br/noticias>. Acesso em: 16 de março de 2014.

SESSITSCH, A., REITER, B., PFEIFER, U., WILHELM, E. 2002. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiology Ecology* 39:23-32.

SILVA, I. P. 2014. Fungos Endofíticos: Fonte Alternativa A Metabólitos Secundários de Plantas Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.18; p. 3889.

SOARES, A. C. F.; SALOMÃO, M. S.; ALMEIDA, N. de S.; PEREZ, J. O.; GARRIDO, M. da S. 2006. *Aspergillus niger* como agente causal de manchas foliares e podridão do pseudocaule do sisal. In: XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Salvador, BA.

SOYTONG K. KANOKMEDHAKUL S. KUKONGVIRIYAPA V. ISOBE M. 2001. Application of *Chaetomium* species (*Ketomium*(R)) as a new broad spectrum biological fungicide for plant disease control: a review article. *Fungal Diversity* 7: 1-15.



SOUSA, C. S.; SOARES, A. C. F.; GARRIDO, M. S. 2009. Produção de mudas de tomateiro em substrato orgânico inoculado e incubado com estreptomicetos. *Bragantia*, Campinas, v. 68, n. 1, p. 195-203.

STROBEL, G.A. 2003. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection* 5: 535-544.

SUINAGA, F.A.; SILVA, O.R.R.F.; COUTINHO, W.M. 2006. A história. In: ANDRADE, W. (Ed.) *O Sisal do Brasil*. 1.ed. Salvador: SINDIFIBRAS; Brasília: APEX-Brasil, p.19-21.

SUTTON, B.C. 1980. *The Coelomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, England. 696p.

TURHAN G. 1993. Mycoparasitism of *Alternaria alternata* by an additional eight fungi indicating the existence of further unknown candidates for biological control. *J Phytopathol*138:238-292.

ZHANG, Q., ZHANG, J., YANG, L., ZHANG, L., JIANG, D., CHEN, W., LI, G. 2014. Diversity and biocontrol potential of endophytic fungi in *Brassica napus*. *Biological Control* 72: 98-108.

# **IMPACTOS DO USO DA BIOTECNOLOGIA NA AGRICULTURA**

## IMPACTOS DO USO DA BIOTECNOLOGIA NA AGRICULTURA

Vanessa Chaves da França<sup>1</sup>; Romeu da Silva Leite<sup>2</sup>; Pedro Alcantara da Silva Abreu<sup>3</sup>; Robson Argolo dos Santos<sup>4</sup>; Marilza Neves do Nascimento<sup>5</sup>

1 Aluna do Curso de Graduação em Agronomia, bolsista FAPESB, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), email: vanessafranca2011@hotmail.com

2 Aluno do Curso de Graduação em Agronomia, bolsista PIBIC/CNPq, UEFS, email: leiteromeu@hotmail.com

3 Aluno do Curso de Graduação em Agronomia, bolsista FABESP, UEFS, email: pedro\_804@hotmail.com

4 Aluno do Curso de Graduação em Agronomia, bolsista FABESB, UEFS, email: argolo.agro@gmail.com

5 Professora Doutora do Departamento de Ciências Biológicas, UEFS, email: marilzaagro@hotmail.com

### Introdução

A população mundial vem aumentando progressivamente e correlacionado com esse crescimento, também cresce a demanda pela produção de alimento e o consumo das reservas energéticas não renováveis. Diante desta situação, existe o desafio de criar métodos avançados e eficientes para aumentar a produção de alimentos e energia renovável sem, contudo, esgotar os recursos naturais. A abertura de novas fronteiras agrícolas, a intensificação do uso do solo, a utilização de fertilizantes, o uso de variedades melhoradas geneticamente, a adoção de plantios adensados, o uso de agrotóxicos, o uso de plantas transgênicas, além de outras técnicas que visam obter uma melhor produtividade são corriqueiras nos dias atuais.

A agricultura visa a cultura do solo para a produção de plantas ou a criação de animais úteis ao homem. O estabelecimento de uma agricultura sustentável, que preserve o meio ambiente e proporcione segurança alimentar futura, é um fator primordial para o desenvolvimento da humanidade ante as mudanças climáticas e o declínio das reservas energéticas não renováveis (CARRER et al, 2010).

A incidência do progresso científico e tecnológico caracteriza a agricultura do século XIX, destacando-se a preocupação com os requerimentos nutricionais das plantas e com as doenças que afetavam os cultivos e as criações (MALAJOVICH, 2011).

Diante de tantas necessidades a biotecnologia definida como um conjunto de técnicas de manipulação de seres vivos ou parte destes para fins econômicos, vem contribuindo de maneira positiva na agricultura de modo que a mesma venha a torna-se sustentável. O presente trabalho teve como objetivo realizar uma revisão bibliográfica a respeito dos resultados obtidos a partir do uso da biotecnologia na agricultura.

## Materiais e métodos

O presente trabalho utiliza o referencial da pesquisa bibliográfica, entendida como ato de buscar informações sobre determinado assunto com o propósito de efetuar uma revisão das publicações na área da agricultura, através de um levantamento com o objetivo de detectar o uso da biotecnologia na agricultura. As palavras-chave utilizadas na busca foram biotecnologia, agricultura, transgênicos, biocombustíveis e apomixia.

## Resultados e discussão

A lista dos artigos consultados nas bases de dados que versavam sobre o uso da biotecnologia na agricultura encontra-se no Quadro 1.

**Quadro 1.** Descrição dos artigos selecionados na base de dados quanto ao título e ao (s) autor (es). Feira de Santana, 2015.

TÍTULO	AUTOR
Biotecnologia 2011.	MALAJOVICH, 2011
Biotecnologia na agricultura.	CARRER et al., 2010
Biotecnologia e agricultura da ciência e tecnologia aos impactos da inovação.	SILVEIRA et al., 2005
Apomixia- Em busca de tecnologias de clonagem de plantas por sementes.	CARNEIRO & DUSI, 2002
Aplicação de técnicas de biotecnologia à cultura e melhoramento do maracujazeiro.	LIMA et al., 2000

**Fonte:** Malajovich (2011), Carrer et al. (2010), Silveira et al. (2005), Carneiro & Dusi (2002), Lima et al. (2000).

Levando em consideração o estilo de vida adotado pelo homem, existe uma preocupação em busca de soluções para atenuar os problemas atuais e futuros como a diminuição das reservas de petróleo, a escassez de água potável e a falta de alimentos para grande parte da população. Sendo assim o uso a biotecnologia se faz importante para contribuição em soluções viáveis.

A principal contribuição da biotecnologia moderna à agricultura é a possibilidade de criar novas espécies a partir da transferência de genes entre duas outras distintas. Esta transferência visa ao desenvolvimento de uma planta com atributo de interesse econômico, como é o caso das plantas resistentes a vírus ou a pragas (SILVEIRA et al., 2005).

Os primeiros experimentos com cultivos geneticamente modificados (GM) foram feitos em 1986, nos Estados Unidos e na França. A primeira variedade comercializada de uma espécie vegetal produzida pela engenharia genética foi o "tomate FlavrSavr", desenvolvido pela empresa americana Calgene e comercializada a partir de 1994 (BORÉM & SANTOS, 2001).

Entre 1987 e 2000 foram realizados mais de 11.000 ensaios de campo em 45 países, com mais de 81 cultivos GM diferentes. As culturas mais frequentemente testadas foram milho, tomate, soja, canola, batata e algodão, e as características genéticas introduzidas foram tolerância a herbicidas, resistência a insetos, qualidade do produto e resistência a vírus (BORÉM & SANTOS, 2001).

Como já foi mencionado antes, a difusão dos GM tem sido acelerada. Entre 1996 e 2003, a taxa de crescimento geométrico anual da área plantada com cultivos transgênicos foi de 46,42%. Apesar da grande participação dos Estados Unidos, a difusão ocorreu também nos países em desenvolvimento, com destaque para a Argentina, que apresentou no mesmo período uma taxa de crescimento geométrico anual de 80%.

Além do peso nas economias regionais, os países produtores de cultivos GM destacam-se também no comércio mundial de *commodities*. Os maiores produtores mundiais de soja, milho e algodão já adotaram cultivos GM.

Em 2009, culturas modificadas geneticamente foram plantadas por mais de 14 milhões de agricultores, em 134 milhões de hectares, distribuídos em 25 países (JAMES, 2010). Atualmente a adoção da biotecnologia pelos produtores atinge níveis nunca alcançados por outras tecnologias avançada, em toda história da agricultura. O Brasil ocupa o segundo lugar entre os países com maior área cultivada com transgênicos no mundo, cerca de 40,3 milhões de hectares com soja, milho e algodão, atrás apenas dos Estados Unidos com 70,2 milhões de hectares (ISAAA, 2013). A razão desse indiscutível sucesso são os benefícios obtidos com a produção de plantas transgênicas resistentes a doenças e insetos, a redução no uso de defensivos e o aumento da produção.

Os transgênicos permitiram a intensificação da produção global, contribuindo para evitar que a agricultura disputasse área com reservas de biodiversidade nos 27 países em que são cultivados (ISAAA, 2013). Segundo cálculos do Serviço Internacional para Aquisição de Aplicações em Agrobiotecnologia (ISAAA), 497 milhões de quilos de defensivos químicos deixaram de ser usados graças à adoção de transgênicos resistentes a insetos (Bt) e a herbicidas entre 1996 e 2012. Só em 2012, a ISAAA estima, ainda, que 26,7 bilhões de quilos de dióxido de carbono, um volume equivalente a emissão de 11,8 milhões de carros em um ano, deixaram de ser lançados na atmosfera com o plantio de cultivares geneticamente modificadas.

Outra forma de contribuição é o aperfeiçoamento da eficiência do uso da água na agricultura, a biotecnologia atua em duas frentes: no desenvolvimento de espécies tolerantes a seca, diminuindo a irrigação intensiva e conservando a água no solo, e no melhoramento genético de variedades para resistência a pragas e doenças, reduzindo a necessidade da utilização de produtos químicos nas lavouras.

No Brasil, o desenvolvimento do etanol combustível mostrou ser uma alternativa viável para reduzir a dependência do petróleo. Entretanto, a maioria das regiões agriculturáveis do planeta não possui as condições edafoclimáticas necessárias para o cultivo de plantas com potencial para a produção de biocombustíveis (CARRER et al., 2010). Com a maior produtividade, qualidade da produção e o desenvolvimento de plantas adaptadas a diversas condições ambientais proporcionada pela biotecnologia, reduz-se o risco de cultivos extensivos e exclusivos de plantas para a produção de energia.

Apomixia é o modo de reprodução assexual através de sementes, que ocorre em mais de 300 espécies de 35 famílias de angiospermas (HANNA e BASHAW, 1987). Algumas espécies apomíticas têm alto valor econômico e agrônômico como é o caso das gramíneas. Essas plantas só podem ser usadas na fecundação de plantas sexuais, ou seja, como doadoras de pólen. As vantagens do uso de sementes apomíticas em culturas onde a apomixia não ocorre são inúmeras e já foram discutidas por muitos autores (HANNA e BASHAW, 1987; ASKER e JERLING, 1992). O uso controlado da apomixia na agricultura permitirá fixar genótipos de elite e híbridos de qualidade e propagá-los por sementes. Essa característica poderá trazer muitos benefícios como: possibilidade de propagar e armazenar por sementes culturas que são propagadas por tubérculos, rizomas ou estacas; produção de sementes por pequenos produtores por um número infinito de gerações; simplificação da produção comercial de sementes híbridas com consequente queda no custo total de produção de sementes; simplificação dos programas de melhoramento com consequente aumento no número de cultivares adaptados em cada local (CARNEIRO e DUSI, 2002).

## Conclusão

O uso da biotecnologia moderna pode contribuir para o aumento da produtividade, para redução dos custos de produção e para a produção de alimentos com melhor qualidade nutricional. Bem como para o desenvolvimento de plantas adaptadas a diversas condições edafoclimáticas e ampliação de práticas menos agressivas ao meio ambiente.

## Referências

- ASKER, S.E. & JERLING, L. **Apomixis in Plants**. CRC Press, Boca Raton Ann Arbor London Tokyo. 298p,1992.
- BORÉM, A. & SANTOS, F.R. **Biotechnologia Simplificada**. Viçosa: Ed. UFV, 2001.
- CARNEIRO, V.T.C.; DUSI, D.M.A. **Apomixia- Em busca de tecnologias de clonagem de plantas por sementes**. Biotecnologia ciência e desenvolvimento, 2002.
- CARRER, H.; BARBOSA, A.L.; RAMIRO, D.A. **Biotechnologia na agricultura**. Dossiê Biotecnológico, São Paulo, 2010.
- HANNA, W.W. & BASHAW, E.C. Apomixis: Its identification and use in plant breeding. **Crop Science**. 27:1136-1139,1987.
- JAMES, C. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops**. The First Fourteen Years, 1996 to 2009. In: *International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications*. Ithaca, New York, 2010.



LIMA, D.M.; GOLOMBIESKI, E.R.; AYUB, R.A. Aplicação de técnicas de biotecnologia à cultura e melhoramento do maracujazeiro. **Ciência Rural**. vol.30 no.2 Santa Maria Mar./Apr. 2000.

MALAJOVICH, M.A. **Biotecnologia 2011**. Rio de Janeiro, Edições da Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT, 2012.

SILVEIRA, J.M.F.J.; BORGES, I.C.; BUAINAIN, A.M. **Biotecnologia e agricultura da ciência e tecnologia aos impactos da inovação**. São Paulo, 2005.

**INFECTIVIDADE EM BANANEIRA DE *Radopholus similis*  
SUBMETIDO AO RESÍDUO LÍQUIDO DO DESFIBRAMENTO DE  
FOLHAS DE SISAL**

## INFECTIVIDADE EM BANANEIRA DE *Radopholus similis* SUBMETIDO AO RESÍDUO LÍQUIDO DO DESFIBRAMENTO DE FOLHAS DE SISAL.

Pesquisa Institucional desenvolvida CCAAB - Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, pertencente ao Grupo de Pesquisa Biotecnologia Microbiana Aplicada a Agricultura; Parte do Projeto de dissertação desenvolvida pelo primeiro autor.

Fábio Nascimento de Jesus<sup>1</sup>; Ana Cristina Firmino Soares<sup>2</sup>; Josilda Cavalcante Amorim Damasceno<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Aluno do Curso de Doutorado em Ciências Agrárias, UFRB, bolsista CAPES, fabiorock222@yahoo.com.br.; <sup>2</sup> Doutora em Produção Vegetal, Professora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, do Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas da UFRB, Orientadora, ferminosoares@gmail.com; <sup>3</sup>Doutora em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, bolsista PNPd/CAPES, E-mail: josildadamasceno@gmail.com.

### Introdução

*Radopholus similis*, conhecido vulgarmente como nematoide cavernícola, é responsável por causar grandes perdas em sistemas de produção de banana, com ocorrência em diversas regiões pelo mundo (SARAH, et al. 1996).

Trata-se de um nematoide endoparasita migratório que pode permanecer no córtex das raízes durante todo o seu ciclo de vida, que tem duração que varia de 20 a 25 dias. Este nematoide geralmente penetra próximo às extremidades das raízes, no interior das mesmas, este nematoide migra intracelularmente no parênquima cortical e se alimenta do citoplasma das células parenquimáticas, causando a formação de cavidades que coalescem e ficam parecidas com canais ou galerias (MONTEIRO, 2011).

A presença deste patógeno na cultura da bananeira impede o funcionamento satisfatório do sistema radicular das plantas, limitando a absorção de água e de nutrientes. Isso ocorre em consequência das lesões geradas no córtex das raízes pela presença dos indivíduos que se instalam e que alimentam das células do córtex (ELSEN et al., 2002).

Dentre as formas de controle de nematoides, o uso de nematicidas se constituem num dos métodos mais utilizados. No entanto, o controle químico, além de causar riscos à saúde e contaminar o ambiente, tem alto custo. As preocupações ambientais têm intensificado as pesquisas sobre a utilização de práticas de menor impacto, como a utilização de resíduos orgânicos e de subprodutos para o controle de nematoides em sistemas agrícolas. Esses estudos podem gerar opções tecnológicas para a substituição dos nematicidas sintéticos. Dentro desta linha, têm-se utilizado plantas com propriedades nematicidas que podem, efetivamente, reduzir as populações de nematoides do solo (ELBADRI et al, 2009).

Vários compostos de origem vegetal apresentam atividade nematicida, são rentáveis e ambientalmente seguros (AOUDIA et al., 2012) e podem ser usados na agricultura

(OKA et al., 2000). Com base em princípios dessa natureza, o desenvolvimento de práticas agrícolas que integram fertilizantes orgânicos e produtos naturais tem sido relatado como meio de aumentar a produção sustentável de alimentos (WEZEL et al., 2014).

Assim, o sisal, planta originária do México e adaptada ao Semiárido do Nordeste brasileiro, começa a receber a atenção de pesquisadores interessados em estudar o efeito de seus compostos no controle de pragas e doenças. Em vários municípios localizados em áreas semiáridas no Estado da Bahia, essa planta é a principal base de subsistência econômica de grande parte das famílias que vivem nos meios rural e urbano. O Brasil ocupa lugar de destaque, sendo o maior produtor e exportador mundial da fibra de sisal e, em 2011, a Bahia foi responsável por 95,5% dessa produção (CONAB, 2013).

O principal produto da exploração do sisal é sua fibra. Naturalmente resistente e de uso industrial, tem sido procurada por muitos investidores e ocupado lugar de destaque na economia da região semiárida da Bahia. No entanto, as fibras representam somente 4% do peso da planta, e os resíduos sólidos e aquosos constituem os restantes 96%, que são abandonados em pilhas nas áreas de produção pelos produtores (SUINAGA et al., 2006).

O resíduo líquido do sisal tem como principais constituintes, a partir do metabolismo secundário, alcaloides, compostos fenólicos, cumarinas, saponinas, flavonoides e taninos (BARRETO et al., 2010; BOTURA et al., 2013). Estas substâncias estão relacionadas, principalmente, ao mecanismo de defesa das plantas e podem apresentar efeito inibitório contra fitonematoides (CHITWOOD, 2002).

Em plantas do gênero *Agave*, foram constatadas ações biocidas *in vitro* com relação a nematoides em caprinos e ovinos (DOMINGUES et al., 2010; BOTURA et al., 2011; SILVEIRA et al., 2012; BOTURA et al., 2013), ácaros (BARRETO et al., 2010) e fungos (GULERIA e KUMAR, 2009). Assim, diante do que foi exposto, este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar o resíduo de sisal para o controle de *R. similis*.

## **Material e métodos**

### **Obtenção, identificação, manutenção e multiplicação da população de *Radopholus similis***

A população de *R. similis* foi obtida de amostras de solo e raízes coletadas em lavouras comerciais de bananeira infestadas localizadas no Município de Bom Jesus da Lapa, Bahia. As amostras foram processadas no Laboratório de Nematologia da Embrapa, por meio das metodologias de Jenkins (1964) e de Coolen e D'Herde (1972), com posterior identificação feita com base em caracteres morfológicos (MAI e MULLIN, 1996).

Após a identificação, foram inoculados 800 indivíduos juvenis e adultos de *R. similis* por planta. O inóculo foi depositado próximo às raízes de mudas de bananeira 'Prata Anã' obtidas do banco de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura e multiplicadas por técnicas de micropropagação *in vitro*, na Empresa Campo, localizada na sede da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas, Bahia.

As mudas micropropagadas de bananeira, cedidas pela Empresa Campo, após o período de aclimação, foram transplantadas para vasos que continham 3,0 kg de uma mistura de solo e areia, na proporção 2:1 (v/v), esterilizada em autoclave a 120°C por 1 hora e 30 minutos, em dois dias consecutivos. As mudas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação situada no *Campus* da UFRB, em Cruz das Almas, pelo período de quatro meses, com irrigação diária, para a multiplicação dos nematoides.

Após a multiplicação, os nematoides foram extraídos de raízes de bananeira, mantidas em casa de vegetação, pelo método de Coolen & D'Herde (1972) e de Jenkins (1964). Fez-se a contagem dos nematoides na suspensão obtida, em câmara de contagem de Peters, sob microscópio óptico, para ajustar a suspensão de inóculo para 150 indivíduos por mL para utilização nos ensaios.

### **Obtenção do resíduo líquido de sisal**

O suco (extrato bruto) das folhas de sisal foi obtido durante o desfibramento das folhas no campo, no município de Valente, estado da Bahia. O resíduo foi retirado da máquina de desfibramento, com uma pá de aço inoxidável e foi imediatamente prensado para remoção da parte sólida e transferido para sacos de plástico, sendo estes colocados em isopor com gelo para o transporte para o Laboratório de Microbiologia Agrícola da UFRB, onde foi congelado em freezer comum, a -20°C.

Para a obtenção do resíduo líquido fermentado, o mesmo foi colocado em recipientes fechados e mantido em temperatura ambiente ( $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), durante quatro dias para que ocorresse a fermentação. Em seguida, procedeu-se o congelamento conforme citado anteriormente.

### **Capacidade infectiva dos nematoides tratados com resíduo de sisal**

Após o ensaio *in vitro*, os nematoides submetidos ao resíduo líquido de sisal, fresco e fermentado, na concentração de 5 %, foram inoculados em mudas de bananeira 'Prata Anã' para verificar a capacidade infectiva dos mesmos. Além do resíduo, os nematoides foram expostos ao nematicida e à água como testemunhas. Dessa forma, o experimento apresentou quatro tratamentos (resíduo fresco, resíduo fermentado, água e nematicida), com cinco repetições em delineamento inteiramente ao acaso.

As plantas foram mantidas em casa de vegetação, em vasos com capacidade para 1 kg de solo misturado com areia na proporção de 1:1 (v/v). Essa mistura foi esterilizada em autoclave a 120°C por 1 hora e 30 minutos, por duas vezes, em dias alternados. Aos 45 dias após a inoculação, as plantas foram coletadas e foram avaliadas as populações de nematoides nas raízes, no solo e total, além do fator de reprodução.

Os nematoides foram extraídos de raízes e do solo, utilizando os métodos propostos por Coolen e D'Herde (1972) e por Jenkins (1964), respectivamente e, em seguida, foram contados. O fator de reprodução (SEINHORST, 1967) foi estimado para cada repetição ( $FR = \text{população final/população inicial}$ ), sendo que a população final correspondeu ao total de nematoides encontrados no solo e nas raízes.

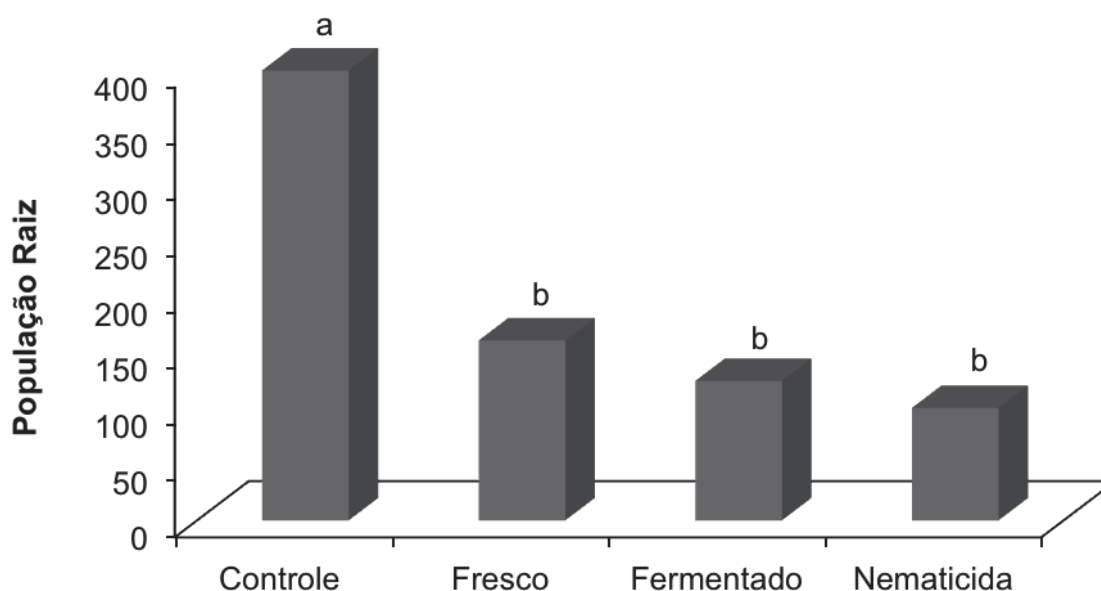
### **Análise estatística**

Os dados foram submetidos à análise de variância e fez-se o teste de tukey para avaliar a diferença entre os tratamentos, para isso, utilizou-se o programa estatístico SAS (2008) (Statistical Analysis System), versão 9.

## Resultados e discussão

No ensaio conduzido em casa de vegetação para avaliar a capacidade infectiva dos espécimes de *R. similis* anteriormente tratados *in vitro*, observou-se que houve efeito significativo ( $p \leq 0,01$ ) dos tratamentos no controle deste nematoide, conforme indicado pelos números de nematoides no solo, nas raízes, contagem total e pelo fator de reprodução.

O resíduo de sisal tanto fresco quanto fermentado foi eficiente na redução da população de nematoides nas raízes de bananeira, uma vez que ambos os tratamentos não diferiram estatisticamente ( $p > 0,05$ ) do nematicida (Figura 1).



**Figura 1.** População de *Radopholus similis* nas raízes de bananeira 'cultivar' inoculadas com nematoides previamente expostos aos tratamentos *in vitro*.

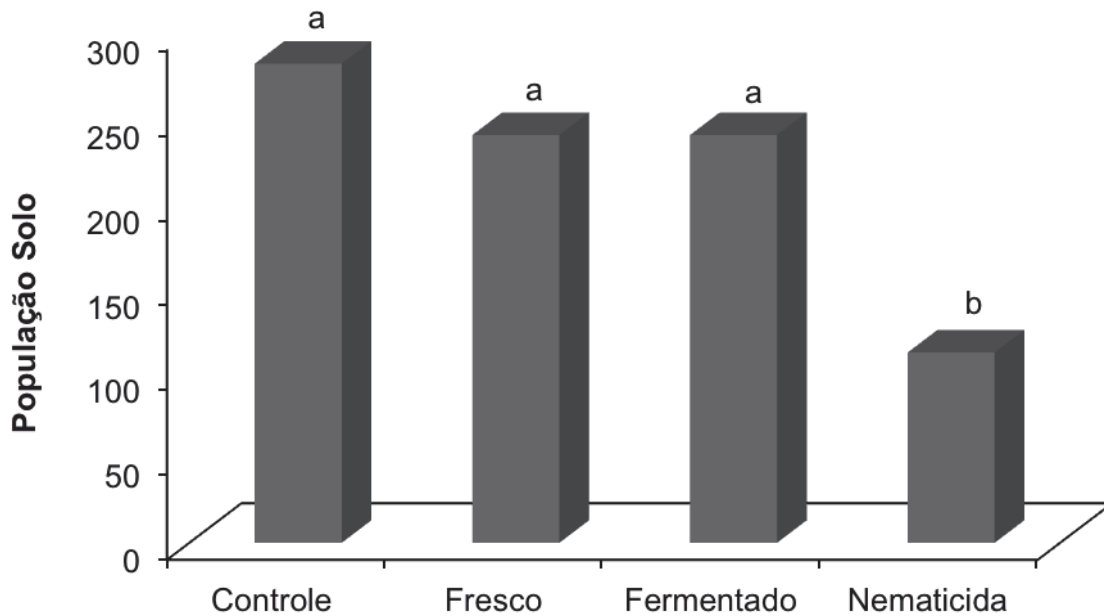
Comparando-se o controle (400 nematoides/raiz) com os tratamentos com a utilização do resíduo, pôde-se observar que houve reduções na população de nematoides de 60 e 69%, respectivamente, com a utilização do resíduo fresco e fermentado (Figura 1).

O mesmo comportamento não foi observado com relação à população de nematoides no solo. O nematicida foi mais eficiente e causou uma redução de aproximadamente 53 % na população final do nematoide no solo quando comparado ao resíduo fresco ou fermentado. O resíduo de sisal, tanto fresco quanto fermentado, causou uma redução de aproximadamente 15% na população do nematoide no solo quando comparado ao controle, no entanto, não houve diferença significativa entre ambos (Figura 2).

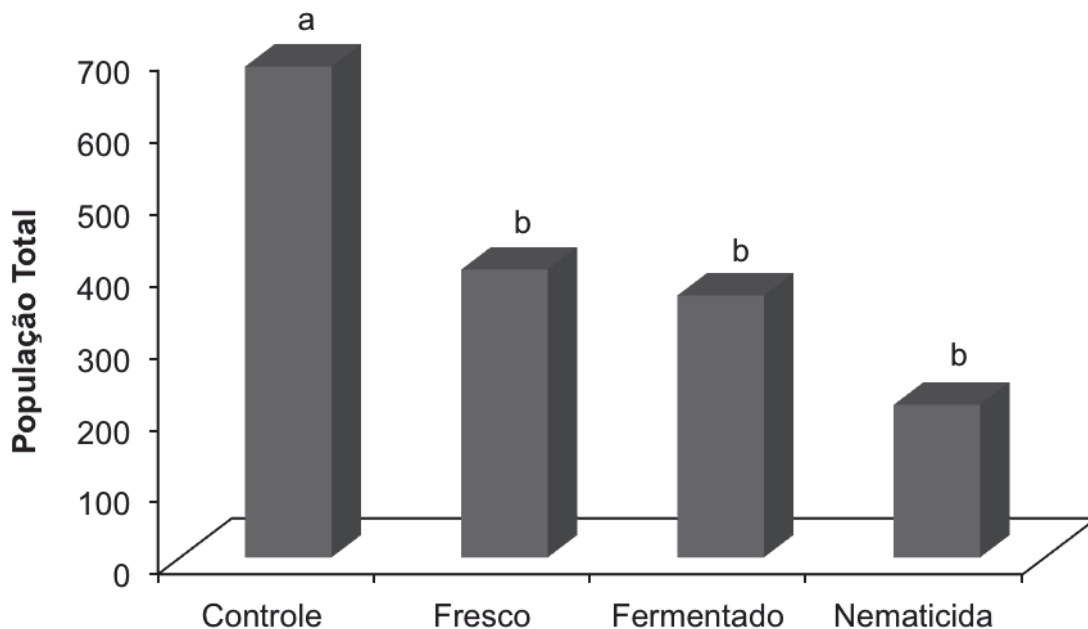
O resíduo de sisal, tanto fresco quanto fermentado, foi eficiente na redução da população total de *R. similis*. Os resultados de controle com os resíduos não



diferiram ( $p > 0,05$ ) do resultados obtidos com o nematicida. Comparando-se o controle (602,4 indivíduos) com os tratamentos em que foi utilizado o resíduo, verificou-se que houve reduções na população de 41,3 e 46,6%, respectivamente, com a utilização do resíduo fresco e fermentado (Figura 3).



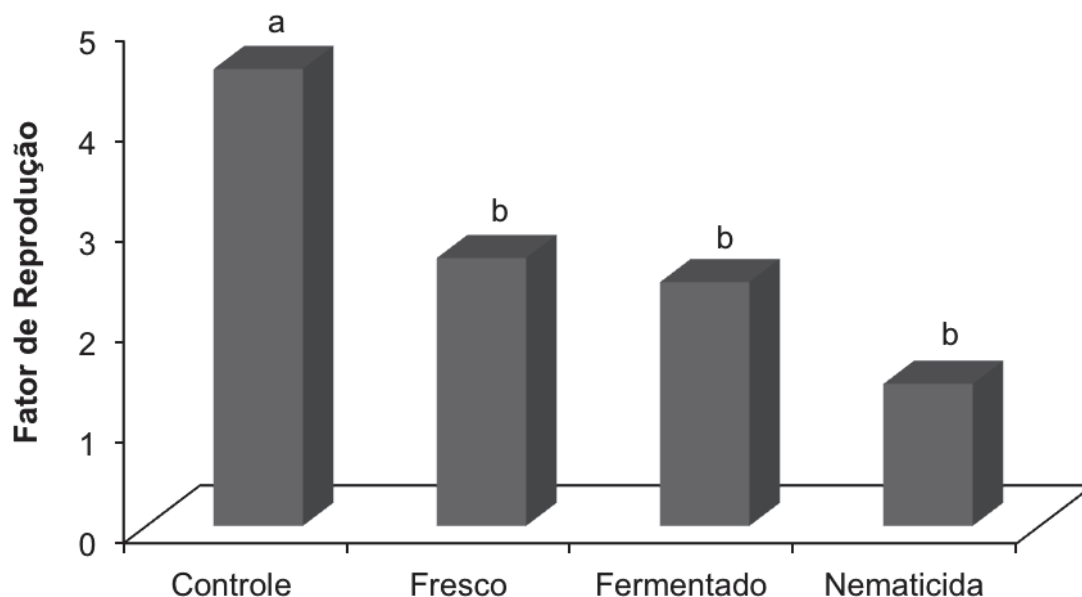
**Figura 2.** População de *Radopholus similis* no solo onde foram plantadas as mudas de bananeira inoculadas com nematoides previamente expostos aos tratamentos *in vitro*.



**Figura 3.** População total de *Radopholus similis*, cujos espécimes foram previamente expostos aos tratamentos *in vitro* e inoculadas em mudas de bananeira 'cultivar' Prata anã.

Verificou-se redução do fator de reprodução de *R. similis* com a utilização do resíduo de sisal. Reduções de 41,3 e 46,6% foram alcançadas nesta variável quando se

aplicou o resíduo fresco e fermentado, respectivamente, em comparação ao controle (Figura 4).



**Figura 4.** Fator de reprodução *Radopholus similis*, cujos espécimes foram previamente expostos aos tratamentos *in vitro* e inoculadas em mudas de bananeira 'cultivar' Prata anã.

Nota-se, ainda que não houve diferença significativa entre os tratamentos que avaliaram o uso do resíduo e do nematicida (Figura 4). Este fato evidenciou que houve uma ação residual deste subproduto orgânico nos nematoides que permaneceram viáveis após terem sido submetidos ao resíduo de sisal *in vitro*. Isto fez com que fosse inibido o restabelecimento populacional do nematoide nas dosagens testadas.

Estes resultados estão de acordo com os dados de outros autores (DOMINGUES et al., 2010; SILVEIRA et al., 2012; BOTURA et al., 2013) que obtiveram, *in vitro*, eficácia anti-helmíntica do resíduo líquido de sisal sobre ovos e larvas de nematoides gastrointestinais de ovinos e caprinos.

Diversos trabalhos com nematoides de ruminantes têm demonstrado que extratos de plantas podem interferir no desenvolvimento (MIN & HART, 2003), na mobilidade de juvenis (ALONSO-DIAZ et al., 2008) e ainda nos adultos (HOUNZANGBE-ADOTE et al., 2005).

Silveira et al. (2012), em experimento conduzido *in vitro* para avaliar a influência do resíduo líquido do sisal sobre a eclosão e o desenvolvimento de juvenis de nematoides gastrointestinais de ovinos, verificaram a existência de potencial antiparasitário. Domingues et al. (2010), em ensaios *in vitro* com extrato de sisal, verificaram redução acima de 95% na eclosão de juvenis de *Haemonchus*, um nematoide gastrointestinal.

Quintero (2010) verificou que um produto orgânico, à base de ácido glutâmico, aminoácido e saponinas, apresentou efeito letal para os nematoides expostos a sua ação, observando-se 100% de efeito nematicida.

Resultado semelhante foi observado por Olabiyi et al. (2008) que verificaram que os extratos aquosos de espinho-de-cristo (*Euphorbia hirta* L.), quebra-pedra (*Phyllanthus amarus* L.) e fedegoso (*Cassia obtusifolia* L.) a 0,15 e 0,20 g mL<sup>-1</sup>, ocasionaram até 100,0% de mortalidade de juvenis de segundo estágio de *M. incognita in vitro*. Ao realizarem análises fitoquímicas nas plantas estudadas, os autores verificaram que estas possuem taninos, flavonoides, alcaloides, esteróis e glicosídeos que podem exercer atividade nematicida.

## Conclusões

A atividade nematicida eficaz do resíduo líquido de sisal fresco e fermentado sobre *R. similis* foi demonstrada no presente trabalho. Este resíduo apresenta potencial para o desenvolvimento de produtos bioativos que podem proporcionar a geração de renda para os agricultores familiares rurais do Semiárido do Estado da Bahia.

Além disso, o desenvolvimento de nematicidas de baixo custo e com impacto ambiental reduzido proporciona a oportunidade de agregar valor aos resíduos de sisal para uso em sistemas agrícolas sustentáveis.

**Palavras-chave:** *Agave sisalana*, nematoide cavernícola, controle cultural.

## Agradecimentos

À CAPES pela concessão de bolsas de estudo.

## Referências Bibliográficas

- ALONSO-DIAZ, M. A.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; SANDOVAL-CASTRO, C. A.; CAPETILLO-LEAL, C.; BRUNET, S. HOSTE, H. Effects of four tropical tanniniferous plants extracts on the inhibition of larval migration and the exsheathment process of *Trichostrongylus colubriformis* infective stage. *Veterinary Parasitology*. v. 153, p. 197-192, 2008.
- AOUDIA, H.; NTALLI, N.; AISSANI, N.; YAHIAOUI-ZAIDI, R.; CABONI, P. Nematotoxic phenolic compounds from *Melia azedarach* against *Meloidogyne incognita*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 60, p. 11675–11680, 2012
- BARRETO, A. F.; ARAÚJO, E.; BONIFÁCIO, B. F. Eficiência de extratos de *Agave sisalana* (Perrine) sobre o ácaro rajado *Tetranychus urticae* (Koch) e ocorrência de fitotoxidez em plantas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L. r *latifolium* Hutch). *Revista Brasileira de Agroecologia* v. 5, p. 207-215, 2010.
- BOTURA, M. B.; SILVA, G. D.; LIMA, H. G.; OLIVEIRA, J. V. A.; SOUZA, T. S.; SANTOS, J. D. G.; BRANCO, A.; MOREIRA, E. L. T.; ALMEIDA, M. A. O.; BATATINA, M. J. M. *In vivo* anthelmintic activity of an aqueous extract from sisal waste (*Agave sisalana* Perr.) against gastrointestinal nematodes in goats. *Veterinary Parasitology*.v. 177, p. 104-110. 2011.

BOTURA, M. B.; SANTOS, J. D. G.; SILVA, G. D.; LIMA, H. G.; OLIVEIRA, J. V. A.; ALMEIDA, M. A. O.; BATATINHA, M. J. M.; BRANCO, A. *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of *Agave sisalana* Perr. (sisal) on gastrointestinal nematodes in goats. *Veterinary Parasitology*, v. 192, p. 211-217. 2013.

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

CONAB. Sisal – safra 2012/2013: comercialização – proposta de ações. Available in: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/pdf>. Acesso em 27 de Dezembro, 2013.

COOLEN, N. W.; D'HERDE, C. J. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. **State Agricultural Research Centre**, Belgium. 1972.

DOMINGUES, L. F.; BOTURA, M. B.; CRUZ, A. C. F.; YUKI, C. C.; SILVA, G. D.; COSTA, M. S.; MOREIRA, E. L. T.; MENESES, I. D. S.; BRANCO, A.; ALMEIDA, M. G. A. R.; ALMEIDA, M. A. O.; BATATINHA, M. J. M. Evaluation of anthelmintic activity of liquid waste of *Agave sisalana* (sisal) in goats. **Revista Brasileira de Parasitologia**. v.19, p. 270-272. 2010.

ELBADRI, G. A. A.; LEE, D. W.; PARK, J. C.; CHOO, H. Y. Nematicidal efficacy of herbal powders on *Meloidogyne incognita* (Tylenchida: Meloidogynidae) on potted watermelon. **Journal of Asia-Pacific Entomology**. v. 12, p. 37–39, 2009.

ELSEN, A.; STOFFELEN, R.; THI TUYET, N.; BAIMEY, H.; BOULOIS, H. D. de.; WAELE, D. D. *In vitro* screening for resistance to *Radopholus similis* in *Musa* spp. **Plant Science**. v. 163, p. 407- 416, 2002.

GULERIA, S.; KUMAR, A. Antifungal activity of *Agave americana* leaf extract against *Alternaria brassicae*, causal agent of *Alternaria blight* of Indian mustard (*Brassica juncea*). **Archives of phytopathology and Plant Protection**. v.42 n.4, p. 370-375, 2009.

HOUNZANGBE-ADOTE, M. S.; PAOLINI, V.; FOURASTE, I.; MOUTAIROU, K.; HOSTE, H. *In vitro* effects of four tropical plants on three life-cycle stages of the parasitic nematode, *Haemonchus contortus*. **Research in Veterinary Science**. v. 78, p. 155-160. 2005.

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for extracting nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, v. 48, p. 692. 1964.

MAI, W. F.; MULLIN, P. G. Plant-parasitic nematodes: a pictorial key to genera. **Cornell University Press**, Ithaca. 1996.

MIN, B. R.; HART, S. P. Tannin suppression internal parasites. **J. Anim Sci**. v. 81, p. 102-109. 2003.

MONTEIRO, J. M. S. Resistência a *Radopholus similis* e detecção de nematoides fitoparasitas em bananeiras Triploides e tetraploides no Brasil. **Dissertação - Mestrado** em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília - DF. 102 f. 2011.

OKA, Y.; NACAR, S.; PUTIEVSKY, E.; RAVID, U.; ZOHARA, Y.; SPIEGEL, Y. Nematicidal activity of essential oils and their components against the root nematode. **Nematology**. v. 90, p. 710-715. 2000.

OLABIYI, T. I.; OYEDUMADE, E. E. A.; IBIKUNLE, G. L.; OJO, O. A.; ADESINA, G. O.; ADELASOYE, K. A.; OGUNNIRAN, T. A. Chemical composition and bio-nematicidal potencial of some weed extracts on *Meloidogyne incognita* under laboratory conditions. **Plant Sci Res**. v. 1, p. 30-35. 2008.

QUINTERO, E. I. Q. Insumos e Indicadores Biológicos em Agrossistemas com Bananeiras. **Tese** em Ciências Ambientais e Florestais, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 120 f. 2010.

SARAH, J. L.; PINOCHET, J.; STANTON, J. The burrowing nematode of bananas, *Radopholus similis* Cobb, 1913. **Musa Pest Fact Sheet** No. 1, INIBAP, Montpellier, France, 1996.

SAS Institute SAS/STAT 9.2 User's guide. SAS Institute Inc, Cary, NC. 2008.

SEINHORST, J. W. The relationships between population increase and population density in plant-parasitic nematodes. II. Sedentary nematodes. **Nematologica**. v. 13. P. 157-171. 1967.

SILVEIRA, R. X.; CHAGAS, A. C. S.; BOTURA, M. B.; BATATINHA, M. J. M.; KATIKI, L. M.; CARVALHO, C. O.; BEVILAQUA, C. M. L.; BRANCO, A.; MACHADO, E. A. A.; BORGES, S. L.; ALMEIDA, M. A. O. Action of sisal (*Agave sisalana*, Perrine) extract in the *in vitro* development of sheep and goat gastrointestinal nematodes. **Experimental Parasitology**, v.131. p.162-168. 2012.

WEZEL, A.; CASAGRANDE, M.; CELETTE, F.; VIAN, J. F.; FERRER, A.; PEIGNÉ, J. Agroecological practices for sustainable agriculture. A review. **Agron Sustain Dev**. v. 34, p. 1-20. doi: 10.1007/s13593-013.0180-7. 2014.

**O USO DO SISAL PARA PRODUÇÃO DE ETANOL NO  
NORDESTE BRASILEIRO**



## O USO DO SISAL PARA PRODUÇÃO DE ETANOL NO NORDESTE BRASILEIRO

Pedro Alcantara da Silva Abreu<sup>1</sup>; Romeu da Silva Leite<sup>2</sup>; Vanessa França Chaves<sup>3</sup>;  
Robson Argolo dos Santos<sup>4</sup>; Marilza Neves do Nascimento<sup>5</sup>

1 Aluno do Curso de Graduação em Agronomia, bolsista FAPESB, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), email: pedro\_804@outlook.com.

2 Aluno do Curso de Graduação em Agronomia, bolsista PIBIC/CNPq, UEFS, email: leiteromeu@hotmail.com

3 Aluna do Curso de Graduação em Agronomia, bolsista FAPESB, UEFS, email: vanessafranca2011@hotmail.com.

4 Aluno do Curso de Graduação em Agronomia, bolsista FAPESB, UEFS, email: argolo.agro@gmail.com.

5 Professora Doutora do Departamento de Ciências Biológicas, UEFS, email: marilzaagro@hotmail.com

### Introdução

O sisal (*Agave sisalana* Perrine) é uma monocotiledônea, pertencente à família Agavaceae e subfamília Agavoideae Pax., sendo originária do México, mais precisamente da península de Yukatan. No Brasil, a sua introdução ocorreu na década de 90, tendo se adaptado muito bem a região do semiárido nordestino (TRELIN, 2013). Dentre as espécies cultivadas destacam-se *Agave Sisalana* Perrine, que possui como produto de maior interesse comercial a fibra extraída de sua folha e *Agave tequilana* que é utilizada na indústria para a produção de álcool.

O Brasil é o maior produtor de sisal do mundo, tendo como seus principais representantes os Estados da Bahia e Paraíba, que respondem com 97,8% da produção nacional de sisal, sendo 86,7% e 11,1%, respectivamente (OASHI, 1999).

A fibra extraída da folha de sisal é dura, resistente e muito versátil, sendo utilizada para diversos fins artesanais e industriais, tais como: Produção de sacos, bolsas, barbantes, cordas e tapetes. Podendo ser utilizados na indústria farmacêutica, bem como na fabricação de celulose para a produção de papel (SANTOS, 2011).

A partir do desfibramento também é gerado o suco do sisal, que corresponde pelo maior peso da folha em torno de 80%, sendo totalmente perdido por ser deixado nos campos sem nenhuma utilização. Pesquisas veem gerando resultados sobre a eficiência do sulco como bioinseticidas e bioenergéticos - etanol a partir de suco de sisal que é produzido no México - e da queima de mucilagem em fornalhas, gaseificação e biodigestão (RODRÍGUEZ et al. 2008). Os resultados da utilização do resíduo líquido do sisal são objetos de estudos utilizando recursos disponibilizados pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação – FAO.

Várias substâncias podem ser extraídas dos resíduos, sendo mais importante economicamente a hecogenina e o álcool. Ambas podem ser utilizadas em diferentes indústrias, da hecogenina se obtém a cortizona, que atua como um agente cicatrizante, se tornando importante para indústria farmacêutica. E o álcool é obtido através da fermentação do suco, sendo uma média de 150 folhas para produzir 60 litros de suco/álcool, que pode gerar etanol para o mercado brasileiro.

A fibra do sisal é composta por celulose, hemicelulose e lignina, que são polímeros naturais. O etanol além do resíduo também pode ser obtido a partir da fibra do sisal, o processo consiste na sacarificação da celulose de um processo contínuo de hidrólise ácida. O produto gerado sofre a fermentação através da ação de bactérias que são do gênero *Zymomonas*. Obtendo resultados de 160 litros de etanol com um total de uma tonelada de fibra de sisal (OASHI, 1999).

O incentivo para a utilização dos resíduos do sisal, o qual tem um percentual ainda baixo em torno de 5%, se torna uma nova alternativa de geração de produtos e renda para cultura que passa por uma crise pelos baixos preços oferecidos à fibra. Resultados no potencial bioenergético do sisal pode trazer de volta ao produtor a motivação necessária para investir novamente na cultura que esta em declínio de plantio.

O presente trabalho tem como objetivo geral realizar uma revisão bibliográfica para avaliar a potencialidade do uso da fibra e do resíduo do sisal para a produção do etanol, agregando valor aos resíduos que são descartados.

## **Metodologia**

Na pesquisa bibliográfica foram consultadas várias literaturas relativas ao assunto em estudo, artigos publicados na internet e que possibilitaram que este trabalho tomasse forma para ser fundamentado.

Os critérios de inclusão para os estudos encontrados foram a abordagem sobre o potencial biotecnológico da cultura do sisal na região semiárida do Nordeste Brasileiro.

## **Resultados e discussão**

Os dados referentes a produção do sisal e estimativa da potencialidade de produção de etanol a partir dos resíduos encontra-se na Tabela 1.

A produção brasileira de fibra de sisal alcançou, em 2007, 245.389 toneladas. O nordeste é a principal região produtora, sendo o estado da Bahia responsável por 95,4% da produção nacional, seguido da Paraíba, Rio Grande do Norte e Ceará, com 3,7%, 0,6% e 0,3%, respectivamente (CONAB, 2008). Esses dados mostram satisfatória disponibilidade de matéria-prima dessa região, com grande quantidade de resíduo, que pode ser utilizado para geração do etanol.

Segundo Machado (2010), fundamentando-se em Oashi (1999), estimou que a quantidade potencial de produção de etanol a partir do bagaço do sisal aumentou 23% de 2004 à 2007, aproximadamente, saindo de 10,3 milhões de litros para 12,7 milhões, no mesmo período. Foi relatado o mesmo potencial de produção do etanol a partir do suco do sisal, evidenciando que esse recurso energético poderia gerar renda para os agricultores, além de poder substituir combustíveis fósseis.

**Tabela 1.** Produção e estimativa da quantidade de resíduos gerados após o desfibramento no Nordeste do Brasil, entre os anos de 2004 a 2007.

<b>Ano</b>	<b>2004</b>	<b>2005</b>	<b>2006</b>	<b>2007</b>
<b>Quantidade de sisal produzido (toneladas)</b>	199.135	206.974	248.111	245.389
<b>Quantidade de bagaço gerado (toneladas)</b>	59.740,50	62.092,20	74.433,30	73.616,70
<b>Quantidade de suco de sisal gerado (ton.)</b>	124.459,37	129.358,75	155.069,37	153.368,12
<b>Etanol do bagaço (litros)</b>	10.355.020	10.762.648	12.901.772	12.760.228
<b>Etanol do suco de sisal (litros)</b>	11.830.735	12.296.459	14.740.433	14.578.719

**Fonte:** Dados compilados de Machado (2010).

Além da potencial produção do etanol, o suco do sisal é fonte de substâncias químicas utilizadas em produtos como bioinseticidas e energéticos para ração animal. Podem ser extraídos do suco substâncias como acetona, ácido butírico, ácido láctico, ácido málico, ácido pirolenhoso, amido, várias proteínas, pigmentos como vanilina e xantofila, compostos orgânicos como ácido oxálico e ácido cítrico além de minerais (CAMPBELL, 2007).

A celulose do sisal pode ser utilizada para a produção do bioetanol por duas características principais, a abundância de matéria-prima e seu baixo teor de lignina. De acordo com Paiza (2006), o teor de lignina é de aproximadamente 7-10%.

Para obtenção de bioetanol a partir de biomassa celulósica (etanol celulósico) é necessário se obter açúcares fermentáveis a partir dos polissacarídeos presentes (celulose e hemicelulose), o que por sua vez exige a separação destes da lignina, a qual corresponderá então a um subproduto do processo. Frollini et al. (2009), avaliando a influência da concentração de ácido sulfúrico, temperatura e pré-tratamentos da celulose de sisal, mostraram que o aumento da concentração de ácido sulfúrico e a temperatura promovem maior produção de glicose (precursora do bioetanol), sendo o processo favorecido para celulose mercerizada, aumentando em 50% a produção de glicose.

As cepas de leveduras convencionais possuem capacidade de produzir etanol em baixas condições nutricionais durante a fermentação, apresentando diferentes

rendimentos na produção de biomassa e etanol (TORIJA 2002). Pérez et al. (2013), utilizando suco de *Agave cupreata* analisaram tres cepas de leveduras em diferentes concentrações de açúcares e temperaturas, mostrando que as duas ultimas variáveis foram as que mais influenciaram na produção e porcentagem do etanol.

A produtividade de etanol a partir do sulco e da fibra do sisal é baixa por ser uma tecnologia nova, comparado ao cultivo da cana-de-açúcar difundido por quase todos os estados da união e principal fonte de extração do etanol do país.

Foram processados 425 milhões de toneladas de cana-de-açúcar no ano de 2006 gerando um total de 17 milhões de metros cúbicos de etanol (MACEDO, 2007). A produção de etanol através do sisal em 2006 correspondeu a 27.640 metros cúbicos, um valor baixo, mas por ser uma cultura concentrada em uma determinada região, pode representar mais uma fonte de renda oriunda de do sisal para a economia local que durante décadas teve como único e principal produto a fibra para produção de sacos, cordas, tapetes e demais utensílios.

## **Conclusão**

A sustentabilidade ambiental cada vez mais difundida no mundo, é uma esperança para que utilização da fibra sintética diminua, enquanto que fibra natural alavanque em utilização no mercado, levando ao aumento de resíduos de sisal e maior produção de etanol.

A produção de etanol a partir do sisal faz com que este recurso energético não atue somente como mais uma fonte de combustível na substituição dos combustíveis fósseis, mas também na geração emprego e de uma nova renda para os pequenos agricultores.

O etanol gerado tem origem de uma cultura limpa, não utilizando insumos agrícolas, que associado a uma produção durante o ano inteiro, a torna uma fonte potencial para a produção bioenergética.

## **Referências**

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Nota técnica** SUREG-RN. Informações conjunturais de sisal. RN, 2008. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/10\\_10\\_25\\_12\\_39\\_49\\_not\\_a\\_tecnica\\_sisal2008.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/10_10_25_12_39_49_not_a_tecnica_sisal2008.pdf)>. Acesso em 24 de março de 2015.

FROLLINI, E.; DE PAULA, M. P.; LACERDA, T. M. Hidrólise ácida de celulose de sisal: estudos visando obtenção de nanofibras e de bioetanol. **Anais**. Congresso Brasileiro de Polímeros. Foz do Iguaçu, PR, 2009.

MACEDO, I. C. **Situação Atual e Perspectivas do Etanol**. Estudos Avançados. vol. 21 nº 59 São Paulo. Jan./Apr. 2007.

MACHADO, A. M. C. **Potencial das biomassas disponíveis no nordeste brasileiro como fontes alternativas de geração de energia** Universidade Federal de Sergipe. Pós-Graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente. São Cristóvão, CE, 2010. Tese Mestrado

OASHI, M. C. G. **Estudo da cadeia produtiva como subsídio para pesquisa e desenvolvimento do agronegócio do sisal na Paraíba**. Universidade Federal de Santa Catarina. Pós-graduação em Engenharia de Produção. Florianópolis, SC, 1999. Tese Doutorado.

PAIVA, J. M. F. and FROLLINI, E. Unmodified and modified surface sisal fibers as reinforcement of phenolic and lignophenolic matrices composites: thermal analyses of fibers and composites. **Macromol. Mater. Eng.**, 291, 405-417, 2006.

PÉREZ, E.; GONZALEZ-HERNANDEZ, M. C.; CORTÉS-PENAGOS, C. Fermentative characterization of producers ethanol yeast from *Agave cupreata* juice in mezcal elaboration. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**. Vol. 12, No. 3, 451-461, 2013.

Rodríguez, A. L., Suárez, J. S., Horta, J. Z. J. & Jácome, A. G. Comportamento da Digestão Anaeróbica do Resíduo Líquido da Indústria de Sisal em Escala Piloto. *Revista em Agronegócio e Meio Ambiente*, v.1, n.1, p.77-86, jan/abr.2008.

SANTOS, S. L. B. **Variabilidade genética em populações de Agave sisalana Perrine (Agavaceae) detectada pela técnica Inter Simple Sequence Repeats (ISSR)**. Feira de Santana, BA. 2011.

Torija, M. M. J. **Ecología de levaduras: Selección y adaptación a fermentaciones vínicas**. Tesis de Doctorado en Bioquímica, Universidad Publica de Tarragona, España, 2002.

TRELIM. **Informações gerais sobre o sisal**. Disponível em: <<http://www.trelim.com.br/index-63.html>>. Acesso em: 24 de Março de 2015.

**POTENCIAL E UTILIZAÇÃO DE PLANTAS COM ATIVIDADE  
INSETICIDA**



## POTENCIAL E UTILIZAÇÃO DE PLANTAS COM ATIVIDADE INSETICIDA

Romeu da Silva Leite<sup>1</sup>; Pedro Alcantara da Silva Abreu<sup>2</sup>; Vanessa Chaves da França<sup>3</sup>; Robson Argolo dos Santos<sup>4</sup>; Marilza Neves do Nascimento<sup>5</sup>; Lenaldo Muniz dos Santos<sup>6</sup>

1 Aluno do Curso de Graduação em Agronomia, bolsista PIBIC/CNPq, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), email: leiteromeu@hotmail.com

2 Aluno do Curso de Graduação em Agronomia, bolsista FABESP, UEFS, email: pedro\_804@hotmail.com

3 Aluna do Curso de Graduação em Agronomia, bolsista FAPESB, UEFS, email: vanessafranca2011@hotmail.com

4 Aluno do Curso de Graduação em Agronomia, bolsista FABESP, UEFS, email: argolo.agro@gmail.com

5 Professora Doutora do Departamento de Ciências Biológicas, UEFS, email: marilzaagro@hotmail.com

6 Professor Doutor do Departamento de Ciências Biológicas, UEFS, email: lenaldo.uefs@gmail.com

### Introdução

O crescimento da população mundial promoveu o aumento de demandas de produção de alimentos cada vez mais eficientes e competitivas. Para satisfazer a essa crescente demanda, uma revolução verde, datada da década de 1960, levou a agricultura a se caracterizar como monoculturas extensivas e de grande utilização de fertilizantes químicos sintéticos e agrotóxicos (MENEZES, 2005; CORREIRA & SALGADO, 2011).

A utilização desses agroquímicos contribuíram para o aumento da produção agrícola, no entanto trouxe muitos malefícios. A falta de conhecimento ou acompanhamento técnico sobre o seu manuseio adequado, associado a utilização indiscriminada tem contribuído para o ressurgimento de pragas-alvo, aparecimento de pragas secundárias, desequilíbrio ecológico e efeitos prejudiciais ao homem (CORREIRA & SALGADO, 2011). O uso intensivo de inseticidas desencadeia um processo de pressão de seleção sobre as populações de artrópodes pragas, selecionando linhagens capazes de tolerar doses que seriam letais para a maioria da população normal (POTENZA, 2004).

A questão mundial sobre a segurança alimentar e a qualidade ambiental aumentaram a pressão pela redução do uso de agrotóxicos, resultando no desenvolvimento de pesquisas para o desenvolvimento de inseticidas botânicos. Das milhares de espécies vegetais que existem, muitas produzem substâncias que atuam como atraentes ou repelentes de outros organismos (POTENZA, 2004; SAITO, 2004). Inseticidas botânicos são compostos resultantes do metabolismo secundário das plantas que compõem a própria defesa química contra os insetos herbívoros. Dentre essas substâncias, resultantes do metabolismo secundário das

plantas, destacam-se os óleos essenciais, que são liberados ao meio ambiente em quantidade variáveis (KIM et al., 2003; CASTRO, 2004)

A utilização de inseticidas botânicos vem crescendo no Brasil, no entanto torna-se necessário o desenvolvimento de mais estudos para caracterização das plantas com potencial inseticida. O presente trabalho teve por finalidade realizar uma revisão bibliográfica sobre o potencial e utilização de plantas com atividade inseticida.

## **Metodologia**

Este trabalho é uma revisão de literatura, realizada entre fevereiro e março de 2015, no qual consultou-se a artigos científicos selecionados através de buscas em plataformas on-line de periódicos especializados de ciências agrárias. As palavras-chave utilizadas na busca foram inseticidas botânicos, metabólitos secundários e óleos essenciais.

Os critérios de inclusão para os estudos encontrados foram a abordagem sobre a descrição do uso e potencialidades de plantas como inseticida natural.

## **Resultados e discussão**

A lista dos artigos consultados nas bases de dados que versavam sobre o potencial e utilização de plantas com atividade inseticida encontra-se no Quadro 1.

As plantas possuem uma grande quantidade de substâncias responsáveis pela defesa contra herbívoros. As plantas tropicais constituem-se num grande reservatório de substâncias como alcalóides, glicosídeos cianogênicos, glicosinolatos, monoterpenos, diterpenóides, saponinas, limonóides, carotenóides, fenóis simples, flavonóides, quinonas e poliacetilenos que, naturalmente, são empregadas em defesa própria pelas plantas contra a herbivoria (POTENZA, 2004) Essas substâncias quando isoladas, são mortais ou repelentes para muitas espécies de insetos, sendo que a maioria dos monoterpenos presentes nos óleos essenciais são citotóxicos para plantas e animais (GOMES & FAVERO, 2011).

Investigações recentes confirmam que alguns óleos essenciais de plantas tem não apenas a capacidade de repelir insetos, mas apresentam também ação inseticida através do contato direto ou pelas vias respiratórias dos insetos (Tabela 01) (CORREIRA & SALGADO, 2011). Um exemplo de óleo essencial com ação inseticida é o óleo da citronela, presente em algumas plantas aromáticas, como o capim limão (*Cymbopogon citratus*, Poaceae) e o eucalipto citriodora (*Eucalyptus citriodora*), sendo utilizado para a fabricação de repelentes contra mosquitos e borrachudos (MENEZES, 2005).

Gomes & Favero (2011), avaliando óleos essenciais de plantas aromáticas com atividade inseticida, encontraram que os óleos essenciais de *Ocimum gratissimum* e *Eucalyptus urograndis* apresentaram atividade inseticida para *Triatoma infestans*, obtendo média de 5 e 15% de mortalidade, respectivamente. Castro (2004), analisando óleos essenciais de plantas de *Achillea millefolium* e *Thymus vulgaris* encontrou potencial inseticida sobre a lagarta-do-cartucho.

**Quadro 1.** Descrição dos artigos selecionados na base de dados quanto ao título e ao (s) autor (es). Feira de Santana, 2015.

TÍTULO	AUTOR (ES)
Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão.	CORRÊA & SALGADO, 2011
Avaliação de óleos essenciais de plantas aromáticas com atividade inseticida em <i>Triatoma infestans</i> (Klug, 1834) (Hemiptera: Reduviidae).	GOMES & FAVERO, 2011
Uso do Extrato Aquoso de Folhas de NIM para o Controle de <i>Spodoptera frugiperda</i> na Cultura do Milho.	VIANA et al., 2006
Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola.	MENEZES, 2005.
Atividade inseticida de óleos essenciais de <i>Achillea milleoium</i> e <i>Thymus vulgaris</i> sobre <i>Spodoptera frugiperda</i> e <i>Schizaphis graminum</i> .	CASTRO, 2004.
Produtos naturais para o controle de pragas.	POTENZA, 2004.
As plantas praguicidas: alternativa para o controle de pragas da agricultura.	SAITO, 2004
Atividade de extrato aquoso de folhas de nim ( <i>Azadirachta indica</i> ) sobre <i>Spodoptera frugiperda</i> .	PRATES et al., 2003

**Fonte:** Corrêa & Salgado (2011), Gomes, & Favero (2011), Viana et al. (2006), Menezes (2005), Castro (2004), Potenza (2004), Saito (2004), Prates et al. (2003).

Atualmente, destaca-se a planta do nim ou neem tree (*Azadirachta indica* Juss.), que vem sendo estudada quanto às suas propriedades e quanto ao potencial como inseticida natural. O nim tem mostrado acentuada atividade inseticida para várias espécies de pragas, como em *Spodoptera frugiperda*, a lagarta-do-cartucho. Pequenas quantidades de azadiractina, o principal ingrediente ativo, reduz a alimentação, retarda a ecdise, causa a mortalidade de larvas, pupas e esteriliza os adultos de várias espécies de lepidópteros (VIANA, 2006; PRATES et al., 2006).

Prates et al. (2003), avaliando a atividade inseticida do extrato aquoso das folhas do nim sobre a lagarta-do-cartucho do milho, em laboratório, demonstraram eficiência entre as concentrações 3,60 a 10,00 mg mL<sup>-1</sup>, 15 dias após infestação com larvas. Atualmente o grupo de pesquisa da Unidade Experimental Horto Florestal, da Universidade Estadual de Feira de Santana, vem utilizando extrato de nim a 1% para o controle de pulgão em cultivos de plantas do gênero *Physalis*.

A alta demanda por produtos mais saudáveis e ambientalmente sustentáveis contribuíram para o atual interesse econômico por inseticidas naturais. Estes possuem algumas vantagens, como menor desenvolvimento de resistência dos insetos aos inseticidas pelo complexo de princípios ativos presentes nas plantas; baixa toxicidade a outros insetos úteis, aves, peixes e mamíferos, incluindo o ser humano (Vieira et al., 2002; Gallo et al., 2002; SAITO & SCRAMIN, 2000).

**Tabela 1.** Atividade inseticida de compostos botânicos descrita na literatura.

<b>Composto ou espécie botânica</b>	<b>Atividade/praga/hospedeiro</b>
<i>Pisum sativum</i>	Inseticida/ <i>Sitophilus</i> sp./grãos estocados em geral
<i>Iponea carnea</i> , <i>Pedaliium nurex</i> e <i>Adhatoda vasica</i>	Inseticida/ <i>Spodoptera litura</i> /Plantas em geral
Monoterpenóides (eugenol e cinamaldeído)	Inseticida/ <i>Callosobruchus maculatus</i> (F.) e <i>Sitophilus oryzae</i> (L.)/grãos estocados em geral
<i>Lippia organoides</i> , <i>Lippia alba</i> e <i>Cymnopogon citratus</i>	Repelência / <i>Sitophilus zeamais</i> (Coleoptera: Curculionidae) / <i>Zea maiz</i>
<i>Azadirachta indica</i>	<u>Inseticida/<i>Hypothenemus hampei</i> (F.)/<i>Coffea spp.</i></u>
<i>Azadirachta indica</i>	Inseticida/ <i>Pericallia ricini</i> / <i>Ricinus communis</i>
<i>Annona coriacea</i>	Inseticida/ <i>Anagasta kuehniella</i> e <i>Corcyra cephalonica</i> /farinha e <i>Oryza sativa</i> (arroz)
<i>Sophora favescens</i>	Inseticida (antialimentar)/ <i>Coptotermes formosanus</i> /árvores e estruturas de madeira

**Fonte:** Dados compilados de Correia & Salgado (2011).

### **Conclusão**

A utilização de plantas para produção de inseticidas naturais é uma alternativa eficiente para substituição de agroquímicos em culturas e pragas específicas. A descrição e eficiência de óleos essenciais é largamente estudada por grupos de pesquisas, existindo materiais promissores, no entanto é necessário mais estudos sobre a ação e fitotoxicidade desses materiais.

## Referências

- CASTRO, D. P. **Atividade inseticida de óleos essenciais de *Achillea milleoium* e *Thymus vulgaris* sobre *Spodoptera frugiperda* e *Schizaphis graminum***. Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2004. Dissertação mestrado.
- CORRÊA, J.C.R. & SALGADO, H.R.N Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.13, n.4, p.500-506, 2011.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba, FEALQ, 2002. v. 10. 920p.
- GOMES, S. P. & FAVERO, S. Avaliação de óleos essenciais de plantas aromáticas com atividade inseticida em *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera: Reduviidae). **Acta Scientiarum**. Health Sciences Maringá, v. 33, n. 2, p. 147-151, 2011.
- KIM, S.I. et al. Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. **Journal of Stored Products Research**, v.39, p.293-303, 2003.
- MENEZES, E.L.A. **Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola**. Seropédica, Rio de Janeiro: Embrapa Agrobiologia, 2005. 58p
- PRATES, H. T.; VIANA, P. A.; WAQUIL, J. M.. Atividade de extrato aquoso de folhas de nim (*Azadirachta indica*) sobre *Spodoptera frugiperda*. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 38, n. 3, p. 437-439, mar. 2003
- POTENZA, M. R. Produtos naturais para o controle de pragas. In: X Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico. **Anais**. Mococa, 2004. - SP , 19 de outubro de 2004.
- SAITO, M. L.; SCRAMIN, S. **Plantas aromáticas e seu uso na agricultura**. Jaguariúna, SP: EMBRAPA Meio Ambiente/Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 2000. 45 p.
- SAITO, M. L. **As plantas praguicidas: alternativa para o controle de pragas da agricultura**. Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna, 2004.
- VIANA, P.A.; PRATES, H. T.; RIBEIRO, P. E. A. Uso do Extrato Aquoso de Folhas de NIM para o Controle de *Spodoptera frugiperda* na Cultura do Milho. **Circular Técnica**, EMBRAPA. Sete Lagoas, Mg. 2006
- VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J.B.; ANDREI, C.C. Plantas Inseticidas In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4. ed. Porto Alegre, RS: Ed. da UFSC, 2002. 833 p.

**POTENCIALIDADE DE *Trichoderma* spp. EM PROMOVER O  
CRESCIMENTO DE TOMATEIRO E CONTROLAR *Meloidogyne*  
*incógnita***



## POTENCIALIDADE DE *Trichoderma* spp. EM PROMOVER O CRESCIMENTO DE TOMATEIRO E CONTROLAR *Meloidogyne incognita*<sup>1</sup>

Juliana Fernandes dos Santos<sup>2</sup>, Maria Celizia Silva dos Reis<sup>3</sup>, Tamires dos Santos Santana<sup>3</sup>, Marcelly Santana Mascarenhas<sup>4</sup>, Jorge Teodoro de Souza<sup>5</sup>, Ana Cristina Fermino Soares<sup>6</sup>

<sup>1</sup> - Pesquisa desenvolvida no Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas (CCAAB) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), faz parte da tese de doutorado da primeira autora; <sup>2</sup> - Aluno do curso de doutorado em Ciências Agrárias da UFRB, bolsista CAPES, [agr.fernandes1@hotmail.com](mailto:agr.fernandes1@hotmail.com); <sup>3</sup> - Aluna do curso bacharelado em biologia, UFRB, [mar.cely1@hotmail.com](mailto:mar.cely1@hotmail.com), [thamires\\_santana@hotmail.com](mailto:thamires_santana@hotmail.com); <sup>4</sup> - Aluna do curso de mestrado em Microbiologia Agrícola, UFRB, bolsista CAPES, [marcelly.bio@hotmail.com](mailto:marcelly.bio@hotmail.com); <sup>5</sup> - Professor do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, orientador, [jgeteodoro@gmail.com](mailto:jgeteodoro@gmail.com); <sup>6</sup> - Professora do CCAAB da UFRB, co-orientadora, [ferminosoaes@gmail.com](mailto:ferminosoaes@gmail.com)

### Introdução

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*), originário da região Andina e pertencente à família Solanaceae, é uma hortaliça consumida em todo o mundo, devido à sua multiplicidade de uso na alimentação humana, com ativa participação na cadeia comercial (ALVARENGA, 2004). Mundialmente, a cultura do tomate ocupa a segunda posição em volume de produção e o fruto pode ser consumido tanto fresco quanto processado, na forma de molhos, sucos, geleias, entre outros (FILGUEIRA, 2003).

No ano de 2012, o Brasil ocupou a oitava posição mundial na produção de tomate, com produtividade estimada de 58,712 t/ha e em uma área de 65,621 mil ha (IBGE, 2014). No entanto, vários fatores competem para o decréscimo da produção de tomate no Brasil, entre eles, os fitonematoides, que durante o processo de alimentação e reprodução, causam perdas econômicas significativas à cultura do tomateiro (FERRAZ & MONTEIRO, 1995; SILVA et al., 2004).

No Brasil, existem 43 espécies de fitonematoides associados ao tomateiro. As espécies pertencentes ao gênero *Meloidogyne*, conhecidas como nematoides das galhas, por causarem engrossamento das raízes nos locais onde as fêmeas formam o sítio de alimentação, são consideradas as mais importantes, pelos danos causados e pela dificuldade de controle. Além disso, este gênero possui ampla distribuição geográfica e apresenta extensa gama de hospedeiros, incluindo diversas culturas de importância econômica, como feijão, inhame, batata, alface, melão, beterraba, abóbora e cenoura (PIO-RIBEIRO & ASSIS FILHO, 2005).

Quando infectados pelos nematoides das galhas, os tomateiros apresentam redução do tamanho e da eficiência do sistema radicular (CANTU et al., 2009; ZAMBIASI & BELOT, 2010), folhas reduzidas e amareladas, intensa murcha nas horas mais quentes do dia, em consequência da abundante formação de galhas nas raízes, prejudicando a

absorção de água e nutrientes (CHARCHAR & LOPES, 2005; DAMASCENO, 2014). Em situações de elevada infestação de nematoides no solo, no início da implantação da cultura, pode ocorrer a morte de plantas no campo e nas plantas sobreviventes, a produção é fortemente afetada em quantidade e qualidade (Alvarenga, 2004).

Além dos danos causados diretamente pelo parasitismo nas raízes, os nematoides facilitam a penetração de fungos e bactérias danificando ainda mais a planta (Lordello, 1992).

A tentativa de manejo de nematoides geralmente é realizada com o uso de nematicidas. Porém, este método tem apresentado problemas de uso inadequado, biodegradação dos princípios ativos no solo, contaminação de pessoas durante a aplicação, além do impacto ambiental, ocasionado pela morte de animais e poluição do meio ambiente (GUIMARÃES, 2011).

Entre as alternativas para a redução do uso de agrotóxicos, o controle biológico tem se apresentado eficiente por minimizar os problemas com contaminação ambiental e ser mais vantajoso economicamente, comparado aos métodos químicos convencionais (COIMBRA & CAMPOS, 2005; BETTIOL & MORANDI, 2009).

O controle biológico pode ser definido como a redução da população de determinado patógeno pela ação de outro organismo, por meio de antibiose, parasitismo, predação, competição ou hipovirulência (VENZON et al., 2005), e visa manter, por meio de certas práticas, o equilíbrio no agroecossistema, de modo que o hospedeiro, na presença do patógeno, não sofra danos significativos (BETTIOL & MORANDI, 2009).

Entre os micro-organismos utilizados no controle biológico, encontram-se os fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma*, devido à alta capacidade reprodutiva, sobrevivência em condições ambientais não favoráveis, eficiência na utilização de nutrientes e agressividade contra micro-organismos fitopatogênicos (BENÍTEZ et al., 2004). Estes podem agir de forma indireta no controle, competindo por espaço e nutrientes, modificando as condições ambientais, promovendo crescimento de plantas, ativando mecanismos de defesa de plantas, produzindo antibióticos e inativando as enzimas do patógeno ou, diretamente, mediante o micoparasitismo. Enzimas capazes de degradar a cutícula de nematoides, tais como quitinase, parecem ter importante papel na ação antagônica (RAJENDIRAN et al., 2010).

*Trichoderma* spp. também têm sido relatados como promotores de crescimento de plantas por meio de mecanismos como produção de fitohormônios, a exemplo do ácido indolacético (WAHID et al., 2007), citocinina, giberilina (ALTOMARE et al., 1999), que estimulam a germinação e desenvolvimento das plantas, atividade solubilizadora de fosfato (VALENCIA et al., 2007) e decomposição de matéria orgânica, disponibilizando nutrientes para as plantas (GODES, 2007). Diversos trabalhos demonstram o potencial que esses fungos possuem para a decomposição de xenobióticos. O fungo *Trichoderma harzianum* é capaz de degradar compostos clorofenólicos, incluindo pesticidas como o Glifosato, DDT, Dieldrin, Endosulfan, entre outros (KATAYAMA & MATSUMURA, 1993).

Neste contexto, o trabalho teve como objetivo estudar a promoção de crescimento de tomateiro e o controle de *M. incognita* com fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma*.

## Metodologia

Obtenção dos isolados de *Trichoderma* spp.

Os cinco isolados de *Trichoderma*, pertencentes à coleção de micro-organismos do Laboratório de Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, foram multiplicados em meio de cultura BDA 1/5 (Batata Dextrose Agar com o teor de nutrientes diluído para 1/5 com água), a temperatura ambiente ( $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), por sete dias.

O inóculo de *Trichoderma* spp. foi produzido por raspagem com água destilada esterilizada e alça de Drigalsky, dos conídios da superfície das placas de Petri contendo os isolados fúngicos. Em seguida, a concentração de conídios foi ajustada para  $10^7$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ , por meio contagem em câmara de Neubauer, sob microscópio ótico.

Obtenção de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita*

Raízes de tomateiro cv. Santa Cruz Kada, cultivado em casa de vegetação, inoculadas com *M. incognita*, foram lavadas e trituradas em liquidificador por 20 segundos com uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, seguindo-se a técnica de Hussey e Barker (1973), modificada por Boneti e Ferraz (1981). Em seguida, a suspensão de raízes trituradas foi transferida para um conjunto de peneiras, constituído por uma peneira superior de 200 mesh e uma peneira inferior de 500 mesh. O material retido na peneira inferior foi transferido para câmara de eclosão preparada numa placa de Petri com tela de 35 mesh e papel toalha poroso. A suspensão de juvenis foi calibrada em câmara de contagem de Peters sob microscópio estereoscópio.

Microbiolização das sementes de tomateiro com *Trichoderma* spp. e manejo do experimento

Em câmara de fluxo laminar, as sementes de tomate foram desinfestadas em álcool 70% por um minuto, hipoclorito 1% por um minuto, seguindo de seis lavagens em água destilada e esterilizada. Posteriormente, foram tratadas por imersão em suspensão de conídios de *Trichoderma* spp., contendo  $10^7$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ , por um período de 15 min. Em seguida, as sementes foram colocadas para germinar em sacos de polietileno contendo aproximadamente 3 L de substrato, composto por solo e areia lavada esterilizados, na proporção 1:1.

Quinze dias após a germinação, aplicou-se uma alíquota de 50 ml de cada tratamento (suspensão de esporos de *Trichoderma* spp. na concentração de  $10^7$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ) no solo próximo ao caule de cada planta.

No dia seguinte, as plantas que seriam utilizadas para o estudo de controle de

nematoides, foram inoculadas com 1.000 juvenis de *M. incognita*.

No tratamento controle, as sementes foram imersas em água destilada e esterilizada pelo mesmo período. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, no campo experimental da UFRB, e irrigadas diariamente.

Aos 55 dias após a germinação, avaliou-se a altura das plantas, com uma trena e diâmetro do caule a 1 cm da base, com um paquímetro. Realizou-se a coleta das plantas, separando-se a parte aérea das raízes, sendo estas lavadas em água corrente. Pesou-se a massa fresca da parte aérea e das raízes e ambas as partes vegetativas foram colocadas em estufa com ventilação forçada à 65°C até obtenção da massa constante. Após secagem em estufa, determinou-se o peso da matéria seca da parte aérea e das raízes em balança analítica.

Para visualização das massas de ovos de nematoides, as plantas que foram utilizadas para o estudo de biocontrole, tiveram suas raízes lavadas e colocadas em béquer contendo a solução de corante alimentício artificial à 1% e deixadas por 15 minutos à temperatura ambiente. As raízes foram retiradas da solução, deixadas em béquer contendo água por mais 10 minutos e transferidas para papel toalha por 15 minutos, para remover o excesso de água. Depois, procedeu-se a contabilização, à olho nu, de massa de ovos e número de galhas de nematoides.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento. Para atender as pressuposições da análise de variância (ANAVA), os dados de massa de ovos e número de galhas de nematoides foram transformados utilizando a fórmula  $\log x+1$ . Os dados foram submetidos à ANAVA e as médias comparadas pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2000).

## Resultados e discussão

Os isolados de *Trichoderma* codificados como FA02 e ALF70 (*Trichoderma viride*), foram capazes de incrementar a massa fresca da parte aérea e o diâmetro do caule dos tomateiros em 2,5 e 7,6%, respectivamente, em relação às plantas testemunhas, que tiveram suas sementes embebidas apenas em água. O isolado codificado como FA555 possibilitou incremento de 14% na massa fresca das raízes dos tomateiros em relação ao tratamento testemunha (Tabela 1).

Tabela 1. Médias de massa fresca da parte aérea (MFPA), diâmetro de caule (DC), massa fresca de raízes (MFR) e massa de ovos (MO) por grama de raízes de tomateiros.

Tratamentos	MFPA (g)*	DC (cm)*	MFR (g)*	MO/ g de raiz**
Testemunha	7,8 b	3,4 b	7,2 b	27,9 b
172K	7,6 b	3,8 b	5,7 b	22,7 a
FA555	7,7 b	3,6 b	8,2 a	20,6 a
FA01	7,9 b	3,6 b	7,2 b	23,5 a

FA02	8 a	4,6 a	6,8 b	27,9 b
ALF70	8,4 a	4,4 a	6,6 b	26,0 b
CV (%)	7,4	9,5	4,2	3,6

\*- significativo a 1%, \*\*- significativo a 5%; Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scoot-knott.

O potencial de *Trichoderma* spp. na disponibilização de nutrientes na rizosfera e a absorção de tais nutrientes pelas raízes das plantas pode promover a redução da necessidade de adubações e utilização de pesticidas no cultivo de espécies vegetais de importância econômica, visto que as plantas estão melhor nutridas.

Tabet & linchtenstein (1976) demonstraram a capacidade de *Trichoderma viride* em transformar o inseticida photodieldrin em compostos não tóxicos e solúveis em água. Benitez et al. (2004) discutiram que isolados de *Tricoderma* estimulam o crescimento de plantas de interesse econômico, tais como tomateiro, plantas de fumo e algodoeiro e ao mesmo tempo protege contra patógenos.

Os isolados de *Trichoderma* 172K e FA555 promoveram a redução no número de massa de ovos de nematoides por grama de raiz de tomateiro em 18,6 e 26%, respectivamente.

No interior das raízes, as fêmeas tornam-se sedentárias, depositando seus ovos para o exterior da raiz, envoltos numa matriz gelatinosa que os mantém agregados. Os ovos constituem as estruturas de sobrevivência dos nematoides, até que encontrem condições ideais para eclodirem e/ou até a planta hospedeira se torne presente (FERREIRA et al., 2008; KARSSSEN & MOENS, 2006).

Dessa forma, os isolados de *Trichoderma* conseguem afetar a fonte primária de inóculo, quebrando o ciclo de vida dos nematoides e evitando novas infecções. Esses dados sugerem que tais isolados fúngicos podem ser utilizados no manejo de *M. incognita*.

Diversos autores relatam que a ação tóxica da decomposição da matéria orgânica por micro-organismos, a exemplo daqueles pertencentes ao gênero *Trichoderma*, pode estar relacionada com a produção e liberação da quitinase. A quitinase promove o rompimento da camada de proteção dos ovos dos nematoides, resultando na eclosão prematura do estágio juvenil (MIAN & RODRIGUEZ-KABANA, 1982; STIRLING, 1991; RITZINGER & FANCELLI, 2006). Apesar de o principal modo de ação de *Trichoderma* spp. para controlar nematoides, ser a produção de compostos tóxicos, existem vários relatos de parasitismo de ovos de fitonematóides por esse gênero de fungo (SPIEGEL & CHET, 1998; SHARON et al., 2001; EAPEN et al., 2005)

## Conclusões

Os isolados de *Trichoderma* FA02, ALF70 e FA555 possuem potencialidade para serem utilizados como promotores de crescimento de tomateiro, enquanto os isolados 172K e FA555 podem atuar no manejo de *Meloidogyne incognita*. No entanto, pesquisas futuras devem ser realizadas para avaliar tais isolados fúngicos em diversas situações

de campo e entender/elucidar os mecanismos de ação destes fungos para promover o crescimento vegetativo e o controle do patógeno.

#### Palavras-chaves

Microrganismos benéficos, nematoides, biocontrole, promoção de crescimento, fungos

#### Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da UFRB pela oportunidade de desenvolver a pesquisa e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

#### Referências bibliográficas

ALTOMARE, C. et al. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai. **Applied and Environment Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 2926-2933, 1999.

ALVARENGA, M. A. R. **Tomate: produção em campo, casa-de-vegetação e em hidroponia**. Lavras: UFLA. 2004. 400p.

BENÍTEZ, T. et al. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v. 7, v. 249-260, 2004.

BETTIOL, W.; MORANDI, M, A, B. **Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil**. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M, A, B.(Eds) Biocontrole de Doenças de plantas: usos e perspectivas. Embrapa, 2009, 341p.

BONETTI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificações do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua*, em raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, p. 533, 1981.

CANTU, R.R. et al. Reação de porta-enxertos comerciais de tomateiro a *Meloidogyne mayaguensis*. **Summa Phytopathologica**, v. 35, p. 216-218, 2009.

CHARCHAR, J. M.; LOPES, C. A. Nematóides. In: LOPES, C. A.; AVILA, A. C. Doenças do tomateiro. Embrapa hortaliças: Brasília, 2005.p. 96-100.

COIMBRA, J. L.; CAMPOS, V. P. Efeito de exsudatos de colônias e de filtrados de culturas de actinobactérias na eclosão, motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio de *M. javanica*. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.232-238, 2005.

GUIMARÃES, C. P. **Controle de fitonematoides na cultura da bananeira no Norte de Minas Gerais**. 2011, 90 f. Mestrado (Produção Vegetal no Semiarido), Unimontes,



Minas Gerais, 2011.

DAMASCENO, J. C. A. ***Streptomyces* ssp. e resíduo de sisal no crescimento do tomateiro e controle de *Meloidogyne javanica***. 2014, 136 F. Doutorado (Ciências Agrárias), Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Bahia, 2014

EAPEN, S. J. et al. Tropical soil microflora of spice-based cropping systems as potential antagonists of root-knot nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.88, p.218-225, 2005.

FERRAZ, L. C. C. B.; MONTEIRO, A. R. *Nematoides*. IN: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H., AMORIN, L. **Manual de fitopatologia volume 1: princípios e conceitos**. 3 ed. São Paulo: Ceres, p.168-201, 1995.

FERREIRA et al. Parasitismo de ovos de *Meloidogyne exigua* por fungos nematófagos e estudo da compatibilidade entre os isolados fúngicos. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, V. 2, N. 3, p. 15, 2008

FERREIRA, D. F. 2011. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p.1039-1042, 2011.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2 ed. Viçosa: UFV, 2003. p.340-345.

GUIMARÃES, C. P. **Controle de fitonematoides na cultura da bananeira no Norte de Minas Gerais**. 2011, 90 f. Mestrado (Produção Vegetal no Semiarido), Unimontes, Minas Gerais, 2011.

GODES, A. Perspectivas de los inoculantes fúngicos en Argentina. En: IZAGUIRRE-MAYORAL, M. L.; LABANDERA, C.; SANJUÁN, J. (Eds.). **Biofertilizantes en Iberoamérica: una visión técnica, científica y empresarial**. Imprenta Denad Internacional, Montevideo, p. 11-14, 2007.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <[http://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/Levantamento\\_Sistematico\\_da\\_Producao\\_Agricola\\_\[mensal\]/Fasciculo/2013/lspa\\_201308.pdf](http://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/2013/lspa_201308.pdf)>. Acesso em 22 de Agosto 2014.

KARSSSEN, G.; MOENS, M. Root-knot nematodes. In: PERRY, R. N.; MOENS, M. (Eds.). *Plant nematology*. Wallingford, UK: CAB International, 2006. p. 59-90.

KATAYAMA, A.; MATSUMURA, F. Degradation of organochlorine pesticides, particularly endosulfan, by *Trichoderma harzianum*. **Environmental and Toxicological Chemistry**, v.12, p.1059-1065, 1993.

LORDELLO, L. G. E. *Nematoides das plantas cultivadas*. 8. ed. São Paulo: Nobel, 1992. 314 p.

- MIAN, I. H.; RODRIGUEZ-KÁBANA, R. Organic amendments with tannin and phenolic contents for control of *Meloidogyne arenaria* in infested soil. **Nematropica**, v. 12, p. 221-234, 1982.
- PIO-RIBEIRO, G.; ASSIS FILHO, F. M. Doenças do caupi (*Vigna unguiculata* L.) Walp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; FILHO, A.B.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2, p.215-222.
- RAJENDIRAN, R. et al. *In vitro* assessment of antagonistic activity of *Trichoderma viride* against post harvest pathogens. **Journal of Agricultural Technology**, v.6, n.1, p. 31-35, 2010.
- RITZINGER, C. H. S. P.; FANCELLI, M. Manejo integrado de nematóides na cultura da bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, p. 331-338, 2006.
- SHARON, E. et al. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, v.91, p.687-693, 2001.
- SILVA, L. H. C. P. et al. Aumento da resistência de cultivares de tomate a *Meloidogyne incognita* com aplicações do Acibenzolar-S-Metil. **Nematologia Brasileira**, v. 28. p.199-206, 2004.
- SPIEGEL, Y.; CHET, I. Evaluation of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent against soilborne fungi and plant-parasitic nematodes in Israel. **Integrated Pest Management Reviews**, v.3, p.169-175, 1998.
- STIRLING, G. R. Biological control of plant-parasitic nematodes. **Wallingford: CAB International**, 1991. 282p.
- TABET, J. C; LICHTENSTEIN, E. P., Degradation of [14C]photodieldrin by *Trichoderma viride* as affected by other insecticides. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 22, p. 1345, 1976.
- VALENCIA, H. et al. **Microorganismos solubilizadores de fosfatos y bacterias fijadoras de nitrógeno en páramos y región cálida tropical**. p. 169-183, 2007.
- VENZON, M. et al. Controle alternativo de pragas e doenças. Viçosa: UFV, 2005.
- WAHID, O. A. A. et al. Enhancement of plant growth through implementation of different *Trichoderma* species. **Proceeding of the Second Scientific Environmental Confer**, 43-59, 2007.
- ZAMBIASI, T.; BELOT, J. L. Proteção integrada. **Revista Cultivar**, p. 10, 2010. (Caderno Especial Pragas).

**PRODUÇÃO DE BIOMASSA E ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia thymoides* Mart. & Schauer EM CONDIÇÕES DE CULTIVO NO SEMIÁRIDO BAIANO**

# PRODUÇÃO DE BIOMASSA E ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia thymoides* Mart. & Schauer EM CONDIÇÕES DE CULTIVO NO SEMIÁRIDO BAIANO

BISPO, L. P.<sup>1</sup>; OLIVEIRA, L. M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Aluno do curso de doutorado em Recursos Genéticos Vegetais, bolsista CAPES, luma.pb@hotmail.com; <sup>2</sup>Professor Doutor do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Orientador, lenaldo.uefs@gmail.com.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Lippia* (Verbenaceae) possui cerca de 200 espécies, sendo que o Brasil é o país mais representativo, com cerca de 75% das espécies conhecidas e, destas, aproximadamente 35% estão presentes na região semiárida do país, em área predominantemente de Caatinga (VICCINI, 2006; GIULIETTI et al., 2006). Entretanto, muitas espécies do gênero ao menos passaram por estudos de caracterização e/ou domesticação, a exemplo de *Lippia thymoides* Mart. & Schauer, que é uma espécie medicinal e aromática nativa do Brasil e endêmica dos estados da Bahia e Minas Gerais, sendo encontrada em domínios fitogeográficos da Caatinga e Cerrado (SALIMENA; MULGURA, 2015). Popularmente conhecida como alecrim do mato ou alecrim do campo, as folhas e ramos desta espécie são utilizadas como banho para o tratamento de infecções na pele e como antipiréticas no tratamento da bronquite e reumatismo, com ação comprovada na literatura científica (FUNCH et al., 2004; SILVA, 2012).

A maioria dos estudos biológicos com *L. thymoides* estão concentrados nas análises dos seus óleos essenciais, extratos vegetais e nas suas atividades: antimicrobiana, antimalárica, espasmolítica, sedativa, hipotensiva e antiinflamatória. Estas atividades são atribuídas aos terpenoides, principalmente monoterpenos e sesquiterpenos, presentes nos óleos essenciais das espécies de *Lippia*, sendo o limoneno,  $\beta$ -cariofileno,  $p$ -cimeno, cânfora, linalol,  $\alpha$ -pineno e timol os componentes mais encontrados (PASCUAL et al., 2001). Os óleos essenciais são líquidos voláteis, de aparência oleosa, dotados de aroma forte e quase sempre agradável, proveniente do metabolismo secundário das plantas (SILVA; CASALI, 2000), com grande utilização nas indústrias de medicamentos, perfumaria, cosméticos, produtos de limpeza e alimentos.

No entanto, a matéria prima, que tem como fonte as plantas medicinais, tem sido obtida, na maioria dos casos, a partir do extrativismo, o que tem promovido uma rápida erosão genética desses recursos, com muitas espécies já constando em listas de extinção (SALIMENA et al., 2013). Essa forma de exploração tem sido considerada ainda o principal responsável pela baixa qualidade dos óleos essenciais produzidos no país. Assim, o desenvolvimento de técnicas de cultivo, colheita e pós-colheita é algo urgente, sob risco de perda de genótipos promissores (EHLERT et al., 2013).

Embora o teor dos metabólitos secundários nos tecidos seja controlado geneticamente, a qualidade e a concentração desses compostos variam acentuadamente em função das condições ambientais e técnicas de cultivo, sendo que os resultados nem sempre são uniformes (CASTRO et al., 2002; GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Nesse sentido, a nutrição de plantas e a época de colheita

são aspectos relevantes na produção de óleo essencial, podendo influenciar diretamente ou indiretamente na produção desses compostos. Dentre os insumos que maximizam a produção das culturas a adubação é o principal responsável pela elevação da produtividade e qualidade dos produtos obtidos, podendo desencadear efeitos positivos e negativos, demonstrados em diversas espécies de plantas medicinais (SODRÉ et al., 2013; LUZ et al., 2014; OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2005). Além da adubação, a época de colheita afeta diretamente o conteúdo e a qualidade dos óleos essenciais, visto que esses constituintes ativos não são constantes ao longo do ano, podendo apresentar inclusive variações ao longo do dia (EHLERT et al., 2013; GOBBO-NETO; LOPES, 2007; MEIRA, et al., 2011).

Na literatura são escassos trabalhos que avaliem o teor e rendimento dos óleos essenciais de espécies nativas de *Lippia* em condições de cultivo (OLIVEIRA, 2014; SILVA, 2012). Para *Lippia citriodora*, Souza et al. (2010) verificaram que a época de colheita não influenciou a produção de biomassa fresca e seca, ao contrário da adubação com esterco, no entanto, isso não refletiu em maior rendimento de óleo essencial. Assim, a seleção de espécies e genótipos de maior potencial de cultivo e maior produtividade dos compostos bioativos, aliados ao desenvolvimento de sistemas de colheita e processamento são necessários para o desenvolvimento de sistemas de produção sustentáveis e eficientes.

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar o desenvolvimento das plantas, teor e rendimento do óleo essencial de *L. thymoides* sob diferentes épocas de colheita e formas de adubação, nas condições edafoclimáticas de Feira de Santana, BA, Brasil.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Local do cultivo**

O experimento foi desenvolvido no período de setembro de 2013 a dezembro de 2014 na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana - Bahia, Brasil, localizada a 257 metros de altitude, latitude de 12°16'00" Sul e longitude de 38°58'00" Oeste, com médias anuais de 848mm de precipitação e 24°C de temperatura.

### **Cultivo e adubação**

Foram utilizadas plantas pertencentes a coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas do Horto Florestal da UEFS. A espécie foi identificada pelo Herbário da mesma instituição (HUEFS), onde a exsicata encontra-se depositada (Voucher número 77554). As plantas foram propagadas a partir de estacas apicais cultivadas em bandejas de poliestireno expandido contendo 200 células, preenchidas com substrato comercial Biomix® e mantidas em casa de vegetação sob nebulização intermitente (nebulização a cada hora com duração de quatro minutos). Após 60 dias de cultivo as mudas foram transferidas para copos plásticos de 200 mL contendo o mesmo substrato, sendo mantidas em casa de vegetação com cobertura plástica transparente, com 75 % de luminosidade, nas mesmas condições de irrigação, por um período total de 90 dias. Posteriormente, as mudas foram transplantadas para a área experimental, com plantio direto em covas com 15 x 15 x 15cm de dimensão.

O experimento foi instalado em blocos inteiramente casualizados, em arranjo fatorial 3 x 2, sendo 3 formas de adubação (esterco bovino, esterco bovino + NPK (10:10:10) e testemunha, sem adubação) e 2 épocas de colheita (210 e 360 dias após o plantio), com quatro repetições e quatro plantas por parcela, em espaçamento de 1 m entre linhas, 0,8 m entre plantas na linha e 1,5 m entre blocos.

Com base na análise química do solo (Tabela 1) foi definido o quantitativo dos fertilizantes, utilizando-se 500 g de esterco bovino por cova para a adubação orgânica, e 500 g de esterco bovino mais 48 g por planta de fertilizante NPK (10:10:10) por cova para adubação orgânica/mineral. A aplicação de NPK foi dividida em duas aplicações (50 e 130 dias após o plantio). No segundo período de cultivo foram utilizados os mesmos tratamentos, porém o esterco bovino foi aplicado na proporção de 1000 g por cova e a aplicação de NPK foi realizada em duas épocas (90 e 125 dias após a poda). O esterco bovino utilizado apresentou a seguinte composição química: pH em água - 7,50; P - 2,02 g.kg<sup>-1</sup>; K - 1,50 g.kg<sup>-1</sup>; Ca - 6,20 g.kg<sup>-1</sup>; Mg - 3,70 g.kg<sup>-1</sup>; N - 6,96 g.kg<sup>-1</sup>; S - 2,89 g.kg<sup>-1</sup>.

A primeira colheita foi realizada aos 210 dias após o transplante das mudas para o campo, correspondendo ao mês de julho, e a segunda colheita (rebrotas) aos 150 dias após a primeira colheita, ocorrendo ao mês de dezembro, perfazendo dois ciclos de cultivo em um total de 360 dias. As duas colheitas foram feitas através do corte dos ramos inteiros das plantas, a 15 cm do solo, conforme metodologia sugerido por FIGUEIREDO et al. (2009). Os caracteres avaliados foram altura da planta (m), determinada com o auxílio de uma trena graduada; diâmetro do colo (mm), determinado por um paquímetro digital; volume da copa da planta (m<sup>3</sup>), determinado com trena graduada e estimando-se o volume pela fórmula de Mendel (1956):  $V = \frac{2}{3} \cdot \pi \cdot R^2 \cdot H$ , onde: V = volume da copa; R = raio médio e H = altura da copa; e a biomassa fresca e seca das folhas, inflorescências e caule (g). Para análise da biomassa seca, sendo que as plantas foram separadas em caule e folhas mais inflorescências, e posteriormente levadas à estufa de circulação forçada de ar a 60°C até peso constante.

**Tabela 1** - Análise química do solo da área experimental do Horto Florestal da UEFS, município de Feira de Santana-BA.

pH	P	K	Ca+Mg	Ca	Mg	Al	H+Al	Na	S	CTC	V
em água	mg/dm <sup>3</sup>	Cmol/dm <sup>3</sup>								%	
6,0	17	0,19	6,0	4,7	1,3	0,00	3,52	0,04	6,23	9,75	64

\*Análise realizada no Laboratório de Solos e Nutrição de Plantas da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Cruz das Almas-B

### Extração do óleo essencial

Para a extração dos óleos, 100g de folhas secas de cada tratamento foram trituradas em liquidificador com água destilada e, em seguida, adicionadas em balão de vidro contendo água destilada em volume suficiente para cobertura total do material vegetal. O método de extração foi por hidrodestilação utilizando-se o aparelho de Clevenger, acoplados em balões de vidro, que foram aquecidos por



mantas térmicas elétricas com termostato. A extração foi conduzida durante 3 horas, contadas a partir da condensação da primeira gota, sendo verificado o volume de óleo extraído na coluna graduada do aparelho de Clevenger. Após a extração foi adicionado ao óleo, o sulfato de sódio anidro para eliminação da água residual.

Posteriormente, com o uso da pipeta do tipo Pasteur, o óleo foi coletado e acondicionado em frasco de vidro de 4mL, etiquetado e armazenado em congelador comercial a -23 °C até a realização da análise química. Uma pequena amostra de 1 g das folhas foi utilizada na determinação do teor de umidade, em triplicatas, no aparelho determinador de umidade (Série ID Versão 1.8 Marte<sup>®</sup>), secando-se as amostras à temperatura de 105°C, por 10 minutos.

O teor do óleo essencial foi obtido a partir da base livre de umidade (BLU), e corresponde ao volume (mL) de óleo essencial em relação à massa seca, conforme fórmula descrita por Santos et al. (2004):  $To = [Vo / (Bm - (Bm \times U / 100))] \times 100$ , onde: To = Teor de óleo; Vo = Volume de óleo extraído; Bm = Biomassa vegetal; (Bm x U) = Quantidade de umidade presente na biomassa; Bm - (Bm x U) = Quantidade de biomassa seca.

Os dados obtidos do teor de óleo foram utilizados para calcular o rendimento de óleo essencial em L. ha<sup>-1</sup>, a partir da multiplicação entre o teor de óleo e a biomassa seca de folhas produzidas por planta, além do número de plantas por hectare.

## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados foram submetidos ao teste F da análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste t a 5% de significância. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa estatístico SAS (Statistical Analysis System) (Sas Institute Inc., 2000).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados obtidos demonstraram que a interação entre a adubação e a época de colheita não foi significativa ( $p < 0,05$ ) para todas as variáveis analisadas, indicando que a influência de cada fator ocorreu de forma independente. Quanto à época de colheita, foi constatado que as plantas da primeira colheita promoveram maior desenvolvimento vegetativo e rendimento de óleo em relação às da segunda época, exceto para o diâmetro do caule (Tabela 2).

Verificou-se também que a primeira colheita promoveu as maiores médias para o volume da copa e massa fresca do caule. Entretanto, para o teor de óleo observou-se efeito contrário, de forma que a segunda colheita proporcionou os maiores teores, com média de 3,02 % (Tabela 2).

Este maior desenvolvimento das plantas pode estar associado a maior duração dessa época de colheita em relação a segunda (rebrota). De acordo com MAY et al. (2010) maiores intervalos entre cortes proporcionaram maior altura da planta e maior massa seca da parte aérea, e, conseqüentemente maior produção de óleo essencial, já que o rendimento de óleo e a massa fresca apresentam correlação positiva, assim, a maior produção de folhas na colheita implica em maior rendimento de óleo, porque nela encontram-se as estruturas secretoras responsáveis pelo acúmulo desta substância (FIGUEIREDO et al., 2009).

**Tabela 2.** Altura (ALT), diâmetro do caule (DC), massa fresca e seca das folhas + inflorescências (MFFI/MCFI), massa seca dos caules (MSC), área foliar específica (AFE), razão peso foliar (RPF) e rendimento de óleo essencial (RO) de plantas cultivadas de *Lippia thymoides* Martius & Schauer submetidas a duas épocas de colheita. Feira de Santana - BA. UEFS. 2015.

Col	Variáveis									
	ALT	DC	VLC	MFFI	MFC	MSFI	MSC	AFE	TO	RO
Ép. 1	1,20 a	20,15 b	1,12 a	309,76 a	324,62 a	121,80 a	154,27 a	1,7 <sup>-3</sup> a	1,66 b	101,24 a
Ép. 2	0,80 b	26,02 a	0,36 b	167,50 b	121,53 b	61,19 b	59,48 b	1,0 <sup>-3</sup> b	3,02 a	73,41 a

Ep - época de colheita, Col - Colheita. Médias seguidas por letras distintas, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste t a 5% de significância.

Quanto aos tratamentos de adubação os resultados demonstraram um incremento nas variáveis diâmetro do caule, massa fresca e seca da parte aérea nas plantas adubadas com esterco e NPK, em relação às cultivadas apenas com esterco e a testemunha (Tabela 3), entretanto para a massa seca do caule não foi verificado diferença significativa.

**Tabela 4.** Diâmetro do caule (DC), massa fresca e seca das folhas + inflorescências (MFFI/MCFI), dos caules (MFC/MSC) e rendimento de óleo essencial (RO) de *Lippia thymoides* Martius & Schauer cultivadas sob adubação orgânica e mineral. Feira de Santana-BA. UEFS. 2015.

Tratamento	DC	MFFI	MFC	MSFI	MSC
<i>L. thymoides</i>					
Testemunha	19,36 b	179,37 b	163,00 b	67,47 b	76,25 a
Esterco	22,59 b	201,87 b	204,32 b	84,17 b	101,56 a
NPK+Esterco	27,31 a	334,63 a	301,93 a	122,86 a	142,81 a

Médias seguidas por letras distintas, na mesma coluna, para cada espécie, diferem entre si pelo teste t a 5% de significância.

Resultados semelhantes foram encontrados nos trabalhos realizados por Oliveira Júnior et al. (2005) que demonstraram que a aplicação de adubação mista (orgânica/mineral) sem calagem na produção de mudas de arnica (*Lychnophora ericoides*) favoreceu o alto rendimento, além de produção satisfatória de biomassa fresca de parte aérea. Montanari et al. (2004) ao testar adubação orgânica (esterco bovino 20 L. m<sup>-2</sup>), mineral (N-P-K 4-14-8 600 kg ha<sup>-1</sup>) e a adubação orgânica/mineral nas mesmas proporções anteriores, observaram influência nas características morfológicas de *L. alba*, como número de ramificações, altura da planta e diâmetro do caule, sendo recomendado pelos autores o uso tanto da adubação mista (esterco+NPK) como orgânica para o aumento da produtividade da espécie. Já Sodré et al. (2013), ao avaliar o efeito de diferentes doses de esterco bovino (0, 1, 2, 4, 8 kg m<sup>-2</sup>), em rela ao ao fertilizante mineral (30 g m<sup>-2</sup> de NPK 4-14-8) em melissa (*Melissa officinalis*), também verificou que a espécie responde   adubac o orgânica e   adubac o mineral para produ o de biomassa, no entanto, o teor de óleo essencial não foi influenciado, como visto no presente trabalho.

No cultivo de plantas, a adição de nutrientes, particularmente nitrogênio, é geralmente empregada para aumentar a produção de biomassa, entretanto, esses nutrientes além de interferir no metabolismo primário, acabam influenciando a produção de metabólitos secundários (GOBBO NETO; LOPES, 2007). Teles et al. (2014) avaliando a adubação orgânica (resíduos vegetais  $-10 \text{ t ha}^{-1}$ ) e mineral (N-P-K 80-200-80  $\text{kg ha}^{-1}$ ) concluíram que para a produção de biomassa e de óleo essencial a aplicação de fertilizantes não se faz necessária, apresentando valores significativamente iguais a testemunha. Assim como Santos; Innecco (2004) verificaram que as produções de massa seca foliar e óleo essencial em folhas *L. alba* não foram influenciadas pela adubação orgânica.

## CONCLUSÃO

Nas condições de cultivo a adubação mineral (Fórmula NPK 10:10:10) associado a esterco bovino promove maior crescimento e produção de biomassa na espécie *L. thymoides*. A poda, seguida do segundo período de cultivo (rebrotas), é recomendável para o cultivo da espécie estudada, visando à produção de óleo essencial. A espécie *L. thymoides* é promissora para a produção de óleo essencial nas condições de Feira de Santana, Bahia.

## REFERÊNCIAS

GIULIETTI, A. M.; CONCEICAO, A.; QUEIROZ, L. P. **Diversidade e caracterização das fanerógamas do semiárido brasileiro**. Recife: Associação das Plantas do Nordeste, 2006. 488 p.

VICCINI, L. F.; et al. Chromosome numbers in the genus *Lippia* (Verbenaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 256, p. 171-178, 2006.

SALIMENA, F. R. G.; MULGURA, M. **Lippia**. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB21444>>. Acesso em: 21 fev. 2015.

SILVA, F. S. **Estudo fitoquímico e farmacológico de *Lippia thymoides* Mart. & Schauer (Verbenaceae)**. 2012. 143f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) – Feira de Santana, Bahia.

FUNCH, L. S.; et al. **Plantas úteis: Chapada Diamantina**. São Carlos: RIMA, 2004. 206 p.

PASCUAL, M. E.; et al. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 76, p. 201-214, 2001.

SILVA, F.; CASALI, V. W D. **Plantas medicinais e aromáticas: Pós-colheita e óleos essenciais**. Viçosa: UFV, 2000, 135 p.

SALIMENA, F. R. G.; et al. Verbenaceae. In: MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. (Org.). **Livro vermelho da flora do Brasil**. 1. ed. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Studio, 2013. p. 1010-1016.

EHLERT, P. A. D.; et al. Influência do horário de colheita sobre o rendimento e composição do óleo essencial de erva-cidreira brasileira [*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.]. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 15, n. 1, p. 72-77, 2013.

CASTRO, D. M.; MING L. C.; MARQUES, M. O. M. Composição fitoquímica dos óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. em diferentes épocas do ano e partes do ramo. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 4, n. 2, p. 75-79, 2002.

GOOBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas Medicinais: fatores de influenciam no conteúdo de metabólitos secundários. Revisão. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

SODRÉ, A. C. B.; et al. Adubação orgânica e mineral em melissa. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 1. p. 147-152, 2013.

LUZ, J. M. Q.; et al. Produção de óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. em diferentes épocas, sistemas de cultivo e adubações. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 13, n. 1, p. 69 – 80, 2014

OLIVEIRA JÚNIOR, A. C.; et al. Teor e rendimento de óleo essencial no peso fresco de arnica, em função de calagem e adubação. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 735-739. 2005.

MEIRA, M. R.; MANGANOTTI, S. A.; MARTINS, E. R. Crescimento e produção de óleo essencial de *Melissa officinalis* L. nas condições climáticas de Montes Claros - MG. **Biotemas**, Florianópolis, v. 24, n. 1, p. 1-8, 2011.

OLIVEIRA, A. R. M. F. **Morfoanatomia, produção e composição química de óleo essencial e atividade biológica de quatro espécies nativas de *Lippia***. 2014. 1v. 114f. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana, Bahia.

SILVA, F. S. **Estudo fitoquímico e farmacológico de *Lippia thymoides* Mart. & Schauer (Verbenaceae)**. 2012. 143f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) – Feira de Santana, Bahia.

SOUZA, M. F.; et al. Calagem e adubação orgânica na produção de biomassa e óleo essencial em *Lippia citriodora* Kunth. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 12, n. 4, p. 401-405, 2010.

FIGUEIREDO, L. S.; et al. Efeito da época de colheita na produção de fitomassa e rendimento de óleo essencial de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 2, p. 154-158, 2009.

MAY, A.; et al. Produtividade da biomassa de melissa em função de intervalo de cortes e doses de nitrogênio. **Horticultura Brasileira**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 312-315, 2008.

OLIVEIRA JÚNIOR, A. C.; et al. Teor e rendimento de óleo essencial no peso fresco de arnica, em função de calagem e adubação. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 735-739. 2005.

MONTANARI, R. M.; et al. Phenotypical plasticity of the external morphology in *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. ex Britt & Wilson in response to level of luminosity and fertilization. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 6, n. 3. p. 96-101. 2004.

**Prospecting plant growth promoting diazotrophic and drought tolerant rhizobacteria isolated from the semi-arid region of Bahia, Brazil**



## **Prospecting plant growth promoting diazotrophic and drought tolerant rhizobacteria isolated from the semi-arid region of Bahia, Brazil\*.**

\*Institutional research developed at the Centre of Agricultural Sciences, Environmental and Biological - UFRB; Part of the first author's doctoral thesis.

Adailson Feitoza de Jesus Santos<sup>1,2\*</sup>; Eliane de Souza Silva<sup>3</sup>; Zayda Piedad Morales Moreira<sup>3</sup>; Lenaldo Muniz Oliveira<sup>4</sup>; Jorge Teodoro de Souza<sup>5</sup>; Heloiza Ramos Barbosa<sup>6</sup>; Ana Cristina Fermino Soares<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Aluno de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Ciências Biológicas.

\*e-mail: adailsonmicrobiologia@gmail.com

<sup>2</sup>Professor Mestre em Microbiologia Agrícola, Universidade Estadual da Bahia – UNEB. Departamento de Ciências Humanas e Tecnologia – DCHT, Campus XXII.

<sup>3</sup>Alunos da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

e-mail: any.biologia@hotmail.com/moraleszaydap@gmail.com

<sup>4</sup>Professor Orientador, Doutor em Agronomia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Ciências Biológicas.

e-mail: lenaldo.uefs@gmail.com

<sup>5</sup>Professor, Doutor em Fitopatologia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

e-mail: jgeteodoro@gmail.com

<sup>6</sup>Professora Doutora em Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo – USP. Departamento de Microbiologia. e-mail: hrbarbos@icb.usp.br

<sup>7</sup>Professora Co-orientadora, Doutora em Produção Vegetal, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. e-mail: ferminosoares@gmail.com

### **Introduction**

Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) are bacteria that occur in the rhizosphere of plants and are able to stimulate their growth by different mechanisms (Kloepper et al., 1986). These microorganisms can affect physiological plant characteristics, since they can produce several compounds, such as phytohormones, are capable of solubilizing phosphates, producing siderophores, are nitrogen fixing bacteria and are also antagonists against phytopathogenic fungi with production of enzymes such as cellulases and pectinases (Ryan et al., 2009; Kim et al., 2012; Ogbo e Okonkwo, 2012; Dalal e Kulkarni, 2013). These features are able to promote plant growth directly or indirectly.

In addition to producing various beneficial compounds to plants, these microorganisms are being studied for their ability to confer tolerance against various abiotic stresses such as high levels of salt, high temperatures, low levels of available nutrients and water deficit to the host plant (Egamberdieva & Hoflich, 2003; Egamberdieva & Kucharova, 2009; Marulanda et al., 2010; Sandhya et al., 2010; Zhang et al., 2010; Rokhzadi & Toashih, 2011; Kavamura et al., 2013). Such factors, which may lead to reduction and / or loss of agricultural production, are characteristic

of arid and / or semiarid regions. This may open a new way for the use of these microorganisms for sustainable agriculture.

The aim of this work was to isolate and select diazotrophic rhizobacteria in a semi-arid region of Bahia, Brazil, which exhibit growth promotion traits and are tolerant to various abiotic stresses, aiming future applications in crops grown in semi-arid.

## **Methodology**

### **Quantification and Isolation**

Five samples of rhizosphere soil were collected in a sisal-producing areas of the semiarid region of the state of Bahia, Brazil. Ten grams of each soil sample were diluted in 90 ml of saline solution (NaCl 0.85%) and dilutions of  $10^{-2}$  to  $10^{-4}$  were performed. Aliquots of 100 $\mu$ L from dilutions of  $10^{-1}$  to  $10^{-4}$  were inoculated onto Burk's semi-solid nitrogen free selective medium (Wilson and Knight, 1952) in test tubes, with three replications. The cultures were incubated at  $28 \pm 2^\circ$  C, for 7 days.

After bacterial growth, detected through the presence of a characteristic subsurface pellicle, quantification of bacteria was performed, using the most probable number (MPN) method (BAM, 2010). The highest dilutions were used to spread 50  $\mu$ L aliquots onto Burk's solid medium plates, which were incubated at  $28 \pm 2^\circ$  C, for 7 days. Developed colonies were picked and purified through growth of individual colonies on Burk's solid medium, with incubation for 7 days, at  $28 \pm 2^\circ$  C.

### **DNA extraction and *nifH* amplification**

For DNA extraction of bacteria, the method of boiling and centrifugation was used. Each bacterial colony was picked from the growth medium and transferred to 1.5 ml microcentrifuge tubes with 90  $\mu$ l of extraction buffer (0.05 M NaOH and 0.25% SDS). The microcentrifuge tubes were transferred to a heating block at  $97^\circ$ C for 15 minutes, followed by cooling at room temperature for 2 minutes, and centrifugation at 10000 rpm for 4 minutes. Twenty microliters of the supernatant were resuspended in 180  $\mu$ L of TE buffer and kept at  $-20^\circ$  C.

Fragments from *nifH* gene were amplified using nested PCR. Two pairs of primers were used: the first one described by Poly et al., (2001), the second one was designed by Soares et al., (2006).

### **BOX-A1R analysis**

The diversity among bacterial isolates that were positive for *nifH* gene was analyzed using PCR amplification with BOX A1-R (Versalovic et al., 1994). Amplification products were transferred to 2% agarose gel for electrophoresis with a constant voltage (50 V) for 300 minutes, were stained with ethidium bromide, photographed. The banding patterns on the gel were converted into a binary matrix, with 1 for the presence and zero for the absence of bands of a particular size. The similarity matrix was calculated using Jacquard's coefficient (Legendre & Legendre, 1983) and the dendrogram was constructed with the UPGMA method and the software Free Tree 0.9.1.50 version.

### **Sequencing of the 16S rRNA gene**

Isolates that were positive for *nifH* gene were sequenced through the amplification of a fragment of approximately 1.4 Kb of the 16 s region of ribossomic DNA. The universal primers 8 FN and 1429r, described by Turner et al., (1999) were used for amplification and sequencing. Bacterial identification at the genus level was done with BLAST searches (Altschul et al., 1997) in public databases. Sequence alignment, model selection and tree reconstruction were done with the program Mega version 5.2.1 (Tamura et al., 2011).

### **Physiological Characterization to Promote Growth**

#### **Indole acetic acid (IAA) production**

The colorimetric method described by Gordon and Weber (1951) was used to analyze bacterial isolates capacity to produce IAA. The concentration of IAA was determined spectrophotometrically at 550 nm, using a standard calibration curve prepared with IAA (0, 5, 10, 15, 20, 25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). All samples were measured in triplicates. The statistical software SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA) was used.

#### **Acetylene Reduction Assay (ARA)**

Acetylene reduction assay was performed as described by Thuler et al., (2003). All isolates were inoculated in triplicates and were incubated at 30° C for 72 h. A gas chromatograph (Shimadzu GC-14A) with a Porapak-N 80/100 – INOX column was used.

#### **Inorganic phosphate solubilization**

The isolates were tested for their ability to solubilize inorganic phosphate. A bacterial inoculum of 5  $\mu\text{l}$  of  $10^9$  cells  $\text{mL}^{-1}$  ( $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.2$ ) of each isolate was inoculated into the culture medium GL (Sylvester-Bradley et al. 1982). Two solutions, the first containing 0.57 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  and the second containing 0.90 M  $\text{CaCl}_2$  were added to this growth medium and the pH was adjusted to 6.5, in order to form calcium phosphate precipitate (Hara & Oliveira, 2004). The plates were incubated at 30°C for 10 days. A clear halo around the bacterial colony was considered positive for phosphate solubilization.

#### **ACC Deaminase**

ACC deaminase activity was determined as described by Glick et al., (1995). A bacterial inoculum of 5  $\mu\text{l}$   $10^9$  cells  $\text{mL}^{-1}$  ( $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.2$ ) of each isolate was inoculated into the culture medium 0.03% of ACC as the sole nitrogen source. The plates were incubated at 30° C for 4 days. The colonies that grew were subcultured to fresh medium containing ACC and incubated under the same conditions to confirm growth.

#### **Hydrolytic activity of polymers of plant**

Pectinase and cellulase activity were performed on indicator plates. The cellulose degradation ability was checked by inoculating 5 $\mu\text{L}$  ( $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.5$ ) of each isolate in a culture medium CMC (2%) solid agar. After incubation at 28° C for 48 hours, the

plates were stained with 0,5% Congo Red for 10 minutes, and then washed with 10 mL of 0,85% saline solution for 10 minutes, then were measured colony diameters and halo degradation to determine the cellulolytic index (CI) based on the ratio between the diameter of the halo and the diameter of the colony. For pectinase activity were inoculated 5  $\mu$ l ( $OD_{600nm} = 0,5$ ) of each isolate in nutrient agar plates supplemented with 0,5% pectin (Mateos et al., 1992). The formation of a halo of degradation around the colonies indicates activity of pectinase. The evaluation was made in the same way analysis of cellulase.

### **Production of Exopolysaccharides**

The ability to produce exopolysaccharides (EPS) was determined with the methodology described by Paulo et al., (2012) using culture medium modified by Guimarães et al., (1999). The production of EPS was observed based on the formation of a mucoid layer around the bacterial inoculated filter paper discs. This mucoid layer was removed with an inoculating loop and added to 2 ml of absolute ethanol. The formation of a precipitate confirms the presence of EPS.

### **Assays for growth in medium with reduced water activity, salinity, different pH and temperature tolerance**

Were inoculated by streaking, bacterial inoculum ( $OD_{600nm} = 0,5$ ) of each isolate in Tryptone Soya Agar (TSA) medium (10%) supplemented with sorbitol at different concentrations to determine the isolates able to grow in medium with reduced water activity ( $A_w$ ). The concentrations of sorbitol were: 285, 405, 520 and 780  $gL^{-1}$ , producing  $A_w$  values corresponding to 0,957, 0,919, 0,897 and 0,807 respectively. The highest concentrations of sorbitol indicate a low value of  $A_w$  (Hallworth et al., 1998). The isolates were incubated for 48 hours at 30° C.

The isolates were tested for their ability to tolerate pH and temperatures different. Each bacterial isolate was inoculated by streaking on Petri dishes containing nutrient agar. The plates were incubated in a growth chamber at temperatures 28° C (control), 37° C, 42° C and 48° C and adjusted pH for 4, 5, 6, 8 and 10. After 48 h of incubation at growth assessment was done by visualization of the growth and development of the colonies.

The isolates were tested for their ability to tolerate different concentrations of NaCl. Were inoculated 5 $\mu$ L ( $OD_{600nm} = 0,5$ ) of each isolate into tubes containing nutrient broth supplemented with different concentrations of NaCl (0, 2, 4, 6, 8 and 10%). The tubes were kept under constant agitation (180 rpm) and incubated at 28° C  $\pm$  2. After 48h the evaluation of bacterial growth was performed by spectrophotometric reading (600nm).

### **Results and Discussion**

A population of 3.65 MPN  $g^{-1}$  (wet soil) of diazotrophic rhizobacteria were obtained with the Burk's culture medium. A total of 47 bacterial isolates were selected according to morphological differences of the colonies. After isolation and purification, the bacterial isolates were stored in solid Burk's in 50% glycerol at -80° C.

## Molecular characterization

Of the 47 bacterial isolates tested, 100% showed amplification product of the *nifH* gene from genomic DNA after nested PCR analysis. Was performed of molecular characterization of isolates based on BOX-PCR after confirmation of the presence of *nifH*.

The analysis of the band patterns formed distinct groups. Within each group of isolates that are found from the banding pattern and clustering in the dendrogram showed 100% similarity, belonging probably to the same species. Eleven different bands patterns were generated, indicating that the 47 isolates, 11 species may be different. The sequences were analyzed with NCBI database and results are presented in table 1. Data analysis showed that the isolates are grouped into 2 phyla, 3 orders, 3 families and 3 different genus. *Bacillus* was the predominant genus, with six isolates.

The presence of strains of the genus *Bacillus* were predominant in our study, as was reported by the predominance of this group Kavamura et al., (2013) in association with roots of cacti found in arid regions. This genus is considered as one of the most common genera of bacteria isolated from the rhizosphere (Mañero Gutiérrez et al., 2003). The dominance of the genus *Bacillus* in this region is probably due to their physiological and biochemical arsenal ranging from the production of compounds that promote nutrient uptake (Velineni and Brahma Prakash, 2011), antimicrobial compounds (Amin et al., 2012) and the ability to species of the genus to form endospores (Nicholson et al., 2000). Such characteristics may confer adaptive and high performance competitive advantages compared with other bacteria.

## Screening of bacterial isolates for *in vitro* plant growth promotion traits

All bacterial isolates have plant growth promoting (PGP) traits (Table 01). Around 45 % of the isolates showed five of the seven tested PGP traits and one isolated (*Burkholderia* sp. S4.4) showed six of these even tested PGP traits.

**Table 01.** Identification of isolated and characteristics of growth promotion *in vitro* of strains isolated from the rhizosphere of sisal.

Isolated	Species (BLAST-NCBI)	IAA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	ARA	ACC Deaminase	(SI)	(CI)	EPS
S1.10	<i>Bacillus</i> sp.	0,22a	+	+	-	-	+
S1.12	<i>Bacterium</i>	0,29a	+	+	-	-	-
S1.14	<i>Rhizobium</i> sp.	0,55b	+	+	1,5	-	+
S1.5	<i>Bacillus</i> sp.	3,39c	+	+	-	-	+
S1.9	<i>Bacillus</i> sp.	0,21a	+	+	-	-	+
S3.5	<i>Bacillus</i> sp.	0,63b	+	+	-	1,4 a	+
S3.6	<i>Bacillus</i> sp.	0,71b	+	+	-	1,3 b	+
S4.1	<i>Bacillus</i> sp.	2,52b	-	+	1,8	-	+
S4.4	<i>Burkholderia</i> sp.	0,65b	+	+	1,6	-	+
S5,1	<i>Burkholderia</i> sp.	0,73b	-	+	-	-	+
S5.2	<i>Burkholderia</i> sp.	0,38a	+	+	1,4	-	+

+ = positive; - = negative; IAA = Indol acetic acid; ARA = Acetylene Reduction Assay; SI = phosphate solubilization index; CI = cellulolytic index. Means followed by the same letters, in colons, do not differ by the Scott-Knott test at 5% probability.



IAA production by all isolates may indicate that they have the potential to positively change in the physiology of some crops, since this phytohormone is one of the most important coordinating different developmental processes in plants (Beneduzi et al., 2013). There was variation in the rate of synthesis of IAA, these variations are related to the concentration of the inoculum, culture conditions and the concentration of L-tryptophan. Although the synthesis of IAA is important for the development of roots, high quantities of these compounds may have detrimental effects to the plant, while the low production has been regarded as beneficial in promoting plant growth (Nehl et al., 1997-Persello Cartieaux et al., 2003; Puga-Freitas et al., 2012).

The fact that most of the rhizosphere isolates were producers of EPS (Table 01) may allow tolerance and survival in semiarid conditions from which they were isolated. The exopolysaccharides are polymers composed of about 97% water, and may assist in microbial survival by reducing desiccation (Wingender et al., 1999; Bhaskar & Bhosle, 2005). Phosphorus is an abundant element in the soil, but their availability is limited, since they are mainly present in the insoluble form (Sharma et al. 2013) rhizobacteria as found in this study (Table 02) can act efficiently on the availability element, facilitating its uptake by plants and consequently providing better plant nutrition (Walpola & Yoon, 2012). Rhizobacteria with cellulolytic activity (Table 01) may have an important role in plant growth, since they can be related to the organic matter decomposition and mineralization of nutrients, and can act as biocontrol agents of cell wall degrading phytopathogenic fungi (Sousa et al., 2008; Sindhu & Dadarwal, 2001).

The ACC deaminase cleaves the precursor of ethylene, ACC. Ethylene is a phytohormone responsible for many aspects of growth and development of plants, but upon stress conditions, is responsible for exacerbating the symptoms caused by this stress (Stearns et al., 2012). The combination of IAA and ACC deaminase produced by rhizobacteria tested, can increase in the length of plants roots inoculated with these bacteria since the ACC deaminase has positive effects on increasing the number and length of root lateral and main (Shahzad et al., 2010), this synergistic effect is also suggested by Glick (2014).

### **Assays for growth in medium with reduced water activity, salinity, different pH and temperature tolerance**

Among the isolates tested, 18% were able to grow in medium with reduced water activity ( $A_w$  0.912) (Table 02). These isolates are grouped within the genus *Bacillus*. Regarding the temperature, 45% and 36% of isolates tested were able to grow and tolerate higher temperatures (42 and 48° C) respectively. Tolerance for different pH ranges, the lowest frequencies of growth were found between the more acidic pH (4.0-5.0) and more alkaline pH (10.0), although several isolates have shown growth in these conditions.

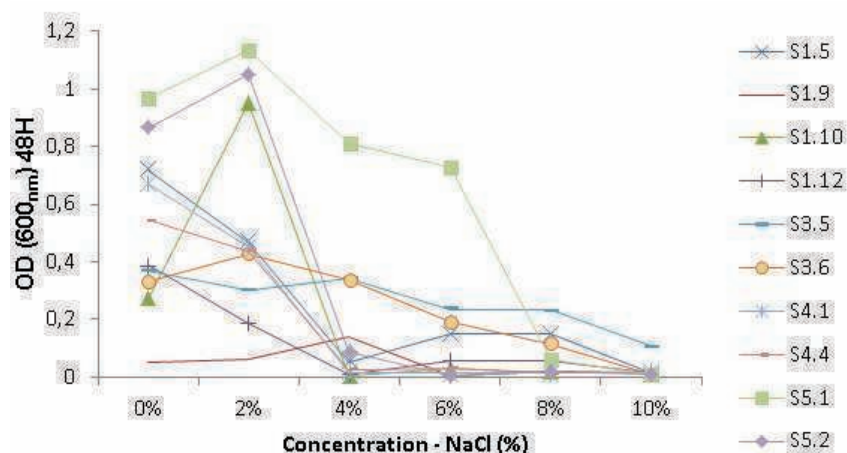


**Table 02.** Tolerance to abiotic stress conditions in vitro by strains isolated from the rhizosphere of sisal.

Isolated	Temperature (°C)				pH					Water Activity (W <sub>A</sub> )			
	28	37	42	48	4.0	5.0	6.0	8.0	10.0	0,995	0,963	0,912	0,859
S1.10	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
S1.12	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
S1.14	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
S1.5	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
S1.9	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
S3.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
S3.6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
S4.1	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-
S4.4	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-
S5,1	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
S5.2	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-

+ = positive; - = negative.

For salinity tolerance (Figure 01) it was found that all isolates showed growth, in all NaCl concentrations tested. Concentrations that showed greater inhibition of growth for all isolates were of 8 and 10%. The isolate S5.1 (*Burkholderia* sp.) showed higher growth rate and tolerance to salt concentration of 6%, showing inhibition at concentrations above 8% NaCl in the culture medium.



**Figure 01.** Optical density of the rhizosphere isolates of sisal, subjected to culture in liquid medium for 48 hours with different concentrations of NaCl (0-10%).

Arid and/or semi-arid regions are characterized by having various abiotic stresses. Such features can lead to reduction and/or loss of agricultural production, since they affect plant growth and development. The presence of bacteria in these environments indicates that these organisms are able to tolerate and survive on such conditions. We identified isolates able to tolerate temperatures up to 48° C, acid and alkaline pH, low water availability and high salt concentrations (Table 02, Figure 01). The presence of rhizobacteria that produce ACC Deaminase and exopolysaccharides can help plants which are associated to tolerate abiotic stresses, including promoting plant growth (Shakir et al., 2012; Timmusk et al., 2013; Qurashi & Sabri, 2012).

## Conclusions

- The genus *Bacillus* is the most common rhizobacteria group in sisal rhizosphere;
- These bacteria have several plant growth promoting traits;
- The ability to tolerate drought conditions is present in these bacterial isolates.

**Keywords:** Rhizobacteria, *Bacillus*, drought tolerant

## References

- BENEDUZI A, MOREIRA F, COSTA PB, VARGAS LK, LISBOA BB, FAVRETO R, BALDANI JI, PASSAGLIA LMP. **Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil.** Applied soil ecology 63:94-104.2013.
- BHASKAR PV, BHOSLE NB. **Microbial extracellular polymeric substances in marine biogeochemical process.** Curr Sci, 88:45-53. 2005.
- DALAL J; KULKARNI N. **Antagonistic and plant growth promoting potentials of indigenous endophytic bacteria of soybean (*Glycine max* (L) Merrill).** Current research in microbiology and biotechnology, 1:62-69. 2013.
- EGAMBERDIEVA D; KUCHAROVA, Z. **Selection for root colonizing bacteria stimulating wheat growth in saline soils.** BiolFertil Soils, 45:563-571. 2009.
- EGAMBERDIYEVA D; HOFLICH G. **Influence of growth-promoting bacteria on the growth of wheat in different soils temperatures.** Soil Biology & Biochemistry, 35:973-978. 2003.
- GLICK BR. **Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world.** Microbiol Res, 169:30-39. 2014.
- GUTIÉRREZ MAÑERO FJ, PROBANZA A, RAMOS B, COLÓN FLORES JJ, LUCAS GARCÍA JA, **Ecology, Genetic Diversity and Screening Strategies of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR).** Journal of Plant Nutrition, 26 (Suppl 5): 1101–1115. 2003.
- KAVAMURA VN, SANTOS SN, SILVA JL, PARMA MM, ÁVILA LA, VISCONTI A, ZUCCHI TD, TAKETANI RG, ANDREOTE FD, MELO IS. **Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under Drought.** Microbiol Res, 168:183–19. 2013.
- KIM S; LOWMAN S; HOU G; NOWAK J; FLINN B; MEI C. **Growth promotion and colonization of switchgrass (*Panicumvirgatum*) cv. Alamo by bacterial endophyte *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN.** Biotechnology for Biofuels, 5:1-10. 2012.
- KLOPPER JW, LEONG J, SCHROTH MN. **Plant Growth promoting rhizobacteria and Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens.** Annual Review Phytopathology, Palo Alto, 24:187-208. 1986.
- MATEOS PF, JIMENEZ-ZURDO JI, CHEN J, SQUARTINI AS, HAACK SK, MORTINEZ-MOLINA E, HUBBELL DH, DAZZO FB. **Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum* Biovar Trifolii.** Appl Environ Microbiol, 58:1816-1822. 1992.
- NEHL DB, ALLEN SJ, BROWN JF. **“Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective,”** Applied Soil Ecology, 5:1–20. 1997.

NICHOLSON W, MUNAKATA N, HORNECK G, MELOSH HJ, SETLOW P. **Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments.** *Microbiol Mol Biol Rev*, 64:548-572. 2000.

OGBO F; OKONKWO J. **Some Characteristics of a plant growth promoting *Enterobacter* sp. Isolated from the roots of maize.** *Advances in Microbiology*, 2:368:374. 2012.

PERSELLO-CARTIEAUX F, NUSSAUME L, ROBAGLIA C. **“Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions,”** *Plant Cell & Environment*, 26:189–199. 2003.

QURASHI AW, SABRI NA. **Bacterial exopolysaccharide and biofilm formation stimulate chickpea growth and soil aggregation under salt stress.** *Braz J Microbiol*, 43:1183-1191. 2012.

ROKHZADI A; TOASHIH V. **Nutrient uptake and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.) inoculated with plant growth-promoting rhizobacteria.** *Australian Journal of Cop Science*, 5:44-48. 2011.

RYAN RP; MONCHY S; CARDINALE M; TAGHAVI S; CROSSMAN L; AVISON MB; BERG G; VAN DER, LELIE D; DOW JM. **The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*.** *Nature Reviews*, 7:514-525. 2009.

SHAHZAD SM, KHALID A, ARSHAD M, KALIL-UR-REHMAN. **Screening rhizobacteria containing ACC-deaminase for growth promotion of chickpea seedlings under axenic conditions.** *Soil & Environ* 29:38-46. 2010.

SHAKIR MA, BANO A, ARSHAD M. **Rhizosphere bacteria containing ACC-deaminase conferred drought tolerance in wheat grown under semi-arid climate.** *Soil Environ* 31:108-112. 2012.

SHARMA SB, SAYYED RZ, TRIVEDI MH, GOBI TA. **Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils.** *SpringerPlus*, 2:1-14. 2013.

SINDHU SS, DADARWAL KR.. **Chitinolytic and cellulolytic *Pseudomonas* sp. antagonistic to fungal pathogens enhances nodulation by *Mesorhizobium* sp. *Cicer* in chickpea.** *Microbiol Res*, 156:353-358. 2001

SOUSA CS, SOARES ACF, GARRIDO MS. **Characterization of *Streptomyces* with potential to promote plant growth and biocontrol.** *Sci Agri*, 65:50-55. 2008.

STEARNS JC, WOODY OZ, MCCONKEY BJ, GLICK BR. **Effects of bacterial ACC Deaminase on *Brassica napus* gene expression.** *Mol Plant Microbe Interact*, 25:668-676. 2012.

TIMMUSK S, TIMMUSK K, BEHERS L. **Rhizobacterial plant drought stress tolerance enhancement: towards sustainable water resource management and food security.** *Journal of Food Security* 1:6-9. 2013.

VELINENIS, BRAHMAPRAKASH GP. **Survival and Phosphate Solubilizing Ability of *Bacillus megaterium* in liquid Inoculants under high temperature and desiccation Stress.** *J Agr Sci Tech*, 13: 795-802. 2011.

WALPOLA BC, YOON MH. **Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria and their co-inoculation efficiency on tomato plant growth and phosphorus uptake.** *African Journal of Microbiology*, 7:266-275. 2012.

WINGENDER J, NEU TR, FLEMMING HC. **Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structures and function.** Berlin Heidelberg, New York: Springer. 1999.

**Qualidade microbiológica do coentro (*Coriandrum sativum* L.)  
proveniente de sistemas de cultivo convencional**

## Qualidade microbiológica do coentro (*Coriandrum sativum* L.) proveniente de sistemas de cultivo convencional

Mariza Alves Ferreira<sup>1</sup>, Ferlando Lima Santos<sup>2</sup>; Jeane Chaves dos Santos<sup>3</sup>; Marinalva Estácio Barbosa Sant'anna<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Doutoranda do Programa de Pós-graduação da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. E-mail: [marizaufrb@yahoo.com.br](mailto:marizaufrb@yahoo.com.br)

<sup>2</sup> Docente da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências da Saúde, Campus de Santo Antônio de Jesus.

<sup>3</sup> Faculdade de Ciência e Tecnologia, Avenida Santiago de Compostela, 216, Salvador, BA.

<sup>4</sup> Faculdade de Tecnologia e Ciências, Av. Luís Viana Filho, nº 8812, Paralela, Salvador, BA.

**Resumo:** O coentro é uma olerícola bastante consumida no nordeste brasileiro como condimento, sendo amplamente adicionado em várias comidas típicas baianas. O objetivo deste trabalho foi realizar a avaliação da qualidade microbiológica desta hortaliça comercializada em feiras livres e em supermercados da capital baiana. As amostras foram coletadas e conservadas a 10°C e transportadas ao laboratório de Microbiologia de Alimentos para realização das análises dos microrganismos coliformes a 35°C e a 45°C, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Foram constatadas as presenças de *E. coli* e de *S. aureus* em todos os produtos analisados. Além disso, constatou-se que 71,43% das amostras demonstraram, que independentemente do local de comercialização, as condições microbiológicas do coentro encontravam-se fora dos padrões higiênico sanitários. Diante destes resultados, ficou evidenciado que esta hortaliça pode constituir uma fonte de transmissão de doenças infecciosas. Desta forma, seria de grande importância o cumprimento de normas higiênico-sanitárias, que garantam a produção, a conservação e a comercialização do coentro na cidade de Salvador em condições microbiológicas adequadas.

### Introdução

É direito das pessoas terem a expectativa de que os alimentos que consomem sejam seguros e adequados para consumo. As doenças e os danos provocados por alimentos são, na melhor das hipóteses, desagradáveis, e, na pior, fatal. Outras consequências provocadas pelas doenças transmitidas por alimentos estão os prejuízos ao comércio e ao turismo, que por sua vez ocasionam perdas econômicas, desemprego e conflitos. Alimentos deteriorados causam desperdício e aumento de custos, afetando de forma adversa o comércio e a confiança do consumidor. Nas duas últimas décadas, os hábitos alimentares têm passado por mudanças em muitos países, acarretando o desenvolvimento de novas técnicas de produção, preparação e distribuição de alimentos. Portanto, um controle eficaz de higiene tornou-se imprescindível para se evitar consequências prejudiciais decorrentes de doenças e danos provocados pelos alimentos à saúde humana e à economia. Todos – governo, empresários, agricultores e consumidores – têm a responsabilidade de garantir que o alimento seja seguro e adequado para consumo (OPAS, 2006).

O mercado consumidor exige cada vez mais produtos bem elaborados e de qualidade, sendo necessária a realização de análises microbiológicas que assegurem a qualidade do produto. Dentre essas análises, pode-se citar a avaliação da presença de coliformes, que é de grande importância para indicação de contaminação do produto (Souza, 2011). As hortaliças apresentam microrganismos que provêm naturalmente do ambiente onde é cultivada e processada, sendo influenciados pelas técnicas de cultivo, transporte e armazenamento. Todavia práticas agrônomicas e/ou de processamento, colheita, embalagem, transporte, comercialização e armazenamentos indevidos favorecem a colonização de patógenos, sendo alguns destes toxigênicos (Tournas, 2005; Rodrigues et al., 2001; Pacheco et al., 2002).

O coentro (*Coriandrum sativum* L) é uma olerícola bastante consumida no Brasil como condimento, sendo, este amplamente cultivado na região Nordeste, por se tratar de uma cultura rústica, de clima quente, pouco exigente em relação ao solo e tolerante à acidez (Filgueira, 2003). Apesar de haver poucos relatos de contaminações severas nesta cultura, sabe-se que a utilização de água de poços e açudes com elevados índices de sais e/ou contaminação por material fecal para a irrigação; o uso de sementes não certificadas; o cultivo em solos inadequados, bem como decorrente do contato das hortaliças com animais, moscas e ratos pode ocasionar contaminação por microrganismos nocivos à saúde humana como *S. aureus* e *E. coli* (Vasconcelos, 2008).

Por ser uma cultura de ciclo curto (45 - 60 dias), o cultivo do coentro, garante retorno rápido do capital investido, aumenta a renda das pessoas envolvidas nesta atividade, possibilita a utilização da mão-de-obra familiar. Em vários estados do Nordeste, o cultivo do coentro é uma atividade comunitária de baixo custo, chegando a se constituir como principal fonte de renda em diversas comunidades rurais (Kaneco, 2006).

Abreu et al., (2010) relata que a contaminação das hortaliças é um fator limitante para sua comercialização. Reportando, ainda, que as condições sanitárias desfavoráveis nas áreas rurais e urbanas favorecem essa contaminação, transformando os vegetais em veículos de transmissão de patógenos. Tradicionalmente, indicadores bacterianos de contaminação fecal, notadamente as bactérias do grupo coliformes e do gênero *Enterococcus*, têm sido utilizados para avaliar a qualidade microbiológica dos produtos comercializados (Barros, 2011).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, através da RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, regulamenta os padrões microbiológicos para alimentos, visando proteção à saúde da população, a fim de compatibilizar a legislação nacional com regulamentos definidos no Mercosul. O coentro enquadra-se no anexo 2 como “hortaliças frescas, *in natura*, inteiras, selecionadas ou não...”, e sua qualidade microbiológica deve estar dentro dos padrões estabelecidos nesta resolução. Desta forma o presente trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica do coentro, um produto amplamente utilizado na culinária baiana, provenientes de sistemas de cultivo convencional e comercializados em diferentes estabelecimentos da cidade Salvador - Bahia.

### **Material e Métodos**

Os locais de coleta das amostras de coentro foram estrategicamente escolhidos em função de apresentar grande fluxo de consumidores, sendo constituídas por duas amostras provenientes de duas feiras livres (identificadas com A e B) e cinco amostras (identificadas por C, D, E, F e G) comercializadas em cinco supermercados situados na cidade de Salvador-Ba. Estas amostras foram coletadas no turno matutino, visto que este era o horário da distribuição pelos fornecedores, sendo armazenadas em embalagens plásticas estéreis, devidamente identificadas, todas em duplicata. Logo após o recolhimento, as amostras foram transportadas assepticamente a 10°C em caixas isotérmicas ao laboratório de Microbiologia de Alimentos na Faculdade de Tecnologia e



Ciências, até a realização das análises e verificação da presença dos microrganismos contaminantes.

As análises microbiológicas foram realizadas seguindo o método da American Public Health Association (APHA) descrito nas normas internacionais (Downes et al., 2001) para cada grupo de microrganismo. Foi quantificada a presença de coliformes totais e termotolerantes nas amostras. Para a realização das análises, uma alíquota de 25,0 g de cada amostra foi utilizada para a preparação da primeira diluição ( $10^{-1}$ ) em 225,0 mL de água peptonada tamponada a 0,1%, e as preparações das diluições decimais subsequentes foram realizadas em tubos contendo 9,0 mL do mesmo diluente para obtenção das concentrações subsequentes.

A contagem de coliformes a 35°C e a 45°C foi feita a partir da incubação dos tubos de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) a 35°C por 48 horas, onde os tubos com crescimento e produção de gás tiveram uma alíquota da cultura transferida para os tubos contendo Caldo Verde Brilhante Bile (VBB). Posteriormente, foram transferidas alíquotas dos tubos positivos para os tubos com Caldo *E. coli* (EC) para determinação dos coliformes termotolerantes sendo mantidos à 45° C durante 24 horas. Para a verificação da presença de *E. coli*, uma alçada de cada tubo foi estriada em Ágar Levine Eosina Azul de Metileno (L-EMB).

Após incubar as placas a 35°C durante 24 horas e observado o desenvolvimento de colônias típicas de *E. coli*, incubou-se as colônias das placas em tubos de Ágar Padrão de Contagem (PCA), a uma temperatura de 35°C por 24 horas. A partir das culturas puras em PCA, fez-se a coloração de GRAM e foram realizados testes bioquímicos para prova do IMVIC, tais como: Indol, Vermelho de Metila (VM), Voges Proskauer (VP) e Citrato.

A contagem de *S. aureus*, foi realizada direto em placas com Ágar Baird-Parker (BP). Para a confirmação das colônias típicas que haviam sido incubadas e 35°C por 48 horas foram transferidas para um tubo com Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) e outro contendo Ágar Tripticase de Soja (TSA) inclinados a uma temperatura de 35°C por 48 horas. Para o teste de coagulase foram retiradas culturas obtidas em BHI e misturadas ao Plasma-EDTA, sendo mantidas em banho-maria a 37° C durante 4 horas. Para o teste de catalase, foi transferida uma alçada de cultura em TSA para lâminas contendo peróxido de hidrogênio 3%.

### Resultados e Discussão

A análise quantitativa realizada através da técnica do Número Mais Provável permitiu a enumeração dos diferentes grupos de microrganismos presentes nas amostras analisadas. A contagem de coliformes a 35°C e a 45°C podem ser observadas na tabela 1. Verifica-se, também, que tanto as amostras coletadas em feiras livres quanto às amostras coletadas em supermercados apresentaram resultado positivo para *S. aureus*, sobretudo nos produtos comercializados nos supermercados E, F e G, similarmente aos valores encontrados para *E. coli*.

**Tabela 1-** Contagem de coliformes em amostras de coentro comercializados na cidade de Salvador-BA em NMP.g<sup>-1</sup>

Amostra	Coliformes a 35°C*	Coliformes a 45° C (Termotolerantes)*	<i>Staphylococcus aureus</i> *	<i>Escherichia coli</i> *
A	≥ 2400	>150	15	15
B	≥2400	>210	<3	3,5

C	≥2400	>39	4	4
D	≥2400	>90	9	9
E	≥2400	≥2400	93	93
F	≥2400	>150	93	93
G	≥2400	>150	75	75

\* média

Os microrganismos pertencentes ao grupo dos coliformes têm sido utilizados mundialmente como parâmetros para se verificar a qualidade da água e dos alimentos (Vieira, 2011). A RDC nº 12 da ANVISA define que a tolerância para amostra indicativa de coliformes a 45°C é de 100 NMP.g<sup>-1</sup> de alimento (BRASIL, 2001). Assim, observa-se que as amostras coletadas em feiras livres (100%) e supermercados (60%) encontram-se, em condições higiênicas inadequadas ao consumo, independentes do local de comercialização. Sendo comprovada a importância da fiscalização higiênico-sanitária tanto em feiras livres quanto em supermercados, sobretudo por tratar-se de um condimento bastante utilizado em várias comidas típicas baianas.

Sendo as hortaliças produzidas em diferentes condições climáticas, estruturais e empregando-se diferentes práticas agrícolas, pressupõe-se que os perigos microbiológicos variem entre estes sistemas. Visto que os riscos microbianos que afetam a segurança dos alimentos podem estar presentes em qualquer ponto da cadeia produtiva, desde as fases preliminares do cultivo, até o consumo final (Assis e Uchida, 2014).

Guimarães et al., (2003), relataram que vários estudos no Brasil têm identificado hortaliças com alto grau de contaminação por coliformes termotolerantes transmitidos pela água de irrigação. Oliveira (2012) observou que o coentro *in natura* apresentou contagens elevadas de coliformes, porém, após a desidratação houve redução para níveis seguros, demonstrando a eficácia desse processo na redução da carga microbiana. Sendo uma opção viável para a utilização do produto em restaurantes e baianas de acarajé. Confirmando que o alto teor de umidade favorece a proliferação de microrganismos.

Germano (2001), afirma que qualquer alimento exposto à contaminação fecal, seja através da água de preparo ou dos manipuladores infectados, é capaz de veicular a *E. coli*. Por isso, a contagem desta bactéria é utilizada como indicador de contaminação fecal recente ou de condições higiênico-sanitárias insatisfatórias no processamento de alimentos. A Resolução nº 12 da ANVISA não estabelece limite máximo para contagem de *E. coli*. Porém os resultados, observados na tabela 1, apontam que todas as amostras analisadas contém estes agentes de contaminação, em maior quantidade nos produtos comercializados nos supermercados E, F e G, denunciando a falta de controle higiênico-sanitário dos locais em que estavam sendo comercializados.

Embora a RDC 12/01 não estabeleça valores para *S. aureus* em hortaliças frescas “in natura”, é sabido que esses microrganismos são indicativos de manipulação inadequada devido ao contato direto com o homem e o ambiente.

Segundo Forsythe (2002), *S. aureus* estão presentes nas vias nasais e na garganta, além do cabelo e na pele. Penna (2004), afirmou que os *Staphylococcus aureus* são produtores de biofilmes e podem também produzir enterotoxinas. Desta forma, os resultados obtidos no presente estudo permitem sugerir maior atenção por parte dos órgãos públicos competentes quanto à contaminação através de hortaliças, em especial o coentro.

## Conclusão

Os resultados obtidos revelam que, independentemente do local de comercialização, as amostras de coentro encontra-se fora dos padrões higiênico sanitários, alertando sobre a necessidade de fiscalização e dos cuidados ao consumir alimentos crus expostos ao ambiente. Assim, é importante à adoção de medidas que propiciem uma melhoria da qualidade desses produtos como a lavagem doméstica e a desinfecção pelo uso de hipoclorito de sódio, reduzindo ou eliminando os microrganismos patogênicos sem afetar a qualidade do produto e protegendo a saúde do consumidor.

**Palavras chaves:** análise microbiológica, hortaliças, coliformes, olerícola, contaminação

## Agradecimentos

A FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento da pesquisa.

CINOVA - Coordenação de Inovação da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

## Referências Bibliográficas

ABREU, I. M. O. Qualidade microbiológica e produtividade de alface sob adubação química e orgânica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas**, n. 30, p. 108-118, maio 2010.

ASSIS, L. L. R de, UCHIDA, N. S. Análise da qualidade microbiológica de hortaliças minimamente processadas comercializadas em Campo Mourão, PR. **Brasilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v.5, n.3, p.17-22, 2014.

BARROS, L. S.S. e. Grau de contaminação das águas de poços de propriedades rurais de Cruz das Almas – Ba. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 23, n. 4, p. 207-214, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Resolução – **RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001**. Diário oficial da República Federativa do Brasil, Brasília – DF, 10 de janeiro de 2001.

DOWNES, F. P.; ITO, K. (eds.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4 ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2 ed. Viçosa: UFV, 2003.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. São Paulo: ed. Artmed, 2002.

GERMANO, P. M. L. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. Livraria Varela. São Paulo, 2001.

GUIMARÃES, A. M. et al. Frequência de enteroparasitas em amostra de alface (*Lactuca sativa*) comercializada em Lavras, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 621-623, 2003.

KANECO, M.G. **Produção de coentro e cebolinha em substratos regionais da Amazônia à base de madeira em decomposição (Pau)**. Dissertação de mestrado (Universidade de Brasília) 58 f. 2006.

McCRADY, M.H. The numerical interpretation of fermentation-tubes results. **Journal of Infection**. Disease, Illinois, v.17, p.183-212, 1915.

OLIVEIRA, D. C. R. e SOARES, E. K. B. Elaboração e caracterização físico-química, microbiológica e sensorial de produtos desidratados obtidos a partir de matérias-primas amplamente consumidas na Amazônia. **Scientia Plena**. v. 8, nº 5, 2012.

OPAS - **Organização Pan-Americana da Saúde**. Higiene dos Alimentos – Textos Básicos. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, p. 64, 2006.

PENNA, C.F.A.M. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus sp* isoladas de queijo tipo coalho. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. V 56, nº 1, p.130-136, 2004.

RODRIGUES, M.F., VITAL, M.R., ABRAMO C.S. Avaliação da contaminação de alfaces (*Lactuca sativa*) comercializadas em feiras livres por enteroparasitas. **Jornal Brasileiro de Patologia**. Rio de Janeiro, v. 37, p. 125-128, 2001.

PACHECO, M. A. S. R et al. Condições higiênicas sanitárias de verduras e legumes comercializados no Ceagesp de Sorocaba- SP. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 101, p. 50-55, 2002.

SILVA, N. da et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 4º ed., São Paulo: Livraria Varela, 2010.

SOUZA, L.S. et al. Quantificação de coliformes em própolis e geoprópolis de abelhas sociais sem ferrão (Hymenoptera: Apidae: Meliponina). **Magistra**, Cruz das Almas-BA, v. 23, p. 1-4, 2011.

TOURNAS, V. H. Moulds and yeasts in fresh and minimally processed vegetables, and sprouts. **International Journal of Food Microbiology**, v.99, n. 1, p. 71-77, Mar. 2005.

VASCONCELOS, L. S. B. de. Desenvolvimento de plantas de coentro em função da força iônica da solução nutritiva. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 42 f. 2008.

VIEIRA, R. H.S. dos F. et al. Avaliação físico-química e análise microbiológica do perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *Escherichia coli* isoladas no Rio Cocó. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 23, n. 4, p. 200-206, 2011.

**RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO  
VEGETAL E TOLERANTES A SECA ISOLADAS DE ESPÉCIES  
DE CACTACEAS**

# RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL E TOLERANTES A SECA ISOLADAS DE ESPÉCIES DE CACTACEAS\*

\*Pesquisa Institucional desenvolvida no Departamento de Ciências Humanas e Tecnologias – Campus XXII, pertencente ao Programa de Iniciação Científica – PICIN/UNEB

Jean Santana Miranda<sup>1</sup>; Jildemar Santos de Moraes<sup>2</sup>; Wilza Fagundes Cerqueira<sup>3</sup>; Izis Katarina Santana Mello<sup>4</sup>; Adailson Feitoza de Jesus Santos<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Aluno do Curso de Graduação em Engenharia Agrônômica, bolsista PICIN/UNEB, jean.s.m@hotmail.com.

<sup>2</sup>Aluno do Curso de Graduação em Engenharia Agrônômica, bolsista PICIN/UNEB, gilsantos42@hotmail.com.

<sup>3</sup>Aluno do Curso de Graduação em Engenharia Agrônômica, bolsista IEX/CNPq, wilzafagundes@hotmail.com.

<sup>4</sup>Aluno do Curso de Graduação em Engenharia Agrônômica, bolsista de Extensão/UNEB, iziskatarina@hotmail.com.

<sup>5</sup>Professor Mestre em Microbiologia Agrícola, Universidade do Estado da Bahia, Orientador, adailsonmicrobiologia@gmail.com.

## Introdução

A Estação Ecológica Raso da Catarina (ESEC – Raso da Catarina) está localizada no nordeste brasileiro e apresenta uma vegetação típica do bioma Caatinga, com deficiência hídrica bastante elevada e baixos índices de precipitações pluviométricas condicionando um clima considerado entre o semiárido e o desértico, bastante seco e quente, caracterizado, de modo geral, pela presença de solos pobres em matéria orgânica (PAES, 2008; SILVA, 2006). A paisagem é marcada pela vegetação de Caatinga sobre a areia, predominantemente arbustiva, muito densa e menos espinhosa do que aquela existente na Caatinga que recobre solos cristalinos (VELLOSO et al., 2002).

O bioma Caatinga ocupa cerca de 11% do território nacional, uma área que equivale as áreas da Alemanha e França juntas, e apresenta uma grande diversidade quanto a fauna e flora, tornando este bioma extremamente heterogêneo e dependente das condições edafoclimáticas, sendo assim, podendo ser chamado de Caatingas, devido as diversas fisionomias (MAGALHÃES, 2012).

Embora a maioria das culturas vegetais não consigam tolerar períodos de secas prolongadas, a vegetação nativa do bioma Caatinga apresenta plantas que podem sobreviver por todo um período de seca, no qual se destaca a formação vegetal Xerófila, com folhas pequenas que reduzem a transpiração, caules suculentos para armazenar água e raízes espalhadas para capturar o máximo de água durante as chuvas (SILVA, 2006). Aliado a estas plantas existe uma comunidade microbiana (microbioma), predominantemente composta por fungos e bactérias e que estão distribuídos em todos os compartimentos vegetais, tanto na parte externa, quanto nas partes internas, além de uma grande diversidade destes no sistema da rizosfera (MARIANO et al., 2004). O microbioma vegetal é capaz de influenciar a fisiologia vegetal, uma vez que produz uma série de compostos que podem ser benéficos



para as plantas de forma direta, através da disponibilização de nutrientes essenciais para o desenvolvimento e vigor do vegetal e/ou disponibilização de fitohormônios, ou indireta, por meio do controle biológico de patógenos, levando muitas vezes a processos de promoção de crescimento vegetal e tolerância a estresses abióticos (KLOEPPER, 1993; NEHL et al., 1996; WHIPPS, 2001).

As Rizobactérias Promotoras de Crescimento Vegetal (RPCV), são bactérias que estão presentes na rizosfera, colonizando essa região que sofre influência direta das raízes, e contribuindo com o crescimento de plantas numa relação simbiote ou não (FREITAS *et al.*, 2003). A influência das bactérias presentes na rizosfera tem sido bastantes estudada, a fim de verificar os mecanismos utilizados por esses microrganismos, que apresentam potencial para disponibilizar nutrientes essenciais para o desenvolvimento dos vegetais.

Dentre os macronutrientes o fósforo (P) é considerado como um fator essencial para o crescimento das plantas, porém, quando em reduzida disponibilidade no solo limita o desenvolvimento das mesmas (NOVAIS; SMYTH 1999). Mesmo estando presente nos solos, muitas vezes o fósforo encontra-se na forma não assimilável pelas plantas, sendo necessário que haja a sua solubilização no sistema solo (SMITH, 2002; MARTINAZZO *et al.*, 2007; RHEINHEIMER *et al.*, 2008). Diversos microrganismos do solo, incluindo as bactérias, possuem a capacidade de solubilizar fosfatos por meio de diferentes mecanismos, especialmente pela produção de ácidos orgânicos, neste sentido, a inoculação com esses microrganismos poderia ser uma alternativa na substituição ou redução do uso de fertilizantes fosfatados (SOUCHIE *et al.*, 2005; 2006; BARROSO & NAHAS, 2008; IGUAL *et al.*, 2001; VESSEY, 2003).

Outra forma de possibilitar um bom desenvolvimento da planta é a produção de exopolissacarídeos (EPSs) que são polímeros de carboidratos encontrados em uma ampla variedade de bactérias, permitindo a aderência e colonização de superfícies sólidas onde nutrientes se acumulam (BARRETO *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2013). Os EPSs também protegem as bactérias do dessecamento e reduzem contato com moléculas hidrofóbicas ou carregadas (BREWIN, 1991). A presença de bactérias capazes de produzir EPS na rizosfera, auxilia diretamente na proteção deste vegetal contra diversos tipos de estresses, reduzindo os efeitos causados pelos solos salinos em culturas vegetais, por exemplo (SILVA, 2013).

Este trabalho teve como objetivo isolar bactérias rizosféricas associadas a plantas nativas da Caatinga da família botânica *Cactaceae* presentes na ESEC-Raso da Catarina, e selecionar quanto a capacidade em tolerar estresses abióticos como déficit hídrico e diferentes concentrações de salinidade, além de características relacionadas com a promoção de crescimento vegetal, como a solubilização de fosfato inorgânico e produção de exopolissacarídeos.

## **Metodologia**

### **1. Seleção dos locais de coleta**

Foram selecionados 2 pontos de coleta dentro da área da Estação Ecológica-ESEC/Raso da Catarina, os quais não tenham sofrido nenhuma interferência

humana, como histórico de cultivo agrícola. Os pontos de coleta foram georreferenciados com auxílio do equipamento GPS. As coletas do solo rizosférico foram realizadas em 3 espécies vegetais diferentes, *Pilosocereus spp.*, *Opuntia spp.* e *Melocactus spp.* pertencentes a família botânica Cactaceae.

## **2. Amostragem, coleta e preparo das amostras**

Nos 2 pontos de coleta selecionados, amostras do solo que aderidas ao sistema radicular das 3 espécies vegetais foram coletadas, constituindo-se 6 amostras diferentes. Para cada espécie vegetal foram coletadas 5 repetições, as quais constituíram uma amostra composta, sendo consideradas apenas amostras da camada do solo de 0-0,2m. Para garantir a integridade e evitar contaminações cruzadas, os materiais de coleta e de armazenamento foram esterilizados, e armazenados até o laboratório de Microbiologia do Semiárido da UNEB Campus XXII em caixa térmica.

## **3. Quantificação e Isolamento de bactérias a partir de solo rizosférico de espécies da caatinga.**

Para o isolamento das bactérias, 10 g de cada amostra foi transferida para Erlenmeyers de 250mL contendo 90mL de solução salina (0,85%). As amostras foram mantidas em agitação constante a 200 rpm durante 1 hora. Após esse período foram realizadas diluições seriadas  $10^{-2}$ , a  $10^{-7}$ . Alíquotas de 100  $\mu$ L de cada diluição foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio TSA (10%), em triplicatas, para determinação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC). As placas foram incubadas a 30° C durante 48 horas. Após o crescimento foram selecionadas 10 colônias morfológicamente distintas de cada amostra e repicadas em meio TSA (10%) para purificação e posteriormente armazenamento em Glicerol 50% a -20° C.

## **4. Seleção de Rizobactérias tolerantes a seca**

4.1. Seleção de isolados tolerantes a déficit hídrico ou reduzida atividade de água  
Foram inoculados, por estrias, suspensões bacterianas ( $OD_{600nm} = 0,5$ ), de cada isolado em meio TSA (10%) suplementado com sorbitol em diferentes concentrações para determinação dos isolados capazes de crescer em meio com reduzida atividade de água ( $A_w$ ). As concentrações de sorbitol foram: 285, 405, 520 e 780  $g.L^{-1}$ , produzindo valores de  $A_w$  correspondentes a 0,957, 0,919, 0,897 e 0,807, respectivamente. Quanto maior a concentração de sorbitol, menor o valor de  $A_w$  (Hallsworth et al., 1998). Os isolados foram incubados durante 48 horas a 28° C.

### **4.2. Tolerância a estresse salino**

Os isolados foram testados quanto a sua capacidade de tolerância a diferentes concentrações de NaCl. Para realização do teste, foram transferidas colônias bacterianas para placa de Petri contendo meio TSA 10% suplementado com diferentes concentrações de NaCl (0, 2, 4, 6, 8 e 10%), estas foram incubados a 28° C  $\pm$  2. Após 48h, a avaliação do crescimento bacteriano foi realizada.

## **5. Seleção de Isolados promotores de crescimento vegetal**

### **5.1. Solubilização de fosfato inorgânico**

Um volume de 5  $\mu$ L de suspensão bacteriana ( $OD_{600nm} = 0.2$ ) de cada isolado, promotores de crescimento e tolerantes as condições de seca, foi inoculado em placas de Petri contendo meio de cultura GL (10 g de glicose, 2 g de extrato de levedura e 15 g de Agar) (Sylvester-Bradley et al., 1982). Foram preparadas duas

soluções, a primeira contendo 0.57 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e a segunda contendo 0.90 M de CaCl<sub>2</sub>, e em seguida foram adicionadas ao meio GL para formar fosfato de cálcio precipitado (Hara e Oliveira, 2004). As placas permaneceram incubadas a 30° C por 10 dias. A formação de um halo claro ao redor das colônias foi considerado como positivo para a solubilização de fosfato.

## 5.2. Produção de Exopolissacarídeos

A habilidade em produzir exopolissacarídeos (EPS) foi determinada utilizando a metodologia descrita por Paulo *et al.*, (2012). Um volume de 5 µL de suspensão bacteriana (OD<sub>600nm</sub> = 0.2) de cada isolado, promotores de crescimento e tolerantes as condições de seca, foi inoculado em discos de papel filtro estéril de 5 mm Ø, colocados sobre o meio de cultura modificado por Guimarães *et al.*, (1999), contendo 2% de extrato de levedura, 1,5% de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,02% de MgSO<sub>4</sub>, 0,0015% de MnSO<sub>4</sub>, 0,0015% de FeSO<sub>4</sub>, 0,003% de CaCl<sub>2</sub>, 1,5% de Agar e 10% de sacarose, com pH ajustado para 7.5. As culturas permaneceram incubadas a 30° C por 48 h e a produção de EPS foi observada a partir da formação de uma camada mucóide ao redor dos discos de filtro de papel. Os isolados que apresentarem a camada mucoide, foram coletados com auxílio de uma alça de platina e transferida para tubos de ensaio contendo 2 mL de etanol absoluto. A formação de um precipitado confirma a presença de EPS.

## Resultados e Discussão

Com relação a contagem de micro-organismos cultiváveis de solo, para período de seca, foram considerados valores estimados de log das unidades formadoras de colônias. Verificou-se que a comunidade bacteriana nas espécies vegetais, variou entre 6,4x10<sup>4</sup> g<sup>-1</sup> e UFC: 1,4x10<sup>6</sup> g<sup>-1</sup>. A espécie vegetal *Melocactus spp.* (Coroa de Frade), apresentou maior população bacteriana rizosférica, nos dois pontos de coleta (Tabela 1).

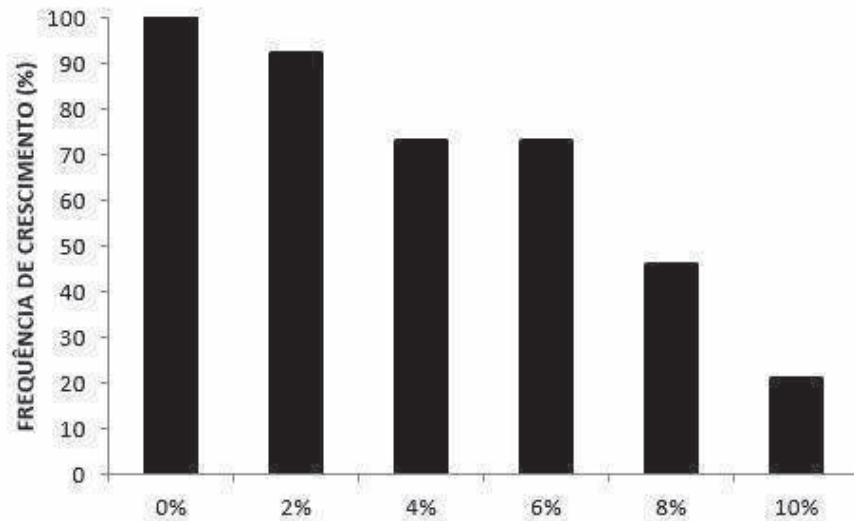
**Tabela 1.** Quantificação bacteriana rizosférica associadas a espécies de *Cactaceae* ocorrentes na ESEC – Raso da Catarina.

PLANTAS	PONTO 1	PONTO 2
COROA DE FRADE	UFC: 1,9x10 <sup>5</sup> g <sup>-1</sup>	UFC: 1,4x10 <sup>6</sup> g <sup>-1</sup>
PALMATÓRIA	UFC: 6,4x10 <sup>4</sup> g <sup>-1</sup>	UFC: 9x10 <sup>5</sup> g <sup>-1</sup>
FACHEIRO	UFC: 2,4x10 <sup>4</sup> g <sup>-1</sup>	UFC: 5,8x10 <sup>5</sup> g <sup>-1</sup>

Os valores encontrados a partir da quantificação bacteriana, estão entre a média dos verificados por Rao e Venkateswarlu (1983) em dez diferentes solos áridos, com uma média de 0,22x10<sup>5</sup> até 32,67x10<sup>5</sup>.

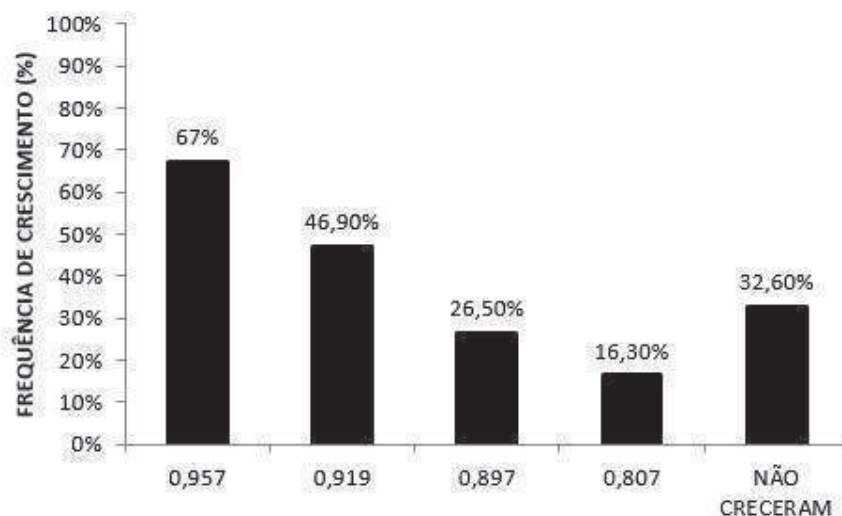
Avaliou-se a tolerâncias das estirpes bacterianas em meio de cultura suplementado com NaCl entre 0 e 10%, observa-se que de acordo com o aumento das concentrações de NaCl houve redução na porcentagem de isolados tolerantes, resultados semelhantes ao encontrado por Xavier *et al.*, (2007). Destas estirpes, cerca de 100% foram capazes de crescer em meio de cultura contendo 0% de NaCl.

Na concentração de 4% de NaCl, foram capazes de crescer 73% do total de isolados. Na maior concentração (10%), somente 21% das estirpes testadas foram capazes de crescer nesta condição (Figura 1). Solos com elevada salinidade são característicos de regiões áridas ou semiáridas, bactérias que apresentam potencial de crescimento nessas condições, quando presentes na rizosfera podem contribuir com a redução dos efeitos deletérios da salinidade sobre as plantas.



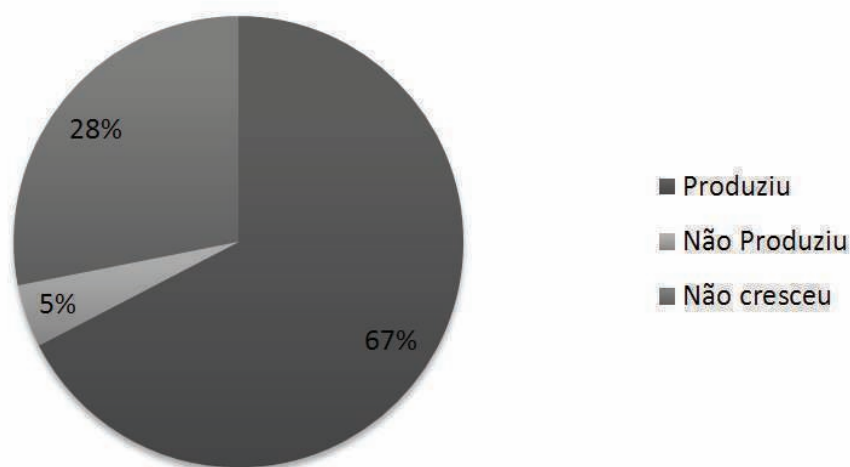
**Figura 1:** Frequência de crescimento das estirpes bacterianas isoladas da rizosfera de cactácea da Estação Ecológica Raso da Catarina – ESEC em Meio de cultura TSA 10% com diferentes concentração de NaCl.

Dentre as bactérias testadas, cerca de 67, 46, 26 e 16% cresceram em meio de cultura com, respectivamente, 0,957, 0,919, 0,897, 0,807Aw (Figura 2). Do total testado, 32% não cresceram no meio suplementado com a menor concentração de sorbitol. A habilidade das estirpes de tolerar ambientes com reduzida quantidade de água pode estar relacionada com a adaptação desses microrganismos ao ambiente de origem, o qual possui constante irregularidade pluviométrica, ocasionando solos com baixas quantidades de água.



**Figura 2:** Frequência de crescimento das estirpes bacterianas isoladas da rizosfera de cactácea da Estação Ecológica Raso da Catarina – ESEC em Meio de cultura TSA 10% suplementado com diferentes concentrações de sorbitol.

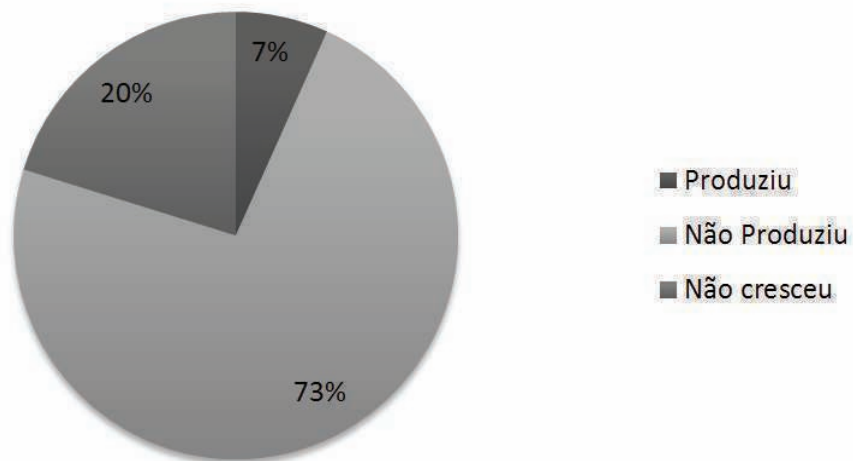
Como apresentado na figura 3, das bactérias submetidas ao teste de produção de exopolissacarídeos, 67% tiveram capacidade de produzir tal composto, 5% não produziram e 28% do total não cresceram quando testadas em meio definido para os testes. A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que a maioria dos isolados apresentou capacidade de produzir exopolissacarídeos, o que provavelmente pode se uma característica que confere o crescimento dos vegetais em condições de estresses e possibilitam uma melhor fixação de alguns nutrientes.



**Figura 3:** Produção de exopolissacarídeos por rizobactérias isoladas da rizosfera de cactáceas da Estação Ecológica (ESEC) – Raso da Catarina.

A contribuição dos exopolissacarídeos para o crescimento vegetal foi verificada por Silvi *et al.*, (2013), o qual demonstra que as bactérias promotoras de crescimento vegetal e tolerantes a seca, que tenham capacidade de produzir exopolissacarídeos podem auxiliar no desenvolvimento de aplicações biotecnológicas na agricultura, além disto, esse composto, possibilita a bactéria adesão e colonização às superfícies sólidas onde os nutrientes se acumulam, ressaltando ainda que o EPS envolve as membranas das células protegendo de estresses salinos, hídricos e regulando a temperatura, além de poder ajudar na fixação de minerais e nutrientes próximos a bactéria e ao sistema radicular (BARRETO *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2013).

Na figura 4, pode-se observar que 7% das bactérias isoladas da rizosfera das cactáceas presentes na ESEC - Raso da Catarina tiveram capacidade de solubilizar fosfato inorgânico, 20% não cresceram e 73% não produziram quando submetidas ao teste *in vitro*. A presença destes micro-organismos solubilizadores de fosfato inorgânico na rizosfera podem influenciar o crescimento vegetal de forma direta, uma vez que estas bactérias podem tornar o fosfato disponível para planta.



**Figura 5:** Solubilização de fosfato inorgânico por rizobactérias isoladas da rizosfera de cactáceas da Estação Ecológica (ESEC) –Raso da Catarina.

Vessey, (2003), confirma que o uso de micro-organismos solubilizadores de fosfato pode ajudar a aumentar a disponibilidade de P para favorecendo o crescimento de plantas leguminosas e não-leguminosas. A inoculação destes micro-organismos solubilizadores no solo tem sido sugerida como alternativa para substituir ou diminuir o uso de fertilizantes fosfatados solúveis, mediante melhor aproveitamento do nutriente (IGUAL et al., 2001; VESSEY, 2003).

As características apresentadas pelas estirpes bacterianas testadas podem estar relacionadas com os mecanismos utilizados por essas bactérias para contribuir com a promoção do crescimento vegetal e devem ser testadas agora quanto a sua capacidade, em condições de casa de vegetação, em promover o crescimento de plantas modelos e em culturas de interesse agrícola.

### Conclusão

- Das estirpes de bactérias isoladas da rizosfera de *Cactaceae*, 21% e 16% são tolerantes aos maiores níveis de salinidade e reduzida atividade de água, respectivamente.
- 21% dos isolados testados são capazes de produzir exopolissacarídeos e 7% solubilizar fosfato inorgânico.
- As estirpes bacterianas apresentam potencial de promoção de crescimento e tolerâncias a estresses abióticos, *in vitro*.

**Palavras-chave:** Semiarido, *Cactaceae*, BPCV, Estresse abiótico, Rizobactérias.

### Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq, a UNEB/PPG – Programa de Iniciação Científica (PICIN) pelas bolsas e apoio financeiro; ao IFBaiano e UFRB pelo auxílio à pesquisa e apoio na execução dos experimentos; e, ao grupo do Laboratório de Microbiologia do Semiarido LAMSA/UNEB.



## Referências

- BARRETO, M. C. S.; FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; SILVA, M. L. R. B.; LIMA-FILHO, J. L. **Produção e comportamento reológico de biopolímeros produzidos por rizóbios e caracterização genética.** Revista Brasileira Agrociência, v.17, n.2-4, p.221-227, 2011.
- BARROSO, C. B.; NAHAS, E. **Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 43, n. 4, p. 529-535, 2008.
- BREWIN, N.J. **Development of the legume root nodule.** Annual Review Cell Biology, v.7, p.191-226, 1991.
- FREITAS, S.S.; MELO, A.M.T. & DONZELI, V.P. **Promoção de crescimento de alface por rizobactérias.** R. Bras. Ci. Solo, 27:61-70, 2003.
- GUIMARÃES D.P.; COSTA F.; RODRIGUES M.J.; MAUGERI, F. **Optimization of dextran syntesis and acidic hydrolisis by surface response analysis.** Braz. J. Chem. Eng. 16:129-139, 1999.
- HARA, F. A. S. E; OLIVEIRA, L. A. **Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas.** Acta Amazônica, 34, 343-357, 2004.
- IGUAL, J. M.; VALVERDE, A.; CERVANTES, E.; VELÁZQUEZ, E. **Phosphate-solubilizing bacteria as inoculantes for agriculture: use of updated molecular techniques in their study.** Agronomie, v. 21, n. 2, p. 561-568, 2001.
- KLOEPPER, J.W. **Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents.** In: Soil Microbial Ecology, Applications in Agricultural and Environmental Management. New York: Ed. FBJ meeting. p. 255-274, 1993.
- LIU, S.; CHEN, X.; HE, H.; ZHANG, X.; XIE, B.; YU, Y.; CHEN, B.; ZHOU, B.; ZHANG, Y. **Structure and ecological roles of a novel exopolysaccharide from the artic sea ice bacterium pseudolateromonas sp. Strain SM20310.** Appl. Environ. Microbiol.v.1. p. 224, 2013.
- MAGALHÃES, T. **Caatinga, um bioma desconhecido e a “Convivência com o Semi Árido”.** Revista do Instituto Humanitas Unisinos. 389:6-8, 2012.
- MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R.; DONATO, V. M. T. S. **Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável.** Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, Recife, v. 1, p. 89-111, 2004.
- MARTINAZZO, R.; SANTOS, D. R.; GATIBONI, L. C.; BRUNETTO, G.; KAMINSKI, J. **Fósforo microbiano no solo sob sistema plantio direto em resposta à adição de fosfato solúvel.** Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 31, n. 3, p. 563-570, 2007.
- NEHL, D.B.; BROWN, J.F. **Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective.** Applied Soil Ecology, v. 5, p. 1-20, 1996.
- NOVAIS, R. F.; SMYTH, T. J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais.** Viçosa: UFV, DPS, 1999.
- PAES, M. L. N.; DIAS, I. F. O. **Plano de manejo: Estação Ecológica Raso da Catarina.** Brasília: Ibama. 326p, 2008.
- PAULO E.M.; VASCONCELOS M.P.; OLIVEIRA I.S.; AFFE H.M.J.; NASCIMENTO R.; MELO I.S.; ROQUE M.R.A.; ASSIS S.A. **An alternative method for screening lactic acid bacteria for the production of exopolysaccharides with rapid confirmation.** Ciênc. Tecnol. Aliment. 32:710-714, 2012.

RAO, A. V.; VENKATESWARLU, B. **Microbial ecology of the soils of Indian Desert.** Agriculture, Ecosystems and Environment, Amsterdam, v. 10, p. 361-369, 1983.

RHEINHEIMER, D. S.; MARTINAZZO, R.; GATIBONI, L. C.; KAMINSKI, J.; SILVA, L. S. **Amplitude no fósforo microbiano em um Argissolo em pastagem nativa submetida à roçada e à introdução de espécies forrageiras com fertilização fosfatada em diferentes épocas.** Acta Scientiarum. Agronomy, v. 30, n. 4, p. 561-567, 2008.

SILVA F. G.; BARBOSA, J. G.; ALMEIDA, R. B. ; SOUZA A. J. DE ; SOBRAL J. K; FREIRE, M. B. G. dos S. **Produção De Exopolissacarídeos Por Bactérias Associadas a Plantas De Atriplex Nummularia L.** UFRPE: Recife, 09 a 13 de dezembro, 2013.

SILVA, R. M. A. **ENTRE O COMBATE À SECA E A CONVIVÊNCIA COM O SEMIÁRIDO: TRANSIÇÕES PARADIGMÁTICAS E SUSTENTABILIDADE DO DESENVOLVIMENTO.** Tese de Doutorado – Universidade de Brasília. Brasília – DF, maio, 2006.

SILVI, S.; BARGHINI, P.; AQUILANTI, A.; JUAREZ-JIMENEZ, B.; FENICE, M. (2013) **Physiologic and metabolic characterization of a new marine isolate (BM39) of Pantoea sp.** producing high levels of exopolysaccharide. Microbial Cell Factories.

SMITH, F.W. **The phosphate uptake mechanism.** Plant and Soil, v. 245, n. 1, p. 105-114, 2002.

SOUCHIE, E. L.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M.; SAGGIN-JUNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R. **Solubilização de fosfatos em meio sólido e líquido por bactérias e fungos do solo.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 40, n. 11, p. 1149-1152, 2005.

SOUCHIE, E. L.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M.;SAGGIN-JUNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R. **Phosphate solubilization and synergism between P-solubilizing and arbuscular mycorrhizal fungi.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 41, n. 9, p. 1405-1411, 2006.

SYLVESTER-BRADLEY R.; ASKAWA, N.; LA TORRACA, S.; MAGALHÃES, F.M.N.; OLIVEIRA, L.; PEREIRA, R.M. **Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia.** Acta Amazônica 12:15-22, 1982.

VELLOSO, A.L.; SAMPAIO, E.V.S.B; PAREYN, F.G.S. **Ecorregiões: propostas para o bioma Caatinga.** Recife: PNE Associação Plantas do Nordeste: Instituto de Conservação Ambiental; The Nature Conservancy do Brasil, 76 p, 2002.

VESSEY, J. K. **Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers.** Plant and Soil, v. 255, n. 2, p. 571-586, 2003.

WHIPPS, J.M. **Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere.** Journal of Experimental Botany, v. 52, p. 487-511, 2001.

XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M.; RUMJANEK, N. G.; NEVES, M. C. P. **Tolerância de rizóbio de feijão-caupi à salinidade e à temperatura em condição in vitro.** Catinga (Mossoró, Brasil), v.20, n.4, p.01-09, Outubro/Dezembro, 2007.

**USO DA ARENA DE QUATRO ESCOLHAS NA ATRATIVIDADE DE  
*Acanthoscelides obtectus* (SAY) (COLEOPTERA: BRUCHIDAE)  
EM FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris*)**

# USO DA ARENA DE QUATRO ESCOLHAS NA ATRATIVIDADE DE *Acanthoscelides obtectus* (SAY) (COLEOPTERA: BRUCHIDAE) EM FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris*)

Paulo H. da Silva<sup>1\*</sup>; Sara Mayo<sup>1</sup>; Óscar González<sup>1</sup>, Álvaro Rodríguez<sup>1</sup>; Pedro A. Casquero<sup>1</sup>.

1. Grupo de Ingeniería y Agricultura Sostenible. Instituto de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Biodiversidad. Universidad de León, Av. Portugal 41, 24071 León, España.

<sup>1\*</sup>Bolsista Capes – Proc. 1252-13-5

E-mail autor: [psilva00@estudiantes.unileon.es](mailto:psilva00@estudiantes.unileon.es); Orientador: [pedro-casquero@unileon.es](mailto:pedro-casquero@unileon.es) (P.A. Casquero)

## 1. INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma das principais fontes de proteína, carboidratos, vitaminas, minerais e compostos fenólicos, sendo bastante utilizada na alimentação humana nas regiões tropicais e subtropicais (Oliani et al., 2011).

O gênero *Phaseolus* é uma cultura de origem americana, com dois centros de domesticação sendo uma andina e outra mesoamericana datadas aproximadamente de 700 A. C. Podemos encontrar no gênero mais de 55 espécies, porém destes apenas cinco foram domesticadas e cultivadas: o feijoeiro Comum (*Phaseolus vulgaris* e *Phaseolus polyanthus*); o feijão de Lima (*Phaseolus lunatus*); o feijão Ayocote (*Phaseolus coccineus*) e o feijão Terapi (*Phaseolus acutifolius*). (Miñambres, 2005).

O gênero *Phaseolus* já está distribuído em todo o mundo, desde o nível do mar até 3.000 m de altitude, nos Andes. A introdução na Espanha, com sua posterior propagação para o resto da Europa, foi proveniente de expedições ocorridas no século XVI (Miñambres, 2005). Na região noroeste da Espanha, se constitui em uma importante cultura, principalmente em León, La Coruña e Pontevedra consideradas as principais províncias produtoras (Casquero et al, 1994).

No Brasil, especificamente na região nordeste, não é diferente, o feijão também tem um valor econômico e social de extrema importância. De um lado, supre parte das necessidades alimentares da população de baixo poder aquisitivo. Do outro, possibilita trabalho e renda ao contingente de pequenos produtores que se dedicam ao plantio dessa cultura.

Os três maiores produtores mundiais de feijão são: Índia, Brasil e Mianmar (FAO 2015). Segundo o Ministerio da Agricultura Alimentação e Meio Ambiente (2015) a produção da Espanha em 2014 foi de 13.400t.

A baixa produtividade nessa cultura é devido a perdas promovida por diversos fatores, na fase de colheita e de pré colheita (Guzzo 2008). Os insetos pragas, dentre eles os bruquideos, são os maiores causadores de prejuízos na cultura do feijão (Graham & Ranallip 1997).

A ocorrência de pragas é um dos fatores limitantes dessa da cultura. A mesma é atacada por insetos em todos os estágios, desde o campo a até pós-colheita onde atacam os grãos armazenados, e podem causar danos significativos (Miranda et al, 2002).

A estimativa de perdas em armazenamento é de difícil comparação, pois variam em função do tipo do feijão e do tempo de armazenamento. Em geral, as perdas são conhecidas por estarem relacionadas diretamente com o tempo de armazenamento. Essas perdas pós colheita nos cereais armazenados, tem uma importância econômica que muitas vezes não é calculado a sua verdadeira dimensão, existindo perdas em quantidade e qualidade nos grão (Sandoval, 1984).

A maioria dos insetos que atacam os grão armazenados, alimenta-se do endosperma na fase inicial e posteriormente o embrião, o que causam uma redução acentuada na germinação (Puzzi, 1997). As sementes infestadas no campo, antes da colheita, apresentam um baixo índice de infestação, mas podem causar grandes prejuízos posteriormente, devido às demais gerações originadas desta pequena infestação inicial (Puzzi, 1997).

O caruncho do feijão *Acanthoscelides obtectus* é uma praga primaria de grãos armazenados, que provocam a depreciação comercial ou a destruição total dos grãos (Figura 1). Seu ataque pode começar no campo e estender-se aos armazéns (Gallo et al, 2002).



**Figura 1:** Semente de feijão riñon com larvas e pupas de *Acanthoscelides obtectus*

A ocorrência de *A. obtectus* predomina em zona produtoras de feijão de clima temperado e frio, acima de 1.500m (Weaver et al, 1992), ou quando se alcança em torno de 80% de umidade relativa (Moreno, 1992).

A aplicação de produtos químicos é o método de controle mais utilizado contra essa praga de armazenamento. Em decorrência de resíduos encontrados nos grão de feijão em decorrência do uso de produtos químicos, cada vez mais tem-se buscado métodos alternativos para o controle de *A. obtectus* (Mazzonetto & Vendramim 2003). Dentre esses métodos, inclui-se o uso de plantas bioativas em forma de pós, extratos e óleos no controle de insetos de armazenamento (Queiroga et al., 2012; Campos et al., 2012; Coitinho et al., 2011).

O uso de plantas bioativas no controle de pragas de produtos armazenados pode ter uma ação de repelência ou toxicidade sobre o inseto praga, resultando em um menor crescimento da população do inseto.

Diversos pesquisadores utilizaram diferentes tipos de arena em experimentos com plantas bioativas e resistência de genótipos de feijão, para a avaliação de índices de preferência e repelência com chace de escolha ao inseto *Acanthoscelides obtectus*.

Dutra *et al* (2012) utilizaram arenas com uma placa de isopor e recipientes plásticos para avaliar a repelência de *Acanthoscelides obtectus* a diferentes preparados de *Coriandrum sativum* em grão de feijão (Figura 2).

Pérez *et al* (2012) utilizaram arenas confeccionadas com placas Petri de plástico para avaliar o efeito repelente de produtos de *Piper aduncum* subsp. *ossanum* sobre *Lasioderma serricorne* (Figura 3)

Santos *et al* (2008), utilizaram arenas feitas com caixas de isopor para avaliar a repelência de extrato de *Ricinus comunis* L. sobre *Tenebrio molitor* e *Acanthoscelides obtectus* (Figura 4)

Procópio *et al* (2003), utilizaram arenas feitas com caixas plásticas circulares para avaliar a repelência de diversos pós de origem vegetal sobre *Sitophilus zeamais* (Figura 5).

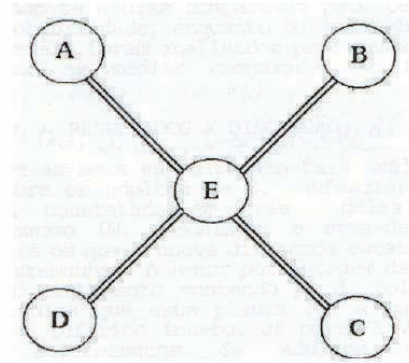
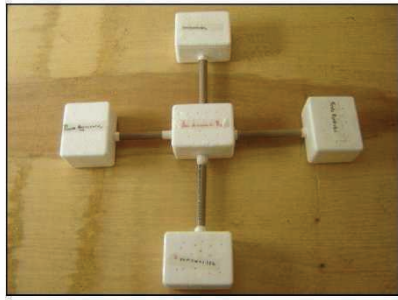
Souza (1988) estudou a resistência de genótipos de feijão ao *Acanthoscelides obtectus* usando uma arena de madeira com formato de bandeja circular, com 1 metro de diametro e 12 cm de bordadura coberta com tela de tecido fino e dividida em 40 setores.

Este ensaio tem como proposta comprovar a eficácia uso da arena de quatro escolhas, tipo olfatômetro com prolongamento, construída tomando como referência os modelos apresentados por Dutra *et al* (2012); Pérez *et al* (2012); Santos *et al* (2008) ; Procópio *et al* (2003) e Souza (1988) na atração de *Acanthoscelides obtectus* em feijão.



**Figura 2:** Arena utilizada por Dutra *et al* (2012). **Figura 3:** Arena utilizada por Pérez *et al* (2012)





**Figura 4:** Arena utilizada por Santos *et al* (2008) **Figura 5:** Arena utilizada por Procópio *et al* (2003)

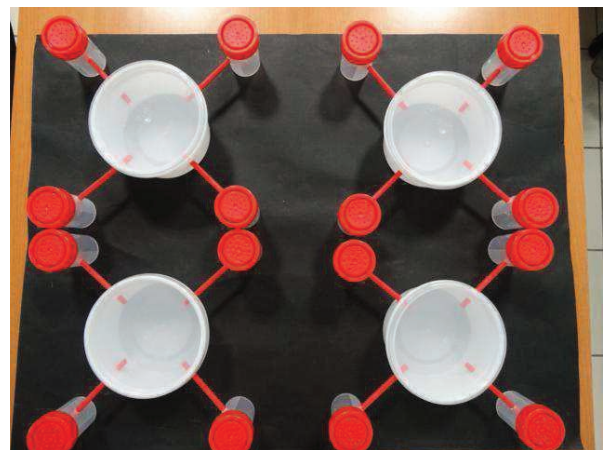
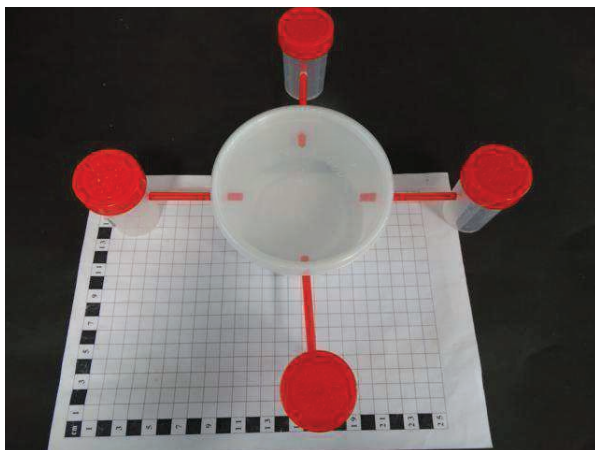
## 2.METODOLOGIA

O presente ensaio foi realizado no laboratório do grupo de engenharia e agricultura sustentável da escola superior e técnica de engenharia agrícola de Léon-Espanha

Para a avaliação da eficácia das arenas no nível de atração de *A. Obtectus* em feijão com chace de escolha, foram utilizados 4 tratamentos com doze repetições cada um.

Para realização deste experimento construiu-se arenas de quatro escolhas, tipo olfatômetro. As arenas foram montadas utilizando-se um recipiente central de plástico e quatro periféricos com as seguintes dimensões: central: 12cm de diâmetro e 6cm de altura, e os periféricos 4cm de diâmetro com 6,5cm de altura.

Tais recipientes, conforme se pode observar nas figuras 6 e 7, estão disposto de forma diagonal e conectados entre si através de tubos plásticos de 6cm de comprimento com 0,5 de diâmetro. Essa conexão possui um prologamento extra, que representa um grau de dificuldade de acesso dos insetos aos recipientes.



**Figura 6:** Arena

**Figura 7:** conjunto de arenas

Os insetos utilizados foram criados no próprio laboratório em potes de vidro com grãos de feijão e mantidos sob condições controladas ( $26 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e umidade ( $60 \pm 10\%$ ), visando à obtenção de insetos com idade conhecida.

No recipiente central, foram colocados 20 insetos adultos não sexados com idade de 1 a 6 dias. Em dois recipientes utilizaram-se atrativos: um contendo 10g de sementes de feijão branco variedade riñon, em outro 10g de farinha de feijão da mesma variedade dois completamente vazios. (figura 8).



**Figura 8:** Disposição do ensaio em câmara climatizada

As arenas foram colocadas em uma câmara climatizada com temperatura e umidade controlada. Depois de 48 horas, foi avaliada a atratividade dos insetos aos tratamentos.

Os valores obtidos no experimento foram submetidos à análise estatística de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

### **3.RESULTADO E DISCUSSÃO**

Apesar dos tubos conectivos possuírem um grau de dificuldade de acesso aos recipientes periféricos, a arena permitiu a mobilidade dos insetos.

Foi constatado uma quantidade significativa de insetos nos recipientes com grãos de feijão. No entanto, após 48 horas alguns insetos permaneceram na Arena central.

Esse dado leva a necessidade de observar se a permanência dos insetos no centro da Arena foi devido a dificuldade do modelo ou da baixa atratividade dos tratamentos.

Houve diferença estatística entre os tratamentos com grão de feijão, farinha de feijão e recipientes vazios (testemunha).

O tratamento com grãos de feijão apresentou atratividade média de 6,8 insetos ( $n=20$ ) enquanto que a média do tratamento com farinha de feijão foi de 3,9 e os recipientes vazios respectivamente 0,7 e 0,9, conforme demonstra a tabela abaixo.

**Tabela 1.** Atratividade dos insetos *Acanthoscelides obtectus* na arena de quatro escolhas

Tratamentos	<sup>1</sup> Médias	Erro padrão
Grãos de feijão	6,8a	(0,65)
Farinha de feijão	3,9b	(0,65)
Vazio1	0,7c	(0,65)
Vazio2	0,9c	(0,65)

<sup>1</sup> – Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Perez et al (2012), confirmou no teste com arena que *Piper aduncum* subsp. *ossanum* tinham efeito na mobilidade da praga, evitando infestar os grão tratados.

Dutra et al (2012) utilizando a arena concluiu que *Coriandrum sativum* foi capaz de alterar o comportamento de *Acanthoscelides obtectus* em grão de feijão causando repelência.

Santos et al (2008), também confirmou, através do uso de arena, a repelência do inseto *Tenebrio molitor* ao extrato de *Ricinus comunis*.

Procópio et al 2003, em seu experimento utilizando a arena, observou que o pó de folha de Eucalipto provocou repelência ao *Sitophilus zeamais*.

Finalmente Souza (1988) utilizando seu modelo de arena constatou que os genótipos de feijão Rosinha G-2 e Goiano Precoce são altamente suscetíveis ao ataque do caruncho *A. obtectus*.

#### 4.CONCLUSÃO

Os resultados preliminares desse ensaio permitem concluir que *Acanthoscelides obtectus* teve uma maior atração pelos grão de feijão em detrimento da farinha de feijão;

As arenas podem ser usadas com eficacia na avaliação da repelência ou atração do inseto *Acanthoscelides obtectus* nos testes com variedades de feijão e plantas bioativas;

Serão necessários mais estudos e avaliações da Arena construída, realizando ajustes ao modelo.

**PALAVRAS CHAVES:** *Acanthoscelides obtectus*, arena, preferência, repelência.

## **AGRADECIMENTOS**

Este ensaio só foi possível graças ao apoio da **CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** através da concessão de estudos doutorado pleno realizado na UNILEON – Universidade de León-Espanha.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Campos, A. C. T.; Radunz, L. L.; Radünz, A. L.; Mossi, A. J.; Dionell, R. G. & Ecker, S. L. Atividade repelente e inseticida do óleo essencial de carqueja doce sobre o caruncho do feijão. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. v.18, n.8, p.861–865, 2014

Casquero, P. A.; Ferrdás, M. S.; Ron Pedreira, A.M. Cultivo asociado judia-maíz – Su papel dentro de una agricultura sostenible en Galicia. *Agricultura: Revista agropecuaria*, 742: 397-401 (1994)

Coitinho, R. L. B. C.; Oliveira, J. V.; Gondim Junior, M. G. C.; Câmara, C. A. G. Toxicidade por fumigação, contato e ingestão de óleos essenciais para *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1885 (Coleoptera: curculionidae). *Ciência e Agrotecnologia*, v.35, p.172-178, 2011.

Dutra, M.; Farias, P. M.; Guagnini, R. A.; Vitorino, W. V.; Deboni, T. C. Repelência de *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae) a diferentes preparados homeopáticos de *Coriandrum sativum* em grão de *Phaseolus vulgaris* (L). 1º Simpósio de Integração Científica e Tecnológica do Sul Catarinenense – SICT-Sul. *Rev.Técnico Científica (IFSC)*, v.3, n°. 1 (2012).

FAO. Faostat database gateway. Food and Agricultural commodities production. Base 2012. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> Acesso em: Março 2015.

Gallo, D., et al. *Entomologia agrícola*. Piracicaba, FEALQ, 920p. 2002.

Guzzo, Elio Cesar. Seleção de genótipos de feijão *Phaseolus vulgaris* (L.) (Leguminosae) resistentes aos carunchos e *Acanthoscelides obtectus* (Boh.) e *Zabrotes subfasciatus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae) e seu uso associado com inseticidas botânicos. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008. 116p. (Tese – Doutorado em Ciências).

Graham, P. H.; Ranallip, P. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Field Crops Research*, v. 53, p.131-146, 1997.

Mazzonetto, F & J.D. Vendramim. 2003. Efeito de pós de origem vegetal sobre *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae) em feijão armazenado. *Neotrop. Entomol.* 32: 145-149.



Miñambres, M. S. La Alubia. Manual para su cultivo en agricultura ecológica. Monográficos Ekonekazaritza. Nº 4 – 2005.

Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. 2015. “Estadísticas.” (www.magrama.es)

Miranda, J.E.; Toscano, L. C.; Fernandes, M.G. Avaliação de diferentes Genótipos de *Phaseolus vulgaris* à *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera: Bruchidae). Bol san. Veg. plagas. 28: 571-576, 2002.

Moreno, M. E. 1992. La humedad, su medición e importancia en la conservación de los granos y semillas. *In*: Memorias del Curso Almacenamiento y Conservación de Granos y Semillas. Programa Universitario de Alimentos. Del 23 al 27 de noviembre de 1992. Instituto de Biología. Ciudad Universitaria. UNAM. Mexico. 1-34 pp.

Oliani, D.; Teixeira, C. M.; Bolinha, M. A. F. M.; Cassia, M. T.. Adubação foliar com boro e manganês na cultura do feijão. Revista, Uberaba, n. 8, p. 9-14, 2011.

Pérez, J.C.; Pino, O.; Ramírez, S.; Suris Moraima. Evaluación de productos naturales para el control de *Lasioderma serricorne* (F.) (Coleoptera: Anobiidae) sobre garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en condiciones de laboratorio. Rev. Protección veg. Vol. 27 Nº 1 (2012): 26-32.

Puzzi, D. 1977. Manual de armazenamento. Ed. Ceres. São Paulo, SP. 405 p

Procópio, S. O.; J. D. Vendramim; J. I. Ribeiro Júnior & J. B. Santos. 2003. Bioatividade de diversos pós de origem vegetal em relação à *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). Ciência e Agrotecnologia 27: 1231-1236.

Queiroga, M. de F. C.; Gomes, J. P.; Almeida, F. de A. C.; Pessoa, E. B.; Alves, N. M. C. Aplicação de óleo no controle de *Zabrotes subfasciatus* e na germinação de *Phaseolus vulgaris*, Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v.16, p.777-783, 2012.

Sandoval, M. 1984. Evite pérdidas en sus granos almacenados. Chile Agrícola. (90): 103-104.

Santos, H. O.; Poderoso, J. C. M.; Silva-Mann, R.; Andrade, T. M.; Dantas, P. C.; Ribeiro, G. T.; Carvalho, M. L. M. Potencial de repelência do extrato de mamona (*Ricinus comunis* L. ) A *Tenebrio molitor* e *Acanthoscelides obtectus*. III Congresso Brasileiro de Mamona - Energia e Ricinoquímica, 2008

Souza, Lindaurea, A. de. Resistência de dez Genótipos de feijão ao *Acanthoscelides obtectus* em laboratório. Pesq. agropec. bras., Brasília, 23: 15-18, jan. 1988.

Weaver, D.K., Dunkel, F.U., Cusker, S.L., and Puyuelde, LV. 1992. Oviposition patterns in two species of bruchids (Coleoptera:Bruchidae) as influenced by the dried leaves of *Tetradenia riparia* a perennial mint (Lamiales: Lamiaceae) that suppresses population size. Environmental Entomology. 21: 1121-1129.

**USO DE RESÍDUO DE SISAL NO CONTROLE DE *Fusarium oxysporum* F. SP. *cupense* EM BANANEIRA**



## USO DE RESÍDUO DE SISAL NO CONTROLE DE *FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *CUBENSE* EM BANANEIRA

Milene Caldas Silva<sup>1</sup>; Cristiane Duarte dos Santos<sup>1</sup>; Sara Samanta da Silva Brito<sup>2</sup>; Lydice Meire Sant'Anna Haddad<sup>3</sup>; Ana Cristina Fermino Soares<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Alunas de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Bolsistas FAPESB, E-mail: [milenecaldas@yahoo.com.br](mailto:milenecaldas@yahoo.com.br), [agrocristiane@yahoo.com.br](mailto:agrocristiane@yahoo.com.br);

<sup>2</sup> Aluna de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Bolsistas CAPES, E-mail: [sarassbrito@gmail.com](mailto:sarassbrito@gmail.com);

<sup>3</sup> Pós-Doc da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Bolsistas, Bolsista FAPESB; E-mail: [lydicemeira@yahoo.com.br](mailto:lydicemeira@yahoo.com.br)

<sup>4</sup> Professora orientadora, Doutora em Microbiologia, Curso de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, E-mail: [ferminosoares@gmail.com](mailto:ferminosoares@gmail.com)

**RESUMO:** Atualmente a produtividade de banana no país vem declinando devido a ocorrência do Mal-do-Panamá, causado pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E.F. Smith) Snyder & Hansen. Para o controle desta doença o uso de produtos fitossanitários sintéticos tem se intensificado porém a longo prazo, além do surgimento de isolados fitopatogênicos resistentes às substâncias químicas utilizadas, os resultados negativos para a sociedade e para o meio ambiente são evidentes. Diante disso, o controle de fitopatógenos com produtos a exemplo do uso do resíduo líquido do desfibramento das folhas de sisal constitui-se numa estratégia e interesse econômico e ecológico bastante promissor. Em função disso objetivou-se avaliar a inibição do crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *Cubense* utilizando o resíduo de sisal fresco e fermentado em diferentes concentrações. O resíduo (mistura de sólido e líquido) de sisal foi obtido no momento do desfibramento das folhas, uma parte do resíduo líquido foi deixado a temperatura ambiente por 3 a 4 dias para fermentar e a outra parte foi imediatamente congelada, para os ensaios in vitro, ambos os resíduos fresco e fermentado foram utilizados nas concentrações de 0% (controle), 5%, 10%, 15%, 20% e 25%, incorporados ao meio de cultura BDA. A avaliação se deu através do acompanhamento do crescimento micelial. As medições foram feitas a cada dois dias, até a colônia do tratamento testemunha atingir o seu crescimento micelial máximo, o qual contabilizou oito dias de avaliação. O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com esquema fatorial 2 x 6, sendo dois tipos de resíduo e seis concentrações, com 10 repetições. Após à análise de variância, os resultados foram submetidos à análise de regressão. *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* é inibido pelo resíduo líquido fermentado de sisal; a concentração de 25% proporcionou menor crescimento micelial.

**Palavras chave:** *Agave sisalana* Perrine, controle alternativo, Mal do Panamá

**ABSTRACT:** Currently the banana productivity in the country has declined due to the occurrence of Mal – do - Panamá, caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E. F. Smith) Snyder & Hansen. To control this disease the use of synthetic pesticides has however intensified the long term, beyond the emergence of resistant pathogenic isolates the chemicals used, the negative results for society and the

environment are evident. Therefore, control pathogens with products such as the use of liquid waste from shredding of sisal leaves up is a strategy and economic and ecological interest quite promising. As a result aimed to evaluate the inhibition of mycelial growth of *F. oxysporum* f. sp. *Cubense* using fresh and fermented sisal residue at different concentrations. The residue (mixture of solid and liquid) sisal was obtained at the time of shredding leaves a portion of the liquid residue was left at room temperature for 3 to 4 days to ferment and another part was immediately frozen for vitro both fresh and fermented waste were used in concentrations of 0% (control), 5%, 10%, 15%, 20% and 25%, incorporated into BDA culture medium. The evaluation was made by following the mycelial growth. Measurements were made every two days until the colony of control treatment reaches its maximum mycelial growth, which accounted for eight days of evaluation. The test was conducted in a completely randomized design with factorial 2 x 6, two types of residue and six concentrations, with 10 repetitions. After the analysis of variance, the results were submitted to regression analysis. *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* is inhibited by fermented liquid waste sisal; the concentration of 25% provided less mycelial growth.

**Key-Words:** *Agave sisalana* Perrine, Alternative control, Mal do Panamá

## Introdução

A banana é um dos frutos mais produzidos e consumidos em todo o mundo, com uma produção mundial de aproximadamente 106,5 milhões de toneladas. O Brasil ocupa a quinta posição mundial, com uma produção de 7,3 milhões de toneladas de frutos (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO, 2013). A região nordeste é a maior produtora (39,1%), seguida das regiões sudeste (31,7%), sul (13,5%), norte (11,8%) e centro-oeste (3,5%), em uma área estimada de 514.366 ha (IBGE, 2013).

A produção brasileira apresenta um perfil muito diversificado em relação ao nível tecnológico adotado pelos produtores. Segundo Carmelio (2010) é possível encontrar desde os pequenos agricultores altamente tecnificados, tal como ocorre em Bom Jesus da Lapa- BA, a pequenos agricultores sem adoção de tecnologia de plantio e manejo e que têm outras culturas como base econômica, a exemplo do cacau na região de Mutuípe – BA.

Apesar da importância econômica na região Nordeste, a cultura vem tendo perdas na sua produtividade devido, principalmente, a ocorrência do Mal-do-Panamá, causado pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E.F. Smith) Snyder & Hansen. Segundo MENEZES & OLIVEIRA (1993) a murcha de fusário é uma doença amplamente distribuída em vários hospedeiros e regiões geográficas do mundo. O impacto causado por esse fungo é extremamente severo, ocasionando o declínio da atividade, com graves reflexos para a economia da região.

A doença causa a morte prematura de plantas adultas, próximo ou durante o florescimento, e as perdas podem atingir 100% da produção (PEREIRA et al., 2005). WARUMBY et al. (2004) descreve que os sintomas da doença pode ser observado interno e externamente na planta. Externamente ocorre o amarelecimento e seca progressiva das folhas e internamente observa um escurecimento vascular, mais acentuado nas partes laterais do pseudocaulo.

Cordeiro (2013) ressalta a importância das mudas para manter a qualidade fitossanitária do bananal, uma vez que, além do Mal do Panamá, outros problemas com nematoides, vírus, a broca-do-rizoma, o moko, e a podridão-mole podem ser levados nas mudas. Uma alternativa é a utilização de mudas micropropagadas em condições *in vitro*, que garantem maior vigor, uniformidade e evitam a disseminação de doenças.

O uso de produtos fitossanitários sintéticos no controle das doenças na agricultura tem se intensificado (VENTUROSOSO et al., 2010). No entanto, a longo prazo, além do surgimento de isolados fitopatogênicos resistentes às substâncias químicas utilizadas, os resultados negativos para a sociedade e para o meio ambiente são evidentes, devido à poluição ambiental e riscos a saúde humana e animal causados pelos resíduos químicos (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000). Diante disso, o controle com produtos alternativos aos produtos sintéticos atualmente comercializados, a exemplo do uso do resíduo líquido do desfibramento das folhas de sisal, para o controle de fitopatógenos constitui-se numa estratégia e interesse econômico e ecológico bastante promissor, tanto para os produtores de banana quanto para a região produtora de sisal na região semiárida da Bahia.

O sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm) é uma planta tropical, que engloba um grupo bem definido de plantas de consistência herbácea e escapo floral saliente, que pode chegar até doze ou mais metros de altura (SILVA & BELTRÃO, 1999). O Estado da Bahia é o maior produtor de sisal do Brasil e responde por 94% de toda a produção nacional. Tem papel fundamental na economia do estado da Bahia, constituindo a base da agricultura familiar no semiárido baiano, destacando-se principalmente pela geração de emprego e renda, uma cadeia produtiva fundamental para a redução do êxodo rural nas regiões semiáridas (CNA, 2010).

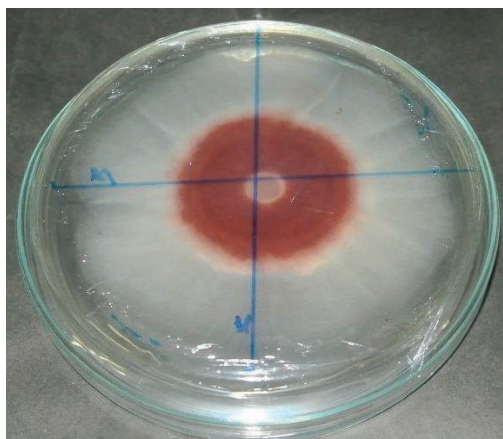
É durante o processo de extração da fibra das folhas de sisal que o extrato é produzido, sendo que a fibra representa apenas 4% da folha de sisal e o restante 96% é composto de resíduos sólidos e líquidos, denominados de mucilagem e suco, que normalmente são descartados ou utilizados em pequena quantidade na adubação dos plantios e na alimentação animal (OASHI, 1999; SUINAGA et al., 2006). Podemos encontrar na sua composição química vários compostos orgânicos, como o ácido oxálico, a cortisona e a saponina, alcalóides, compostos fenólicos, flavanóides, taninos entre outras (CHEN et al., 2011).

Essas substâncias são relatadas nos mecanismos de defesa das plantas, além de terem atividade biocida que pode causar efeitos de irritação, antibiose ou toxicidade (PIZARRO, 1999; WILKOMIRSKI et al., 1975, CHEN et al., 2011). Vários estudos demonstram a eficiência desses extratos no controle de nematóides e fungos como *Botrydiploia theobromae*, *Aspergillus* sp. e *Fusarium* sp. (DOMINGUES et al., 2010; GONÇALVES JÚNIOR, 2002; PIZARRO 1998; BARRETO et al., 2010; MORAIS, 2004; VERASTEGUI et al., 2008, FÁBIO et al., 2014).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a inibição do crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *Cubense* utilizando o resíduo de sisal fresco e fermentado em diferentes concentrações.

## **Metodologia**

O experimento foi realizado no laboratório de Microbiologia Agrícola na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, campus Cruz das Almas - BA. O isolado utilizado de *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *cupense* foi disponibilizado pela Micoteca da EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, sendo repicado em placas de Petri contendo meio batata dextrose ágar (BDA) por um período de sete dias, a temperatura de 28°C nos ensaios (Figura 1).



**Figura 1:** Colônia de *Fusarium oxysporum* Schlect f. sp. *Cupense* em meio BDA.

O resíduo (mistura de sólido e líquido) de sisal foi obtido no município de Valente, Bahia, em área de produtor de sisal, no momento do desfibramento das folhas. O resíduo foi colocado em sacos de rafia e peneirado para retirada da parte líquida. A parte líquida foi transferida para sacos de plástico, sendo estes vedados e colocados imediatamente em caixas de isopor com gelo para o transporte para o laboratório.

No laboratório, uma parte do resíduo líquido foi deixado a temperatura ambiente por 3 a 4 dias para fermentar e a outra parte foi imediatamente congelada. Para os ensaios *in vitro*, ambos os resíduos fresco e fermentado foram utilizados nas concentrações de 0% (controle), 5%, 10%, 15%, 20% e 25%, incorporados ao meio de cultura BDA, diminuindo-se o volume de água adicionado de acordo com a quantidade de extrato que será adicionado após isso a mistura é esterilizada em autoclave (figura 2).

Discos de 5 mm de diâmetro da borda de culturas de *F. oxysporum*, crescidas por sete dias a temperatura ambiente (28°C) foram adicionados as placas de Petri e acompanhou-se o crescimento micelial, por mensuração do diâmetro da colônia, utilizando-se uma régua milimetrada. As medições foram feitas a cada dois dias, até a colônia do tratamento testemunha atingir o seu crescimento micelial máximo, o qual contabilizou oito dias de avaliação.





**Figura 2:** Resíduo de sisal fresco (A) e fermentado (B) utilizado no bioensaio.

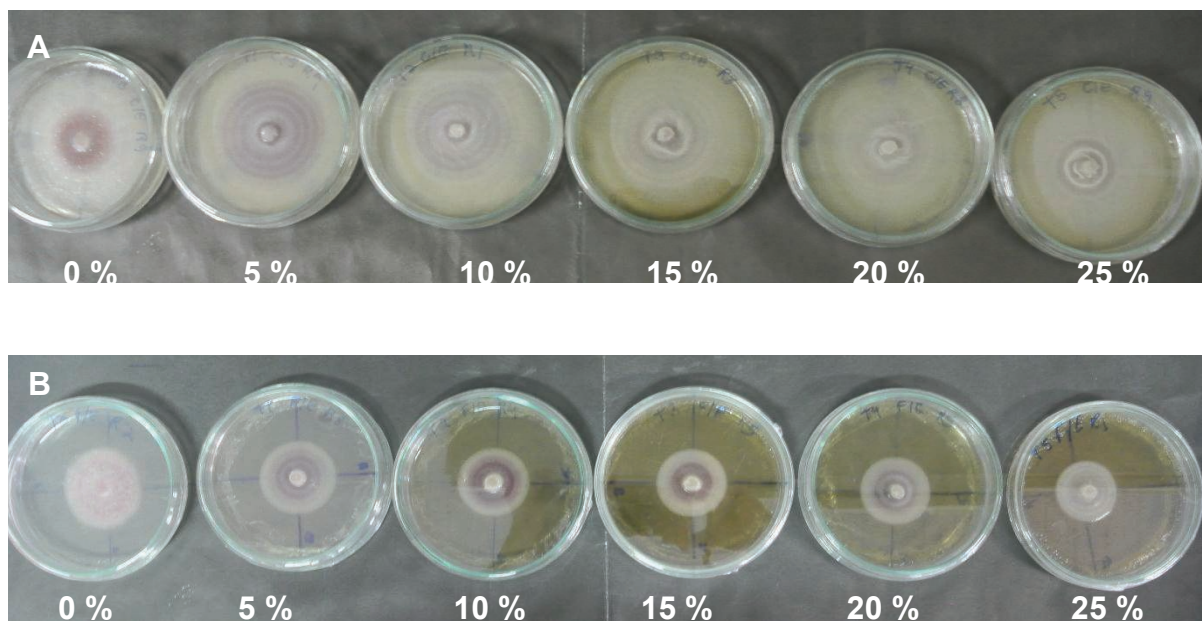
O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com esquema fatorial 2 x 6, sendo dois tipos de resíduo e seis concentrações, com 10 repetições. Após à análise de variância, os resultados foram submetidos à análise de regressão e as médias comparadas pelo teste F a 5% de probabilidade, mediante o uso do programa SISVAR versão 5.3 (FERREIRA, 2011).

### Resultados e Discussão

Foram observadas diferenças significativas entre os resíduos fresco e fermentado, tendo o resíduo fermentado proporcionado as menores médias de diâmetro do micélio, reduzindo assim o crescimento do *F. oxysporum* f. sp. *Cubense* (Figura 3). Entre as concentrações utilizadas do resíduo fermentado, podemos destacar a de 25% que causou maior inibição do fungo, reduzindo em 22% o tamanho da colônia (Figura 4).

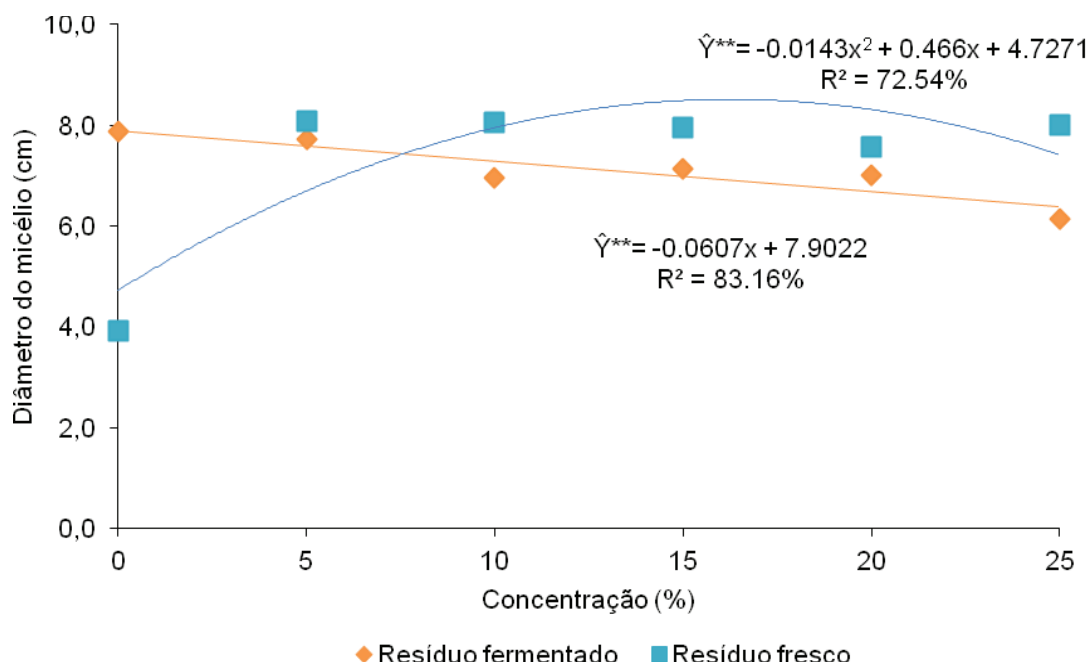
Entretanto o resíduo fresco proporcionou um aumento no crescimento micelial de *F. oxysporum* em todas as concentrações, não sendo indicado o seu uso no controle do fungo.

Não foi observado a presença de clamidósporos em nenhum dos tratamentos no último dia de avaliação. É possível que a esporulação não tenha ocorrido devido a ação fungistática e/ou fungicida do extrato de sisal tanto fresco como fermentado.



**Figura 3:** Bioensaio para avaliação do efeito de resíduo de sisal fresco (A) e fermentado (B) em diferentes concentrações no crescimento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*.





**Figura 4:** Efeito das diferentes concentrações do resíduo de sisal sobre o crescimento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*.

Isso pode ter ocorrido devido a presença de menores concentrações de açúcares disponíveis para o crescimento do fungo, e também devido à formação de substâncias tóxicas ao crescimento do *F. oxysporum* durante o processo de fermentação. Silva (2011) ao avaliar o resíduo de sisal fermentado no controle de *Aspergillus niger* observou que o líquido tem efeito biofungicida e controla o crescimento micelial e esporulação do fungo.

Já o extrato aquoso do resíduo fresco de sisal segundo Soares et al. (2007) estimula a germinação de esporos de *A. niger*. Moraes et al. (2010) avaliando o efeito de resíduo de sisal sobre *F. oxysporum* observaram a inibição da germinação de conídios e crescimento micelial quando utilizada a concentração de 40%. O suco curtido de *Agave sisalana* L. controlou os fungos *Aspergillus* sp. e *Fusarium* sp., em torno de 47,2 e 39,5%, respectivamente (BARRETO et al., 2010).

O extrato aquoso de *Agave sisalana* Perrine também teve efeito inibitório na germinação de conídios e impedimento do crescimento micelial em *Fusarium oxysporum*, reduzindo a intensidade de murcha em feijão vagem (MORAIS, 2004). Barreto (2003) observou menor incidência do fungo *Fusarium* sp após o tratamento de sementes de algodão com extratos frescos de sisal. No presente trabalho, não foram utilizadas concentrações do resíduo acima de 25 % devido ao efeito fitotóxico do resíduo em plantas de bananeira (JESUS et al., 2015).

O efeito tóxico do resíduo do sisal sobre o crescimento de microrganismos também tem sido demonstrado em outros trabalhos. Garcia et al. (1999) avaliando o potencial antimicrobiano de várias espécies do gênero *Agave*, observaram que o resíduo apresenta substâncias naturais biocidas com propriedades antimicrobianas para bactérias gram-positivas e gram-negativas. Segundo Oliva Neto et al. (2005) um dos

componentes do resíduo de sisal mais abundantes são as saponinas que são formadas por cadeias de açúcares. A atividade biológica destas está relacionada com a sua capacidade de formar complexos com esteroides, proteínas e fosfolipídios de membranas celulares, o que causa a ruptura das estruturas dos compostos e aumenta a permeabilidade celular (SCHENKEL et al., 2010; FRANCIS et al., 2002).

French (1992) sugere que a difusão de traços de compostos voláteis pode induzir ou inibir a germinação ou o crescimento, ou desencadear alterações no desenvolvimento de plantas e fungos. A redução do potencial de inibição dos compostos constituintes dos extratos ou óleos vegetais pode estar atribuída à instabilidade na presença de ar, luz, calor, umidade e metais modificando a atmosfera no interior das placas de petri (SIMÕES et al., 2000).

## **Conclusão**

O resíduo líquido fermentado de sisal inibe o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*;

A concentração de 25% do resíduo proporcionou menor crescimento micelial do *Fusarium*.

O resíduo de sisal é um subproduto bastante promissor para o desenvolvimentos de novos biocidas, sendo necessário mais investimentos em pesquisa para avaliar o potencial de desenvolvimento de um bioproduto a base de resíduo de sisal como alternativa para o controle do Mal-do-Panamá.

## **Agradecimentos**

À EMBRAPA pela disponibilização do microrganismo;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia pela infraestrutura para realização da pesquisa;

À FAPESB e a CAPES pelo financiamento dos projetos e concessão das bolsas aos alunos de Pós-graduação.

## **Referências**

- ARGENTIERI, M.P., D'ADDABBO, T., TAVA, A., AGOSTINELLI, A., JURZYSTA, M., AVATO, P. (2008) Evaluation of nematicidal properties of saponins from *Medicago* spp. *Eur J Plant Pathol* 120:189–197. doi:10.1007/s10658-007-9207-8
- BARRETO, A. F. Efeito de suco de agave sobre a qualidade fisiológica e a incidência de fungos em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L. r. (*latifolium* Hutch). 2003, 19f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2003.
- BARRETO, A. F., ARAÚJO, E., BELTRÃO, N. E. M.A., DIONÍZIO, G. Análise sanitária de sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L. r. *latifolium* Hutch) da cultivar brs 201 tratadas com extrato de *Agave*. Disponível em:[http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/trabalhos\\_cba4/148.pdf](http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/trabalhos_cba4/148.pdf).

BOTURA, M.B., SANTOS, J.D.G., SILVA, G.D., LIMA, H.G., OLIVEIRA, J.V.A., ALMEIDA, M.A.O., BATATINHA, M.J.M., BRANCO, A. (2013) In vitro ovicidal and larvicidal activity of *Agave sisalana* Perr. (sisal) on gastrointestinal nematodes of goats. *Vet Parasitol* 192:211–217. doi:10.1016/j. vetpar.2012.10.012

CARMELIO, E.C. Fruticultura-banana. Editorial Banco do Brasil, Brasília-DF, p. 11-13, 2010.

CHEN, P.Y.; CHEN, C.H.; KUO, C.C.; LEE, T.H.; KUO, Y.H.; LEE, C.K. Cytotoxic steroidal saponins from *Agave sisalana*. *Planta Med* 77: 929–933, 2011. doi:10.1055/s-0030-1250672

CORDEIRO, Z.J.M. Sistema de produção de banana para o Estado do Pará. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Sistema de Produção. Versão eletrônica. Jan.2013.

CNA. Sisal: problemas e soluções. Disponível em: <<http://www.cna.org.br>>. Acesso em: 25/04/2014.

DOMINGUES, L.F., BOTURA, M.B., CRUZ, A.C.F., YUKI, C.C., SILVA, G.D., COSTA, M.S., MOREIRA, E.L.T., MENESES, I.D.S., BRANCO, A., ALMEIDA, M.G.A.R., ALMEIDA, M.A.O., BATATINHA, M.J.M. (2010) Evaluation of anthelmintic activity of liquid waste of *Agave sisalana* (sisal) in goats. *Revista Brasileira de Parasitologia* 19: 270–272. doi:10.1590/S1984-29612010000400018

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

FRANCIS, G., KEREM, Z.H.P.S., BECKER, K. (2002) The biological action of saponins in animal systems. A review. *Brit Journal of Nutrition* 88:587–605. doi:10.1079/BJN2002725

FRENCH, R. C.; Volatile chemical germination stimulators of rust and other fungal spores, *Mycologia*, Vol. 84, n. 3, p. 277-288, 1992.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). FAOSTAT: Produção. Roma, 2013. Disponível em: <http://faostat.fao.org>. Acesso em: 17 mar. de 2015.

GARCIA, M. D. et al. Antiinflammatory activity of *Agave intermixta* Trel. and *Cissus sicyoides* L., species used in the caribbean traditional medicine. *Journal of Ethno pharmacology*, v.71, p.395-400, 1999.

GONÇALVES JÚNIOR, H.; Avaliação de extratos de *Agave* no controle de galhas radiculares do tomateiro. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal da Paraíba: Areia, 43p., 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Sistema IBGE de recuperação automática. 2013. Disponível em <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp>>. Acesso em: 17 mar. de 2015.

JESUS, F.N.; DAMASCENO, J.C.A., BARBOSA, D.H.S.G., MALHEIRO, R., PEREIRA, J.A., SOARES, A.C.F. Control of the banana burrowing nematode using sisal extract. *Agronomy for Sustainable Development*, December, 2014.

MENEZES, M.; OLIVEIRA, S.M.A. Fungos fitopatogenicos. Recife: Imprensa Universitaria da UFRPE, 1993, 277p.

MORAIS, M.S. Efeitos de dois extratos vegetais sobre o desenvolvimento de *Fusarium oxysporum* e da incidência da murcha em feijão-vagem. 48f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal da Paraíba: Areia, 48p., 2004.

MORAIS, M.S.; ARAÚJO, E.; ARAÚJO, A.C.; BELÉM, L.F. Eficiência dos extratos de alho e agave no controle de *Fusarium oxysporum* S. *Revista Brasileira de Agroecologia* 5(2): 89-98, 2010.

OASHI, M.C.G. Estudo da cadeia produtiva como subsídio para pesquisa e desenvolvimento do agronegócio do sisal na Paraíba. Tese (Doutorado em

Engenharia da Produção) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia da Produção da Universidade Federal de Santa Catarina, 1999.

PIZARRO, A.P.B.; Utilização do extrato de agave *Americana Linnaeus* no controle de *Boophilus microplus*, Veterinária Notícia, v.4, n.1, 1998.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M.L. (2010) Saponinas. In: Simões CMO, SCHENKEL EP, GOSMANN G, MELLO JCP, MENTZ LA, PETROVICK PR (eds) Farmacognosia: da planta ao medicamento. Editora da UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, pp 711–740

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R. Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.; ROMEIRO, R.S. (Ed.). Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba: FEALQ, 2005. p.125-32.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. Revista Floresta, Curitiba, v.30, p.129-137, 2000.

SILVA, O.R.R.F.; BELTRÃO, N.E.M. O agronegócio do sisal no Brasil. Brasília. DF. Embrapa. 205 p.,1999.

SILVA, R.M.; SOARES, A.C.F.; Sá, J.O.; DAMASCENO, C.L.; CARMO, C.O.; SACRAMENTO, A.C.S.C. Formulação de *Trichoderma* spp. para o biocontrole da podridão vermelha do sisal. In: Reunião Anual de Ciência, Tecnologia, Inovação e Cultura no Recôncavo da Bahia, 2011, Cruz das Almas. Reunião Anual de Ciência, Tecnologia, Inovação e Cultura no Recôncavo da Bahia, 2011.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.; Farmacognosia: da planta ao medicamento, Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2000. Cap.18. 1102p.

SUINAGA, F.A; SILVA, O.R.R.F.; COUTINHO, W.M. Cultivo de Sisal na região Semi-árida do nordeste brasileiro. Campina Grande, EMBRAPA Algodão, p 42, 2006.

VENTUROSO, L.R.; BACCHI, L.M.A.; GAVASSONI, W.L.; PONTIM, B.C.A.; CONUS, L.A. Influência de diferentes metodologias de esterilização sobre a atividade antifúngica de extratos aquosos de plantas medicinais. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu, v.12, n.4, p.499-505, 2010.

VERASTEGUI, A.; VERDE, J.; HEREDIA, N.; ORANDAY, A.; RIVAS, C. Species of Agave with antimicrobial activity against selected phatogenic bacteria and fungi. World Journal of Microbiology and Biotechnology., v.24, p.1249-1252, 2008.

WARUMBY, J.F.; COÊLHO, R.S.B.; LINS, S.R. O Principais doenças e pragas em flores tropicais no Estado de Pernambuco. Sebrae, Recife, 2004, 98p.

# Ciências Biológicas

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA DOS EXTRATOS  
DE *Lippia thymoides* NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE  
TOMATE**



## **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA DOS EXTRATOS DE *Lippia thymoides* NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE TOMATE.**

MUNIZ, Lenaldo de Oliveira<sup>1</sup>, BRANDÃO, Hugo Neves<sup>2</sup>, LIMA, Adriano Cosme Pereira<sup>3</sup>, FERRAZ, Marisol<sup>3</sup>, LIMA, Andressa Priscila Piancó Santos<sup>4</sup>, PAIXÃO, Juliana Azevedo<sup>4</sup>, SANTOS, Uiliane Soares dos.<sup>4</sup> .

1- Prof. Dr. Departamento de agronomia, UEFS. lenaldo.uefs@gmail.com.

2- Prof. Dr. Departamento de Saúde, UEFS. hugo@uefs.br.

3- Doutorandos em Recursos Genéticos Vegetais - Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Feira de Santana. alima34@gmail.com, marisolferraz@terra.com.br.

4- Mestrandas em Recursos Genéticos Vegetais - Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Feira de Santana. andressapianco@gmail.com, juli.azevedo87@gmail.com, uilianesoares@hotmail.com.

### **INTRODUÇÃO**

As plantas competem por diversos fatores, como luz, água e nutrientes, o que revela uma concorrência constante entre as espécies que vivem numa comunidade. Essa concorrência irá contribuir para a sobrevivência das espécies no ecossistema e, algumas, desenvolvem mecanismos de defesa que se baseiam na síntese de metabólitos secundários, que são liberados no ambiente e que irão interferir em alguma etapa do ciclo de vida de uma outra planta (SAMPIETRO, 2003).

Durante o desenvolvimento da agricultura os produtores passam por diversos problemas que podem afetar a produção, como pragas e doenças, e um dos mais importantes o crescimento de ervas daninhas na área do plantio. As ervas daninhas interferem durante todo o período de germinação, crescimento e produção das culturas agrícolas, competindo com água, luz, CO<sub>2</sub>, nutrientes, reduzindo a produção tanto qualitativa como quantitativa (FERREIRA, *et. al.*, 2006).

Ao longo de muitos anos têm-se usado para o manejo e controle das ervas daninhas a mecanização agrícola, porém sem muito sucesso devido ao seu rápido crescimento. Outra forma de controle ainda muito usado pelos agricultores é o uso de produtos químicos, eficiente, porém trazem consequências negativas para o meio ambiente e pode causar sérios riscos de contaminação à saúde humana pelo seu poder tóxico.

Devido aos problemas ambientais e de saúde pública cada vez mais tem sido realizados estudos para identificação de alternativas que visem minimizar estes problemas causados pelo uso dos defensivos químicos na agricultura. Uma das alternativas técnicas que tem sido destaque nos últimos anos no controle de infestação de ervas daninha é o poder da alelopatia. Esta técnica consiste no aproveitamento de compostos químicos provenientes do metabolismo secundário, que estão relacionados ao mecanismo de defesa contra ataques de microrganismos e insetos, liberados pelas plantas a partir de folhas e raízes em decomposição, que podem promover efeitos estimulatórios ou inibitórios na

germinação, crescimento e desenvolvimento de outras plantas próximas. Estes efeitos aleloquímicos têm sido usados como alternativa ao uso dos defensivos agrícolas (FERREIRA; ÁQUILA, 2000; MENDONÇA *et al.*, 2011). Num sentido mais amplo, os efeitos alelopáticos referem-se tanto à inibição quanto ao estímulo de desenvolvimento de outros organismos (Rice, 1984).

Atualmente por meio de técnicas fitoquímicas de extração, isolamento, purificação e identificação de produtos naturais têm contribuído bastante para um maior conhecimento desses compostos secundários (ALVES *et al.*, 2004). Teste feito em laboratórios com a *Lactuca sativa* L. (alface), *Lycopersicon esculentum* Miller (tomate) e *Cucumis sativus* L. (pepino) observou-se que existem plantas que são mais resistentes e tolerantes aos metabólitos secundários e que são consideradas alelopáticas. Para que seja indicada como planta teste, a espécie deve apresentar germinação rápida e uniforme, e um grau de sensibilidade que permita expressar os resultados sob baixas concentrações das substâncias aplicadas (FERREIRA & ÁQUILA, 2000).

Dentre as plantas que apresentam efeito alelopático estão às espécies do gênero *Lippia*, pertencente à família Verbenaceae. A família Verbenaceae ocorre em regiões tropicais, subtropicais e temperadas da América, África e Índia, sendo as subtropicais da América do Sul, um dos centros de maior diversidade genética (SANDERS, 2001), e reúne aproximadamente 36 gêneros e 1000 espécies (SOUZA; LORENZI, 2005). No Brasil, a família Verbenaceae é representada principalmente pelos gêneros *Verbena*, *Aloysia*, *Clerodendrum*, *Lantana* e *Lippia*, cujos Estados de maior ocorrência são Bahia, Sudeste, Mato Grosso do Sul, Paraná e no cerrado goiano (LORENZI, 1998). Estudos de constituintes químicos presentes nas raízes, folhas e flores, realizados com algumas espécies desta família, relataram atividades antimicrobiana, antiinflamatória, anticonvulsivante, antiasmática, antigripal, antiespasmódico e estomáquico (SOUZA; LORENZI, 2005; MARTINS *et al.*, 2000; RAO *et al.*, 2000). As espécies do gênero *Lippia* apresentam uma vasta lista de propriedades farmacológicas (NETO *et al.*, 2010), reunindo aproximadamente 250 espécies de ampla ocorrência nos diferentes biomas do Brasil (PASCUAL *et al.*, 2001; VICCINI *et al.*, 2006), das quais 74 são endêmicas (SALIMENA *et al.*, 2010).

A importância econômica do gênero *Lippia* está associada, principalmente, à constituição química das espécies (PASCUAL *et al.*, 2001; SANTANA *et al.*, 2008), além de serem exploradas pelas indústrias de aromáticos e perfumes devido à presença de óleos essenciais em seus tricomas glandulares, como timol e carvacrol (YAMAMOTO *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2008). Dentre as espécies deste gênero está a *Lippia thymoides*, conhecida como alecrim-do-campo ou alecrim-do-mato, que é indicada como digestivo e antirreumático (ALMEIDA, 2011), e apresenta constituintes fenólicos que podem estar relacionados à atividade antioxidante (SILVA *et al.*, 2012). Pinto (2008) em estudo com esta espécie identificou a presença de esteroides, saponinas, terpenos, cumarinas e ácidos fenólicos.

Este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito alelopático sobre a germinação de sementes de tomate em diferentes extratos de *Lippia thymoides* em condições laboratoriais.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Obtenção de extratos**

As folhas e flores das espécies de *Lippia thymoides* foram coletadas de plantas provenientes da Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). Após a coleta, as plantas foram secas e suas folhas e flores foram destacadas e conduzidas ao laboratório de extração (LAEX). Em seguida foram pesadas 512g de massa fresca de *Lippia thymoides*. O material foi triturado e transferido para o erlenmeyer com auxílio de um funil e adicionado 2L de metanol, a maceração com metanol foi realizada com o auxílio de banho ultrassom, previamente aquecido (10 min), durante 40 minutos, sob uma temperatura de 30°C e 40KHZ, para a obtenção do extrato bruto. O extrato bruto foi concentrado em evaporador rotativo a vácuo à temperatura de 50°C para a evaporação do metanol. O resíduo de solvente do extrato metanólico foi retirado por evaporação em estufa a 60°C.

### **Fracionamento do extrato bruto**

O extrato metanólico foi particionado por partição líquido-líquido em funil de separação entre Hexano: MeOH/H<sub>2</sub>O, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH/H<sub>2</sub>O e AcOEt:H<sub>2</sub>O para a obtenção das partições Hexânica (Hex), Diclorometânica (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) e Acetato de Etila (AcOEt).

### **Teste de germinação**

Os testes de germinação e crescimento foram realizados no Laboratório de Germinação da Universidade Estadual de Feira de Santana em Novembro de 2014. Utilizou-se sementes comerciais de tomate *Lycopersicon esculentum*. Os testes foram realizados em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, revestidas com duas folhas de papel germitest® previamente autoclavadas a 120°C por 30 minutos. Para a diluição dos extratos utilizou-se o detergente Tween 80 em quantidades diferentes para cada extrato, para 2,83g de extrato bruto (metanólico), 11,49g de extrato hexânico, 3,151g de extrato acetato de etila e 10,88g de extrato diclorometano, foram utilizadas 25, 35, 170 e 220 de Tween 80, respectivamente, e após a diluição foi acrescentado 50 mL de água destilada. Como controle positivo utilizou-se apenas água destilada para cada placa e como controles negativos utilizou-se soluções de 25, 35, 170 e 220 gotas de Tween 80 (utilizando pipeta pasteur) 50 mL de água. Em cada placa foi adicionado inicialmente 1.500 µL de cada extrato, água destilada e solução de Tween 80 a serem testados.

Foram semeadas 50 sementes por placa. Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizados com quatro repetições. Os ensaios de germinação foram realizados em câmara de germinação do tipo BOD. A taxa de germinação foi verificada a cada 24 horas durante sete dias possibilitando a

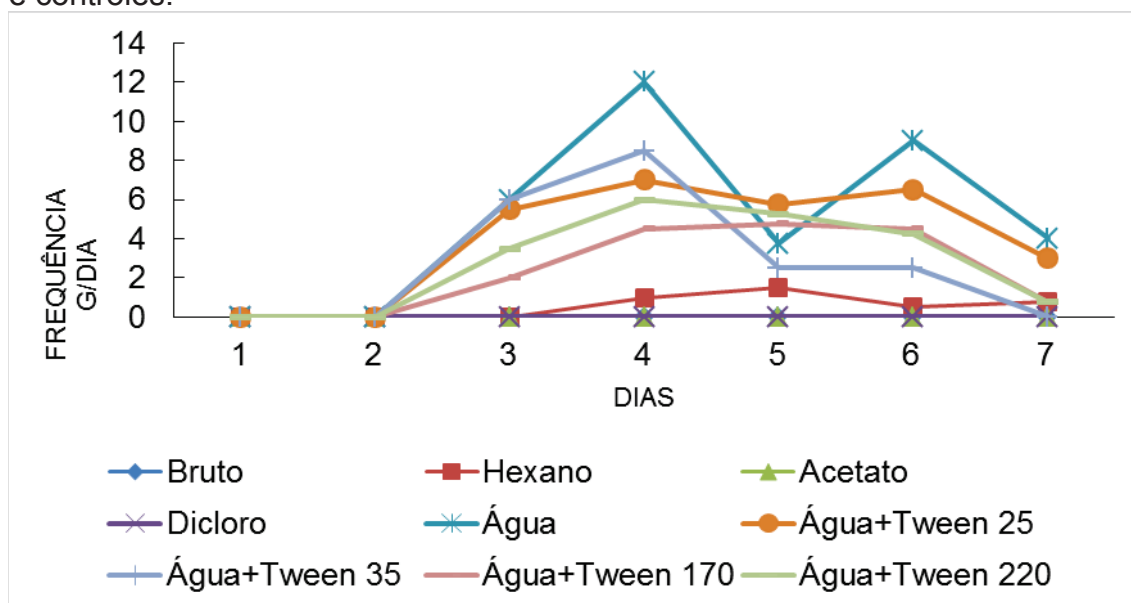
avaliação da velocidade de germinação. Foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram 2 mm de protrusão radicular (BRASIL, 1992). Após sete dias, avaliou-se o comprimento da radícula, da parte aérea e do comprimento total de cada plântula com o auxílio de um paquímetro, posteriormente as plântulas foram pesadas em balança analítica para a verificação do peso fresco, logo após foram mantidas em estufa de ar circulante com temperatura de 40°C, por um período de dois dias, estas foram novamente pesadas para a obtenção do peso seco e para a avaliação do desenvolvimento das plântulas.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade (PIMENTEL-GOMES, 1990).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstram que os tratamentos apresentaram picos de frequência de germinação, tendo os tratamentos controles com água, água + tween 25 (controle extrato bruto), água + tween 35 (controle do extrato hexânico), água + tween 170 (controle do extrato acetato de etila) e água + tween 220 (controle do extrato diclorometano) obtido seu pico em quatro dias, sendo que a água promoveu a maior frequência de germinação (Figura 1). Já a fração hexânica apresentou frequência em cinco dias e os tratamentos com extrato bruto, acetato etila e diclorometano não apresentaram germinação.

**Gráfico 1.** Frequência de Germinação de sementes de *Lycopersicon esculentum* erminadas na presença de diferentes extratos de *Lippia thymoides* e controles.



Observando os parâmetros analisados constatou-se que os extratos testados de *Lippia thymoides* provocaram alterações significativas ( $p < 0,05$ ) na germinação das sementes de tomate. As médias variaram de 0% a 61% de

germinação para os extratos de *Lippia thymoides* e controles, sendo as médias de 0% correspondentes aos tratamentos com extrato bruto, acetato e diclorometano (Tabela 1). O tratamento com extrato hexânico foi o único onde ocorreu germinação, porém não diferiu estatisticamente do seu controle (Tween 35). Quando comparado ao controle, os menores valores de germinação foram observados nas sementes submetidas aos extratos de folhas de *Lippia thymoides*. Portanto, os extratos testados afetaram a germinação das sementes de tomate e diminuíram o estímulo de crescimento da radícula. Nos estudos realizados por Alves *et al.* (2004) a presença do extrato e do óleo essencial de *Lippia alba*, não influenciou na percentagem de germinação de sementes. Já Segundo Castro *et al.* (1983), em pesquisa utilizando extrato diluído de *C. rotundus*, obtiveram a inibição total da germinação de sementes de tomate. Ainda segundo estes autores o extrato do sistema radicular da planta daninha *Canavalia ensiformis* possuem substâncias altamente inibitória da germinação do tomateiro "Santa Cruz".

**Tabela 1.** Porcentagem de Germinação (%G), Tempo médio de germinação (TMG) e Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Lycopersicon esculentum* (colocar nome completo, com descritor) germinadas na presença de extratos de *Lippia thymoides*.

Tratamentos	G%	TMG	IVG
Água	61a	4,75b	7,25a
Controle bruto (Tween 25)	56,5a	4,25b	8,5a
Controle hexano (Tween 35)	23,5bc	2ab	3,25ab
Controle acetato de etila (Tween 170)	31,5ab	5b	3,25ab
Controle diclorometano (Tween 220)	37ab	4,25b	5,50ab
Acetato	0c	0	0
Bruto	0c	0	0
Diclorometano	0c	0	0
Hexano	7,5bc	2,5ab	0,75b

\*Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

De acordo com os resultados obtidos por Alves *et al.* (2004), a porcentagem de germinação de sementes de alface não foram influenciadas em concentrações entre 0,001% e 0,01% do extrato de óleo de canela com tween. Porém, em concentrações entre 0,1 e 1% inibiram todas as germinações da semente inclusive o crescimento das raízes. Corroborando com essas informações Ferreira *et al.* (2007), relatam que o potencial alelopático das plantas diferem com a espécie vegetal.

O Tempo médio de germinação TMG variou de 5 – 2 dias, podendo-se constatar que o menor TMG foi verificado nas sementes tratadas com o controle do extrato Hexânico (tween 35) (TMG = 2 dias), e com o tratamento utilizando extrato Hexânico (TMG = 2,5 dias) (Tabela 1). Os maiores TMG foram obtidos pelos controles com Tween 170 e água. Ainda é possível verificar que não houve diferença estatística no tempo de germinação entre



todos os tratamentos testados, que apresentaram %G diferente de zero. Não foi possível inferir sobre os tratamentos com os extratos bruto, acetato de etila e diclorometano, tendo em vista que não ocorreu germinação.

Com relação ao Índice de Velocidade de Germinação (IVG) não houve diferença estatística entre o tratamento com água (controle positivo) e os tratamentos com Tween (controles negativos), sendo que o tratamento hexano não diferiu estatisticamente do seu controle (tween 35) (Tabela 1).

Em relação ao crescimento da plântula não houve diferença estatística para o crescimento total (PA+R) entre o tratamento com água, os tratamentos com tween e o tratamento hexano (Tabela 2). Já para o comprimento da parte aérea não houve diferença estatística entre os tratamentos com tween e água, e os tratamentos com extrato bruto, hexano, acetato e diclorometano não diferiram estatisticamente do seu controle (tween 25, 35, 170 e 220, respectivamente) (Tabela 2). Para o comprimento da raiz também não houve diferença estatística entre o tratamento com água e os tratamentos com tween. Os tratamentos com hexano e diclorometano não diferiram estatisticamente do seu controle (Tween 35 e 220, respectivamente), já os tratamentos com extrato bruto e acetato diferiram estatisticamente do seu controle (Tween 25 e 170, respectivamente) (Tabela 2).

**Tabela 2-** Comprimento da parte aérea, raiz, parte aérea mais raiz, peso fresco e peso seco das plântulas de *Lycopersicon esculentum*.

Tratamentos	P.A	R	P.A+ R	P.F	P.S
Água	1,95a	1,62a	3,17a	0,23a	0,015ab
Controle bruto (Tween 25)	1,29abc	1,99a	3,25a	0,04a	0,005ab
Controle hexano (Tween 35)	1,63ab	1,49ab	3,16a	0,05a	0,018a
Controle acetato de etila (Tween 170)	0,88abc	1,46ab	2,32ab	0,02a	0,004ab
Controle diclorometano (Tween 220)	0,96abc	1,21abc	2,18ab	0,03a	0,005ab
Acetato	0c	0c	0b	0a	0b
Bruto	0c	0c	0b	0a	0b
Diclorometano	0c	0c	0b	0a	0b
Hexano	0,14bc	0,19bc	0,36ab	0a	0b

\*Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

Em relação ao peso fresco nota-se que não houve diferença estatística entre os tratamentos testados (Tabela 2). Já para o peso seco, dos tratamentos contendo extrato o hexano foi o único que diferiu estatisticamente do seu controle, que apresentou maior média (Tabela 2).

De acordo com estudos realizados utilizando óleo essencial de *Lippia alba* por Alves *et.al.*, (2004) o efeito inibitório da raiz sofreu influência com o aumento das concentrações chegando a morte das plântulas mostrando o efeito fitotóxico para o crescimento da raiz

De acordo com Ferreira e Áquila (2000) a germinação é menos sensível aos aleloquímicos que o crescimento da plântula. Porém para realizar a quantificação experimental é mais simples trabalhar com as semente do que



com a planta adulta. Substâncias alelopáticas podem inibir ou não a germinação, podem também induzir o aparecimento de plântulas anormais. Assim, a avaliação da normalidade das plântulas é instrumento importante na identificação de substâncias alelopáticas.

Estes mesmos autores descrevem alguns problemas que podem ocorrer no teste de germinação, tais como: a necessidade do controle da temperatura, pois com a evaporação eleva-se a concentração dos extratos falseando os resultados, a utilização de duas ou três folhas de papel de filtro ou absorvente no fundo da placa e o uso de películas plásticas para vedar as tampas o que evita o dessecamento das placas e o uso de sementes de espécies cultivadas que apresentem boa qualidade (Ferreira; Áquila, 2000).

O efeito do tipo de extrato depende da sensibilidade da planta que está sendo testada com o aleloquímico, sendo assim, em determinadas espécies uma substância pode ser inibidora da germinação ou do crescimento, e em outra a mesma substância pode não afetar o crescimento ou ser estimulante (Almeida, 1988).

O efeito alelopático dos extratos pode ser confirmado pela baixa germinação das sementes de tomate nos tratamentos em que foram utilizados os extratos de *Lippia thymoides*.

## CONCLUSÕES

Os resultados indicaram que os extratos de *Lippia thymoides* afetam a germinação de tomate, apresentando, assim, efeito alelopático significativo sobre a porcentagem de germinação, sendo este efeito mais elevado nos extratos bruto, acetato de etila e diclorometano. Dessa maneira é possível inferir que existem substâncias biologicamente ativas nos respectivos extratos. Neste sentido, sugere-se novos estudos sobre os efeitos alelopáticos dos extratos desta espécie, com o intuito de verificar a concentração mínima inibitória, bem como a utilização de outras plantas de interesse agrícola.

**Palavras-chave:** Verbenacea. *Lippia*. Alelopatia. Extratos de plantas.

## REFERENCIAS

- ALMEIDA, F.S. **Alelopatia e as plantas**. Londrina: IAPAR, 1988. 68p.
- ALMEIDA, Mara Zélia de. Plantas medicinais / Mara Zélia de Almeida. - 3. ed. - Salvador : **EDUFBA**, 2011. 221 p.
- ALVES, L.L.; OLIVEIRA, P.V.A.; FRANÇA, S.C.; ALVES, P.L.C.; PEREIRA, P. S Atividade alelopática de extratos aquosos de plantas medicinais na germinação de *Lactuca sativa* L. e *Bidens pilosa* L. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.13, n.3, p.328-336, 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365 p.
- CASTRO P.R.C.;J.D.RODRIGUES,; M.A. MORAES & V.L.M. CARVALHO. **Efeitos alelopáticos de alguns extratos vegetais na germinação do**

**tomateiro** (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Santa Cruz) PLANTA DANINHA VI (2): 79-85, 1983.

FERREIRA, A.G.; AQUILA, M.E.A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, p.175-204, 2000.

FERREIRA, MC.; SOUZA, J. R. P. ; FARIA, T.J. 1054 FERREIRA, M. C. et al.

**Potenciação alelopática de extratos vegetais na germinação e no crescimento inicial de picão-preto e alface** Ciênc. agrotec., Lavras, v. 31, n. 4, p. 1054-1060, jul./ago., 2007.

GOMES, S. V. F.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S.. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclet. Quím.**, São Paulo, v. 36, n. 1, 2011. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-46702011000100005&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-46702011000100005&lng=en&nrm=iso)>. access on 20 Nov. 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-46702011000100005>.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. 2a ed. Plantarum: 1998.

MARTINS, E.R. et al. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 2000. 178p.

NETO, R. M. et al. O óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer, Verbenaceae, em ratos diabéticos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n. 2, p. 261-266, 2010.

OLIVEIRA, O.R.; TERAPO, D.; CARVALHO, A.C.P.P.; INNECCO, R.; ALBUQUERQUE, C.C. Efeito de óleos essenciais de plantas do gênero *Lippia* sobre fungos contaminantes encontrados na micropropagação de plantas. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 39, n.1, p. 94-100, 2008.

PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E. 2001. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology** 76: 201–214.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 13. ed. Piracicaba: Nobel, 1990.

RAO, G.P. et al. Studies on chemical constituents and antifungal activity of leaf oil of *Lippia alba* (Mill.). **Indian Journal of Chemical Technology**, v.7, n.6, p.332-35, 2000.

RICE, E.L. **Allelopathy**. 2 ed. New York: Academic Press. 1984.

SALIMENA, F.R.G., THODE, V., MULGURA, M., O'LEARY, N. **Verbenaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB015170>. Acesso em maio de 2013.

SANDERS RW. 2001. The genera of *Verbenaceae* in the Southeastern United State. **Harvard Papers in Botany** 5: 303-358.

SANTANA, D.L.; PREZA, D.L.C.; ASSIS, J.G.A.; GUEDES, M.L.S. Plantas com propriedades terapêuticas utilizadas na comunidade de campos, Amélia Rodrigues, Bahia. **Magistra**, Cruz das Almas-BA 20(3): 218-230.2008.

SAMPIETRO, D.A. Alelopatía: concepto, características, metodología de estudio e importancia. **Sitio Argentino de Producción Animal**. 2003.

SILVA, F. S., MENEZES, P. M. N., SÁ, P. G. S. D., BAMBERG, V. M., SOUZA, E. A. A., OLIVEIRA, H. R. D., OLIVEIRA, A. L. D. S., NEVES, L. F., ALMEIDA, J. R. G. D. S., LUCHESE, A. M. Determinação de fenóis, atividade antioxidante e antipirética de *Lippia tymoides* Mart. & Schauer VII Reunião Regional da FeSBE – Regional 2012.

SOUZA, N.C; LORENZI, H. **Botânica sistemática – guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira baseado em AP G II**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2005.

VICCINI, L. F. et al. Chromosome numbers in the genus *Lippia* (Verbenaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 256, n. 1-4, p. 171-178, 2006.

YAMAMOTO, P. Y.; COLOMBO, C. A.; AZEVEDO FILHO, J. A.; LOUREÇÃO, A. L.; MARQUES, M. O. M.; MORAIS, S. D. S.; CHIORATO, A. F.; MARTINS, A. L. M.; SIQUEIRA, W. J. Performance of ginger Grass (*Lippia alba*) for traits related to the production of essential oil. **Scientia Agricola**. v. 65, n. 5, p.481-489, 2008.

**COLETA DE GERMOPLASMA DA ESPÉCIE *Lippia origanoides*  
H.B.K.**

## COLETA DE GERMOPLASMA DA ESPÉCIE *Lippia origanoides* H.B.K.

Emily Verônica Rosa da Silva Feijó<sup>1</sup>; Anderson Carvalho Silva<sup>2</sup>; Marisol Ferraz<sup>3</sup>; Lenaldo Muniz de Oliveira<sup>4</sup>.

1,2,3 Doutorandos do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana, [emillyfeijo@hotmail.com](mailto:emillyfeijo@hotmail.com). 4 Professor Titular, Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana, [lenaldo.uefs@gmail.com](mailto:lenaldo.uefs@gmail.com).

### Introdução

As plantas medicinais caracterizam-se por apresentarem um ou mais grupos de princípios ativos que lhes conferem diversas propriedades terapêuticas. Dentre as diversas famílias botânicas, destaca-se a família Verbenaceae pela elevada e variada produção de metabólitos secundários.

A família Verbenaceae compreende cerca de 36 gêneros e 1000 espécies (SOUZA & LORENZI, 2005), distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais, nas regiões temperadas do Hemisfério Sul e poucas nas regiões temperadas do Hemisfério Norte (BARROSO 1991). O gênero *Lippia* L., com muitas espécies de interesse medicinal, reúne cerca de 200 espécies arbustivas com distribuição pantropical e cerca de 150 espécies que estão distribuídas por campos rupestres e cerrados no Brasil (SALIMENA 2002). Os principais centros de diversidade específica do gênero estão localizados no Brasil e no México (SALIMENA-PIRES, 1998).

Entre as diversas espécies do gênero *Lippia* tem se destacado *Lippia origanoides* H.B.K., com um hábito arbustivo essa planta pode atingir até 3 m de altura, tem folhas ovaladas, muito aromáticas e inflorescências axilares brancas (RUIZ et al., 2007). No Brasil, a espécie é popularmente conhecida como "salva-de-Marajó" e "alecrim-d'Angola" (PINTO et al, 2013). O chá das folhas é usado popularmente no tratamento de diarreia, cólicas em bebês, indigestão, flatulência, febre, náuseas, complicações menstruais, azia e como anti-séptico para a boca, garganta e feridas (OLIVEIRA, 2007).

Diversos trabalhos comprovam a atividade antimicrobiana do óleo essencial e dos extratos da espécie contra vários microorganismos como *Spongopora subterrânea* (BITTARA et al . 2009), *Candida sp.* (DOS SANTOS et al. 2004; OLIVEIRA et al . 2007), *Mycobacterium tuberculosis* (BUENO-SÁNCHEZ et al . 2009), *Leishmaniachagasi*, *Trypanosoma cruzi* (CELIS et al. 2007; ESCOBAR et ai. 2010), *T. cinnabarinus*(SIVIRA et al., 2010) entre outros.

A espécie também demonstrou atividade antiviral contra os vírus causadores da dengue e da febre amarela (MENESES et al. 2009). A atividade antioxidante do óleo essencial da espécie também foi comprovada (MUÑOZ-ACEVEDO et al. 2009; ARANGO et al., 2012). Estudos também comprovaram a atividade repelente de *L. origanoides* contra *Triboliumcastaneum* e *Sitophiluszeamais* (NERIO et al. 2009; OLIVERO-VERBEL et al . 2009). Além disso, a espécie apresentou efeito protetor de DNA contra genotoxicidade induzida por bleomicina (VICUÑA et al. 2010). Dessa forma *L. origanoides* se destaca pela ampla variedade de aplicações biológicas,

sendo uma promissora espécie para ser utilizada nas indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética.

O grupo de pesquisa de Plantas medicinais do Semiárido, da Universidade Estadual de Feira de Santana, tem desenvolvido diversos projetos com a espécie *Lippia organoides*, já havendo um volume significativo de informações relacionadas à fitoquímica, atividade biológica, propagação e cultivo. O grupo de pesquisa conta atualmente com pesquisadores atuando em diversas áreas, como agronomia, fitoquímica, atividade biológica e toxicologia, o que tem possibilitado estudos mais aprofundados para as espécies de *Lippia*. Ressalta-se que entre as espécies de *Lippia* já estudadas pelo grupo, *Lippia organoides* tem demonstrado excelentes resultados, com possibilidade real de desenvolvimento de produtos fitoterápicos.

Contudo, apesar de *L. organoides* ter uma ampla ocorrência no Brasil e ser uma promissora fonte vegetal de biomoléculas, ainda não foram feitos estudos de caracterização de diferentes acessos que irão subsidiar o melhoramento genético e o cultivo adequado da espécie. As diferenças entre os acessos são importantes, porque evidenciam a existência, de acessos promissores que poderão ser utilizados em projetos de melhoramento genético, com a finalidade de cultivar indivíduos com elevada produção de metabólitos secundários e com características morfológicas e agrônomicas apropriadas para o cultivo.

No Estado da Bahia a espécie ocorre em diversas regiões e têm sido observadas algumas características morfológicas diferentes em indivíduos crescidos em lugares distantes. Com a finalidade de formar uma coleção de acessos da espécie, que posteriormente serão caracterizados, no Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana foram realizadas expedições de coleta para obter amostras de germoplasma dos diferentes acessos da espécie.

## **Metodologia**

Através de consultas aos Herbários vinculados a rede pública foi realizado um levantamento dos diferentes locais no Estado da Bahia onde a espécie já foi coletada, determinando-se os locais de coleta. A primeira expedição de coleta ocorreu na Região da Chapada Diamantina, sendo coletados acessos nas cidades de Itatim, Palmeiras, Rio de Contas, Milagres, Mucugê, Utinga, Morro do Chapéu, Abaíra e na Região Sudoeste, no município de Jequié. Na segunda expedição foram coletados acessos nas proximidades de Feira de Santana (cidades sertanejas de Santa Luz, Riachão do Jacuípe e Santa Bárbara), no Norte do Estado (Capim Grosso, Senhor do Bonfim, Sento Sé e Casa Nova) e Nordeste do Estado (Santa Brígida, Tucanos e Jeremoabo). Também foi coletado um acesso na cidade de Floresta no Estado de Pernambuco. Ocorreram outras expedições de coleta nas regiões Sul e Oeste do Estado, porém nenhum acesso foi encontrado.

Duante as coletas, procedeu-se a marcação das coordenadas geográficas com a ajuda de um GPS da marca Garmin, modelo Vista HCX. Em seguida coletou-se mudas para propagação. Durante as coletas foram obtidas amostras vegetais férteis para identificação botânica, sendo, posteriormente, prensado, seco e identificado pela taxonomista Tânia Regina dos Santos Silva. Todas as exsicatas foram incorporadas ao Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana.



As mudas dos diferentes acessos foram cultivadas no Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana, originando os espécimes dos acessos diferentes que formam o banco de germoplasma de *Lippia origanoides* na instituição. Posteriormente, a partir da propagação dos espécimes cultivados, será realizada a caracterização fitoquímica, morfológica, molecular e agrônômica dos diferentes acessos da espécie.

A partir das coordenadas geográficas marcadas em cada ponto de coleta foram utilizados Mapa de Vegetação (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2004) e Mapa de precipitação (Instituto Nacional de Meteorologia) que permitiram a determinação do bioma e a precipitação média anual dos locais de amostragem.

## Resultados e Discussão

Foram coletados 20 acessos de *L. origanoides*, sendo 19 encontrados no Estado da Bahia e um em Pernambuco (Fig. 1). As coordenadas geográficas, altitude, bioma e precipitação dos acessos se encontram na Tabela 1. Os acessos se encontram entre as coordenadas 9° 9' 43" e 13° 45' 09,4 " de latitude e 38° 17' 54,4 " e 41° 53' 6" de longitude.

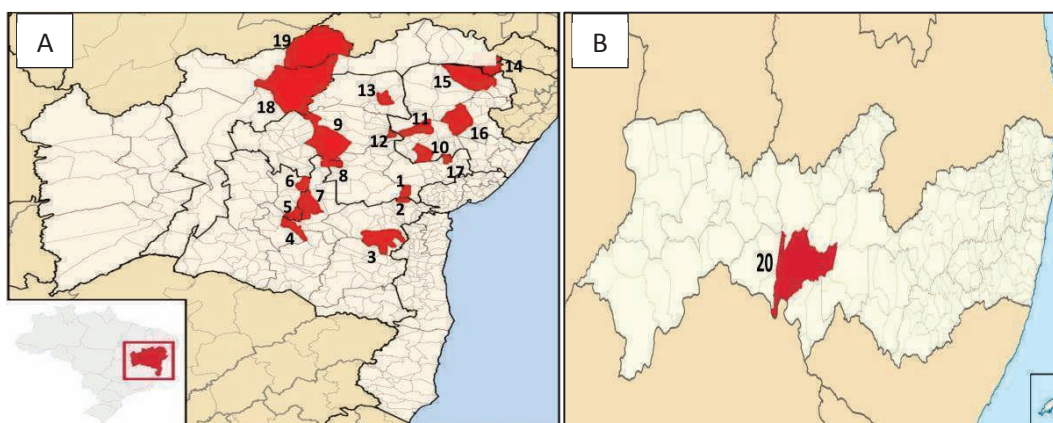


Figura 1. Distribuição dos acessos coletados de *Lippia origanoides* H.B.K. A – Mapa da Bahia, (1)Itatim, (2) Milagres, (3) Jequié, (4) Rio de Contas, (5) Abaíra, (6) Palmeiras,(7) Mucugê, (8) Utinga, (9) Morro de Chapéu, (10) Riachão do Jacuípe, (11) Santaluz, (12) Capim Grosso, (13) Senhor do Bonfim, (14) Santa Brígida, (15) Jeremoabo, (16) Tucano, (17) Santa Bárbara, (18) Sento Sé e (19) Casa Nova. B – Mapa de Pernambuco, (20) Floresta.

Populações de *L. origanoides* foram encontradas em locais com altitudes contrastantes. O acesso encontrado no local com maior altitude foi em Abaíra, com 1131m, enquanto o acesso coletado em Itatim apresentou a menor altitude com 140 m.A altitude exerce efeitos sobre o desenvolvimento e a produção de metabólitos secundários em plantas, apesar de existirem relativamente poucos estudos neste sentido (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

A espécie foi mais ocorrente em regiões de Caatinga (15 acessos), mas também foi encontrada em ecótonos entre a Mata Atlântica e a Caatinga (5

acessos), evidenciando a adaptabilidade da espécie a diferentes ambientes. *L. organoides* apresentou uma alta plasticidade fenotípica quando foi cultivada em diferentes níveis de luz apresentando a maior produção de biomassa no tratamento mais iluminado, e maiores valores de área foliar e área foliar específica nos ambientes mais sombreados (TORRES & LÓPEZ, 2007). Essa alta plasticidade fenotípica pode explicar por que essa planta ocorre em biomas diversos.

Quanto à precipitação dos locais de coleta, onze estão na faixa de precipitação média anual de 1200-300 mm, mas também ocorreram coletas em locais mais secos com valores de precipitação entre 800-200 mm. No Brasil as espécies do gênero *Lippia*, são encontradas com maior frequência em áreas mais áridas, como no cerrado e na caatinga. Os locais de coleta mais úmidos ocorreram nas zonas de transição entre Mata Atlântica e Caatinga.

Tabela 1. Coordenadas geográficas, bioma e precipitação média anual dos locais de coleta dos acessos de *Lippia organoides* H.B.K.

<b>Acesso</b>	<b>Longitude</b>	<b>Latitude</b>	<b>Altitude</b> <b>(m)</b>	<b>Bioma</b>	<b>Precipitação</b> <b>(mm)</b>
<b>Itatim</b>	39° 32' 14,8 "O	12° 35' 46,8 "S	140	Transição entre Caatinga e Mata Atlântica	1200-300
<b>Milagres</b>	39° 56' 05,6 "O	12° 58' 22,0 "S	526	Transição entre Caatinga e Mata Atlântica	1200-300
<b>Jequié</b>	40° 03' 28,6 "O	13° 45' 09,4 "S	346	Transição entre Caatinga e Mata Atlântica	1200-300
<b>Rio de Contas</b>	41° 51' 47,3 "O	13° 28' 53,8 "S	1065	Caatinga	1200-300
<b>Abaíra</b>	41° 45' 44,2 "O	13° 11' 54,0 "S	1131	Caatinga	1200-300
<b>Palmeiras</b>	41° 29' 12,6 "O	12° 26' 47,7 "S	809	Caatinga	2000-500
<b>Mucugê</b>	41° 23' 08,6 "O	12° 59' 42,3 "S	975	Caatinga	1200-300
<b>Utinga</b>	41° 23' 08,6 "O	12° 59' 42,3 "S	863	Caatinga	1200-300
<b>Morro do Chapéu</b>	40° 59' 38,3 "O	11° 36' 19,5 "S	941	Caatinga	800-200
<b>Riachão do Jacuípe</b>	39° 26' 12,6 "O	11° 46' 54,6 "S	193	Transição entre Caatinga e Mata Atlântica	1200-300
<b>Santaluz</b>	39° 24' 50,0 O	11° 12' 30,4 S	348	Caatinga	1200-300
<b>Capim Grosso</b>	40° 07' 39,1 "O	11° 20' 03,9 "S	396	Caatinga	1200-300
<b>Senhor do Bonfim</b>	40° 13' 58,0 O	10° 05' 20,4 "S	543	Caatinga	1200-300
<b>Floresta</b>	41° 06' 09,1 "O	09° 13' 46,2 "S	437	Caatinga	800-200
<b>Santa Brígida</b>	38° 15' 43,9 O	09° 50' 16,4 "S	397	Caatinga	800-200
<b>Jeremoabo</b>	38° 49' 23,7 O	11° 01' 25,5 "S	227	Caatinga	800-200
<b>Tucano</b>	38° 17' 54,4 "O	10° 13' 35,7 "S	354	Caatinga	800-200
<b>Santa Bárbara</b>	38° 58' 15,5 "O	12° 01' 04,5 "S	270	Transição entre Caatinga e Mata Atlântica	1600-400
<b>Sento Sé</b>	41° 53' 6"O	9° 44' 45" S	400	Caatinga	800-200 18
<b>Casa Nova</b>	40° 58' 15" O	9° 9' 43" S	417	Caatinga	800-200 19

## Conclusões

Com base nos resultados, conclui-se que o germoplasma da espécie *Lippia origanoides* H.B.K. ocorre em locais com grande variação de fatores ambientais, como altitude e precipitação, que podem ter ocasionado variações morfológicas, fitoquímicas e moleculares nos diferentes acessos.

### Palavras – Chave

Coleta, Germoplasma, Lippia, Acessos.

## Agradecimentos

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia pela concessão da bolsa de doutorado para a primeira autora. Também pela aprovação do projeto “Rede de pesquisa em bioprospecção e uso sustentável de espécies vegetais nativas do semiárido para produção de compostos bioativos”(Edital 12/2012), cuja espécie *Lippia origanoides* é uma das espécies contempladas.

## Referências

- ARANGO, O.B.; PANTOJA, D.D.; SANTACRUZ, L.C.H., HURTADO, A.M. Actividad antioxidante del aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides* H.B.K) del alto patia. **Biología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial**, v. 10, n.2, p.79 – 86, 2012.
- BARROSO, G.M. 1991. Sistemática de angiospermas do Brasil. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.
- BITTARA, F.; RODRÍGUEZ, D.; SANABRIA, M.; MONROY, J.; RODRÍGUEZ, J.L. Evaluación de fungicidas y productos vegetales em el combate de la sarna polvorienta de la papa. **Interciencia**, v. 34, p.265–269, 2009.
- CELIS, C.N.; ESCOBAR, P.R.; ISAZA, J.M.; STASHENKO, E.E.; MARTÍNEZ J.R. Estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de *Lippia alba*, *Lippia origanoides* y *Phyladulcis*, especies de la familia Verbenaceae. **Scientia Et Technica**, v. 13, p.103–105, 2007.
- DOS SANTOS, F.J.B., LOPES J.A.D., CITO A.M.G.L., OLIVEIRA E.H. , LIMA S.G. , REIS F.A.M. Composition and biological activity of essential oils from *Lippia origanoides* H.B.K. *J. Essent. Oil Res.*, v.16, p.504–506, 2004.
- ESCOBAR, P.; LEAL S.M.; HERRERA, L.V.; MARTINEZ J.R.; STASHENKO E.E. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p.184–190, 2010.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p.374-381, 2007.
- MENESES, R.; TORRES, F.A.; STASHENKO, E.E.; OCAZONEZ R.E. Aceites esenciales de plantas colombianas inactivan El virus del dengue y el virus de la fiebre amarilla. **Salud UIS**, v.41, p.236–243, 2009.
- MUÑOZ-ACEVEDO, A.; KOUZNETSOV, V.V.; STASHENKO, E.E. Composición y capacidad antioxidante in-vitro de aceites esenciales ricos en Timol, Carvacrol, trans-Anetol o Estragol. **Salud UIS**, v. 41, p.287–294, 2009.

NERIO, L.S.; OLIVERO-VERBEL J.; STASHENKO, E.E. Repellent activity of essential oils from seven aromatic plants grown in Colombia against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera). **J. Stored Prod. Res.**, v. 45: 212–214, 2009.

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; BIZZO, H. R. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* H.B.K. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 236–240, 2007.

OLIVERO-VERBEL, J.; CABALLERO-GALLARDO, K.; JARAMILLO-COLORADO, B.; STASHENKO, E.E. Actividad repelente de los aceites esenciales de *Lippia organoides*, *Citrus sinensis* y *Cymbopogon nardus* cultivadas em Colombia frente a *Tribolium castaneum*, Herbst. **Salud UIS**, v. 41, p.244–250, 2009.

PINTO, C. P. ; RODRIGUES, V. D. ; PINTO, F.P. ; PINTO, R. P. ; UETANABARO, A. P. T. ; PINHEIRO C. S. R. ; GADEA, S. F. M. ; SILVA, T. R. S. ; LUCCHESI, A. M. Antimicrobial Activity of Lippia Species from the Brazilian Semiarid Region Traditionally Used as Antiseptic and Anti-Infective. **Agents Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013.

RUIZ, C.; TUNAROSA, F.; STASHENKO, E. Estudio comparativo por GC-MS de metabolitos secundários volátiles dos quimiotipos de *Lippia organoides* H.B.K., obtenidos por diferentes técnicas de extracción. **Scientiaet Technica**, n 33, 2007.

SALIMENA, F.R.G. Novos sinônimos e tipificação em Lippia sect. Rhodolippia (Verbenaceae). *Darwiniana*, v.40, p.121-125, 2002.

SALIMENA-PIRES, F. R. Lippia L. sect. Rhodolippia Schauer (Verbenaceae) do Brasil. In: Congresso latino-americano de botânica, 7. México **Anais....Sociedade Latino Americana de Botânica**, 299p., 1998.

SIVIRA, A.; SANABRIA, ME; VALERA, N; VÁSQUEZ, C. Toxicity of ethanolic extracts from *Lippia organoides* and *Gliricidia sepium* to *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) (Acari: Tetranychidae). **Neotropical Entomology**, v. 40, n.3, p.375-379, 2011.

TORRES, E. P.; LÓPEZ, N. R. Plasticidad fenotípica de *Lippia alba* y *Lippia organoides* (Verbenaceae) em respuesta a la disponibilidad de luz. **Acta biol. Colomb.**, v.12, p.91-102, 2007

VICUÑA, G.C.; STASHENKO, E.E.; FUENTES, J.L. Chemical composition of the *Lippia organoides* essential oils and their antigen toxicity against bleomycin-induced DNA damage. **Fitoterapia**, v. 81, p.343–349, 2010.

**DESCOLORAÇÃO DO CORANTE ALARANJADO G POR  
LEVEDURAS ISOLADAS DE VEGETAÇÃO SOBRE ROCHA DO  
RECÔNCAVO BAIANO**



# DESCOLORAÇÃO DO CORANTE ALARANJADO G POR LEVEDURAS ISOLADAS DE VEGETAÇÃO SOBRE ROCHA DO RECÔNCAVO BAIANO

Pesquisa Institucional desenvolvida no Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, pertencente ao Grupo de Pesquisa Ecologia e Processos Microbianos Aplicados; Projeto de Iniciação Científica.

Tiago Santos Freitas<sup>1</sup>, Tiago de Araújo Pinho Alcântara<sup>2</sup>, Liliane Andrade Sande da Silva<sup>3</sup> e Márcia Luciana Cazetta<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Aluno do Curso de Graduação em Bacharelado em Biologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, bolsista PIBIC/CNPq, [freitas.tsf@gmail.com](mailto:freitas.tsf@gmail.com)

<sup>2</sup>Mestre em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, [tiagoalcantara@live.com](mailto:tiagoalcantara@live.com)

<sup>3</sup>Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, [liliane\\_sande@yahoo.com.br](mailto:liliane_sande@yahoo.com.br)

<sup>4</sup>Professora Doutora do Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Orientadora, [malulz@yahoo.com.br](mailto:malulz@yahoo.com.br)

## INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas foi possível registrar um aumento populacional considerável, paralelamente ao aumento das atividades industriais, com a finalidade de atender as demandas do comércio. A intensa produção e eliminação de resíduos tóxicos, oriundos de subprodutos gerados pela indústria, é um dos assuntos mais importantes em relação ao controle da poluição. Este é um problema de caráter mundial que tem suas origens na revolução industrial e intensificação com o “boom” populacional (Costa et al., 2009; Almeida et al., 2012).

Substâncias empregadas intensamente na coloração de vários produtos (papel, fotografia, cosméticos, alimentos e tecidos), os corantes são relatados desde as antigas civilizações e a arte de tingir tecidos é milenar. Estas substâncias podem ser retidas por adsorção física, formação de soluções, sais, retenção mecânica ou mesmo por constituição de pontes químicas covalentes. Abrangem, como componentes principais, um grupo cromóforo, que dá a cor que absorve a luz solar, e ainda outro grupo funcional que permite a fixação nas fibras do tecido. Considerando sua estrutura química, os corantes podem ser classificados em antraquinônios (presença de quinonas ou benzoquinonas na estrutura), índigo (contém enxofre), ftalocianinos (contém metais) e azóicos ou azo (apresentam uma ligação azo – N = N –) (Nigam et al., 2001; Rosalen et al., 2004; Silva, 2011).

Os resíduos provenientes da indústria têxtil geralmente possuem propriedades mutagênicas e/ou carcinogênicas, o descarte desenfreado de corantes em corpos de água compromete a absorção de energia luminosa, alterando o ciclo biológico do ambiente, causando danos à vida aquática e, conseqüentemente, interferindo na cadeia alimentar, uma vez que estes compostos são acumulados em organismos vivos (Oliveira et al., 2003; Sousa et al., 2009; Pereira et al., 2010; Rabelo et al., 2013).

Preocupados com a qualidade do ambiente atingido por efluentes coloridos, pesquisadores têm encontrado nos microrganismos a versatilidade para catabolizar moléculas recalcitrantes. Os processo de biorremediação vêm sendo utilizado com

mais intensidade, devido à sua capacidade de aplicação em grande escala, com custos relativamente baixos. Estes organismos conseguem agir transformando compostos orgânicos tóxicos em CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e/ou CH<sub>4</sub> a custos relativamente baixos, por meio de reações enzimáticas (Costa et al., 2009; Vasconcelos, 2010; Tisca, 2011).

Do ponto de vista da diversidade microbiológica, o Recôncavo Baiano é uma região ainda pouco explorada, tornando importante o isolamento, seleção e identificação de microrganismos com aplicação biotecnológica. Entendendo a importância dos microrganismos no processo de biodegradação, este trabalho, teve por objetivo encontrar leveduras com potencial biotecnológico para a descoloração de corantes industriais e avaliar a capacidade de degradação do corante Alaranjado G em condições variadas, por leveduras isoladas de vegetação sobre rocha da Serra da Penha e Serra da Pioneira, localizadas no Recôncavo Baiano.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Seleção dos Microrganismos**

As leveduras foram isoladas de flores e frutos de vegetação sobre rocha da Serra da Penha e Serra da Pioneira. Nas flores, executou-se uma raspagem com alça de inoculação esterilizada na região do nectário e posterior conservação em tubos de ensaio contendo salina. Os frutos pequenos foram coletados e também armazenados em tubos com solução salina. O material contido nos tubos foi transferido para placas de Petri contendo o meio de isolamento YMA (extrato de levedura 3.0 g.L<sup>-1</sup>, extrato de malte 3.0 g.L<sup>-1</sup>, peptona 5.0 g.L<sup>-1</sup>, glicose 10 g.L<sup>-1</sup> e ágar 15 g.L<sup>-1</sup>) (YARROW, 1998), acrescido de cloranfenicol 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> e pH ajustado para 4,0.

Para a preservação dos microrganismos foi utilizado um método de preservação a longo prazo. A criopreservação consiste em manter variados tipos celulares a baixas temperaturas, objetivando a redução no metabolismo e danos do material biológico (COSTA, 2009). Após o isolamento e purificação, as colônias foram transferidas e estocadas em tubos criogênicos de três formas distintas: a primeira, utilizando-se apenas GYMP líquido (glicose 2%, extrato de malte 1%, extrato de levedura 0,5% e NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2%) (ROSA et al., 1995) e sendo armazenada em geladeira, a segunda em GYMP líquido + Glicerol 20% e a terceira somente no glicerol a 20% e mantidas no congelador a -10 °C.

### **Teste de Biodescoloração**

Os testes de descoloração em meio líquido foram realizados em triplicata em foscões Erlenmeyer de 250 mL, contendo Meio Normal de Descoloração (MND) contendo (%): extrato de levedura 0,25; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,05; CaCl<sub>2</sub> 0,013; Glicose 2,0 (Martorell et al., 2012) e diferentes concentrações do corante Alaranjado G (100, 200, 250 e 300 ppm). Após crescimento em placas de Petri durante 48 horas, um inóculo padronizado com densidade óptica de 0,8 nm foi adicionado ao meio MND com corante e, como controle, foi utilizado o mesmo meio sem inóculo. Após um período de 24 horas, foram retiradas alíquotas de 2 mL e

centrifugadas em 5000 rpm por 20 minutos. Foram observados os seguintes parâmetros: a coloração do meio, a coloração da biomassa, o pH final e a porcentagem de descoloração.

### Determinação da Taxa de Biodescoloração

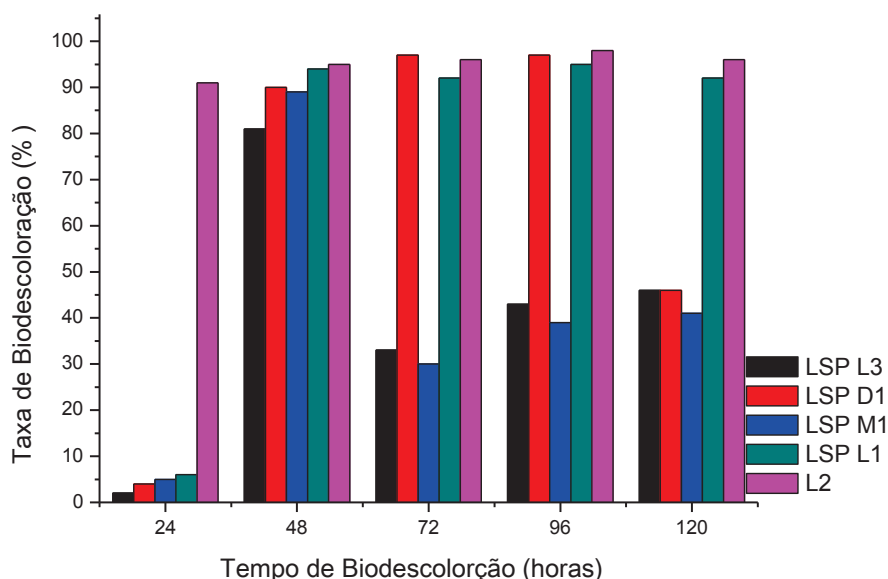
A taxa de descoloração foi determinada por meio da leitura do sobrenadante em espectrofotômetro a 476nm, sendo utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Descoloração (\%)} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

Onde (A) indica a absorbância do meio não inoculado e (B) indica a absorbância residual do meio.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 80 isolados testados na concentração de 50 ppm, 45 apresentaram capacidade de descoloração do corante Alaranjado G por biossorção, com as taxas de descoloração variando de 2% a 95%. Destacaram-se as cepas LSP L3, LSP D1, LSP M1, LSP L1 que apresentaram descoloração acima de 80% nas primeiras 48 horas e o isolado L2 com descoloração de cerca de 91% nas primeiras 24 horas (Figura 1). De um modo geral, quanto menor o tempo de descoloração de um resíduo têxtil por um microrganismo, maior será sua eficiência na descontaminação de ambientes ou resíduos contaminados (Silva, 2009).



**Figura 1:** Taxas de descoloração (%) do azo corante Alaranjado G a 50 ppm pelas leveduras isoladas de Afloramento sobre Rocha do Recôncavo Baiano durante 120 horas de cultivo.

A coloração alaranjada da biomassa dos isolados, após a centrifugação, indicou que a descoloração do meio ocorreu por meio do processo de adsorção. A capacidade de biossorção de um microrganismo é atribuída a componentes da parede celular, que contém diferentes grupos funcionais, como aminas, carboxilas, hidroxilas, fosfatos e outros grupos carregados, capazes de causar uma forte atração entre o azo corante e a parede da célula (Vitor e Corso, 2008).

Os fungos vêm se destacando como organismos adequados para o tratamento de efluentes industriais e um dos mecanismos bastante utilizados é o processo de bioissorção do corante sem a sua degradação, na qual a molécula do corante é incorporada a biomassa celular sem gasto de energia metabólica pelas células (Peixoto, 2013).

Os demais isolados apresentaram capacidade de descolorir o corante, provavelmente, por meio de biodegradação, uma vez que não apresentaram alteração da cor da biomassa. O processo de biodegradação, ou degradação enzimática, é geralmente considerado como um fenômeno de transformação de compostos orgânicos por microrganismos. A biodegradação fornece fonte de carbono e energia para o crescimento microbiano e assume um papel fundamental na reciclagem de materiais no ecossistema natural. Os poluentes podem ser degradados em moléculas mais simples e não tóxicas (mineralização) ou degradados parcialmente (biotransformação) (Das e Charumathi, 2012).

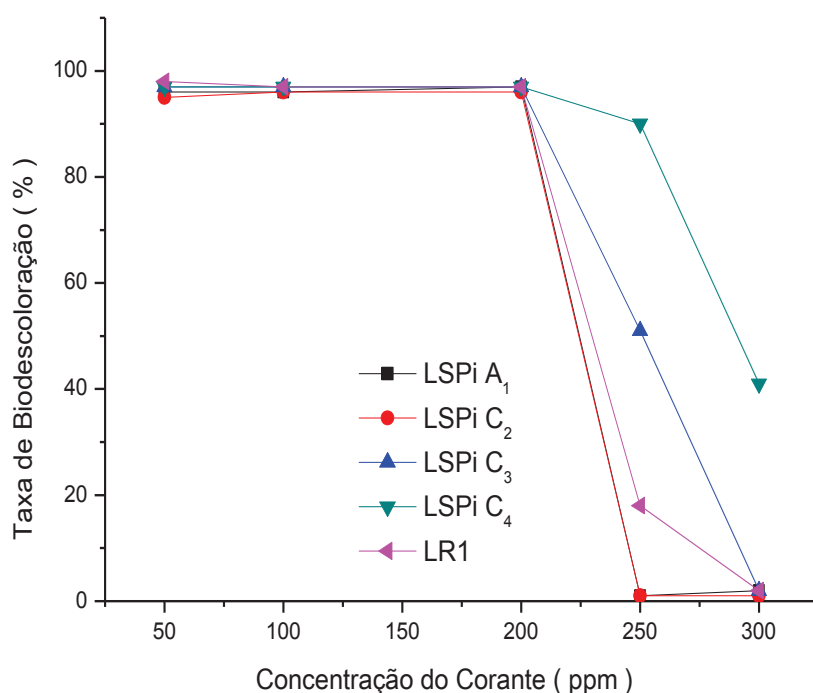
As taxas de descoloração variaram de 10 % a 98 % após 120 horas. Das 35 cepas que apresentaram capacidade de biodegradação, 14 isolados se destacaram por apresentar taxas de descoloração acima de 95% nas primeiras 24 horas (Tabela 1).

**Tabela 1.** Taxas de descoloração do azo corante Alaranjado G pelas leveduras isoladas de afloramentos sobre rocha do Recôncavo Baiano.

<b>Código do isolado</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>	<b>72 horas</b>	<b>96 horas</b>	<b>120 horas</b>
LSPi C2	95%	93%	95%	94%	97%
LSP 34	95%	98%	95%	95%	97%
LSPi A1	96%	96%	97%	98%	94%
LSPi C3	97%	95%	93%	97%	95%
LSPi C4	97%	95%	94%	97%	96%
LSP 03	98%	98%	97%	97%	97%
LSP 25	98%	97%	97%	97%	97%
LSP 31	98%	98%	97%	97%	94%
OB3	98%	98%	99%	98%	97%
LR1	98%	99%	97%	97%	97%
LSP N7	98%	99%	98%	98%	98%
OB1	98%	99%	99%	99%	98%
LSP 08	99%	98%	96%	97%	98%
L1	99%	98%	97%	97%	97%

Posteriormente, estes isolados foram testados em concentrações maiores de corante, 100, 200, 250 e 300 ppm, durante 24 horas. De acordo com os resultados, a cepa LSPi C4 se destacou por manter uma elevada taxa de descoloração, de 90%, até a concentração de 250ppm do corante e de cerca de 40% em 300 ppm (Figura 02).

Diversos autores relataram que o aumento da concentração reduz gradualmente a taxa de descoloração (Yu e Wen, 2005; Qu et al., 2012; Tan et al., 2013), provavelmente em função da toxicidade dos corantes e/ou dos metabólitos resultantes da biodegradação (Wang et al., 2009).



**Figura 2:** Taxa de descoloração (%) em diferentes concentrações do azo corante Alaranjado G pelas leveduras isoladas de afloramento sobre rocha do Recôncavo Baiano.

Embora muito utilizado em processos de biorremediação, a biossorção gera um acúmulo de biomassa e formação de lodo que, posteriormente, necessitaria de um destino final, provocando um segundo problema de poluição. Por isso, a bioprospecção e o estudo da descoloração por leveduras, focados na degradação enzimática, vem crescendo nos últimos anos (Alcântara, 2014).

## CONCLUSÕES

As leveduras isoladas de vegetação sobre rocha no Recôncavo Baiano, apresentaram capacidade de descoloração do corante Alaranjado G em menos de 48 horas, o que confere a elas um bom potencial para utilização em processos de biorremediação de corantes têxteis. A cepa LSPi C4 destacou-se devido ao seu elevado potencial de biodegradação em elevadas concentrações do corante Alaranjado G, e por isso, novos estudos serão conduzidos com esse isolado, com o objetivo de otimizar e desvendar os mecanismos enzimáticos envolvidos neste processo.

**PALAVRAS-CHAVE:** biodegradação, corante têxtil, fungos

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), bem como a importante colaboração da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia para o desenvolvimento deste trabalho.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALCÂNTARA, T.A.P. Descoloração aeróbica do corante Alaranjado G por *Candida rugosa* SJL6 isolada do Rio Subaé-Bahia. Dissertação, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2014.

ALMEIDA, D.G.; SILVA, M.G.C.; MIRANDA, R.C.M.; MACIEL, C.C.S.; GUSMÃO, N.B. Descoloração do corante Índigo Carmim e produção de lacase por fungos filamentosos. *Scientia Plena*, vol.8, nº 5, mai, 2012.

COSTA, A.F. de S.; SALGUEIRO, A.A.; Obtenção de consórcio microbiano a partir de amostra de efluentes de lavanderias e tinturarias industriais instalada em Toritama – Pernambuco. *Anais: XX Congresso Brasileiro de Economia Doméstica*, Fortaleza – CE, 2009.

DAS, N.; CHARUMATHI, D. Remediation of synthetic dyes from wastewater using yeast--An overview. *Indian Journal of Biotechnology*, v. 11, n. 4, p. 369-380, 2012.

MARTORELL, M, PAJOT, HF., FIGUEROA LC. Dye-decolourizing yeast isolated from Las Yungas rainforest. Dye assimilation and removal used as selection criteria. *Internation Biodeterioration & Biodegradation*. 25-32. 2012.

NIGAM, P.; ROBINSON, T.; MCMULLAN, G.; MARCHANT, R. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology*, vol. 77, p. 247-255, 2001.

OLIVEIRA, J.R.; SOUZA, R.R. Biodegradação de efluentes contendo corantes utilizados na indústria têxtil. In: *Seminário de pesquisa FAP – SE. Anais do FAP. Aracaju – SE*, 2003.

PEREIRA, A.R.B.; BUENO, F.L.; SANTOS, S.C.; LIMA, C.A.A.; DIAS, A.L.T. Biodegradação de corantes e efluentes têxteis por fungos. *Holos Environment*. V. 10, n. 2, p.166, 2010.

QU, Y. et al. Aerobic decolorization and degradation of Acid Red B by a newly isolated *Pichia* sp. *TCL. Journal of hazardous materials*, v. 223, p. 31-38, 2012.

RABELO, J.B.; CAMPOS, L.C.; SALES, P.T.F.; LACERDA, M.F.A.R.; SANTIAGO, M.F. Descoloração do corante food blue nº 1, por meio de uso de fibras silicáticas de amianto (Crisotila 5s) como suporte para fungo *Ganoderma applanatum*. *Revista*



Eletrônica de Farmácia. Vol. X (1), p. 27-50, 2013.

ROSA, C. A., MORAIS P. B., SANTOS, S. R. NETO, P. R. B., MEDONQA-HAGLER, L. C.; HAGLER, A. N. Yeast communities associated with stingless bees. FEMS Yeast Research, v. 4, p. 27275, 1995.

ROSALEN, A.; MONTEIRO, R.T.R.; DELLAMATRICE, P.M.; KAMIDA, H.M. Biodegradação de efluente têxtil e nove corantes técnicos utilizando fungos basidiomicetos. Revista Química Têxtil, nº 76, p. 44-52, 2004.

SILVA, D.C. Estudo da diversidade microbiana em reator UASB aplicado à degradação de azocorantes. Dissertação (Programa de Pós-Graduação Engenharia Ambiental), Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto – MG, 2011.

SOUZA, A.F.; ROSADO, F.R. Utilização de fungos basidiomicetos em biodegradação de efluentes têxteis. Revistas em Agronegócios e Meio Ambiente, v. 2, n. 1, p. 121-139, jan./abr., 2009.

TAN, L. et al. Aerobic decolorization and degradation of azo dyes by growing cells of a newly isolated yeast *Candida tropicalis* TL-F1. Bioresource technology, v. 138, p. 307-313, 2013.

TISCA, J.F. Potencial biotecnológico de leveduras isoladas de recursos hídricos do litoral norte do Rio Grande do Sul (Brasil): Descoloração de Corantes. Monografia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Imbé, 2011.

VASCONCELOS, F.N.L. Degradação de corantes de aplicação textile por levedura e engenharia metabólica de *Saccharomyces cerevise* para biodegradação de corantes azo. Dissertação, Universidade do Minho, Braga – Portugal, 2010.

VITOR, V.; CORSO, C. R.. Decolorization of textile dye by *Candida albicans* isolated from industrial effluents. Journal of industrial microbiology & biotechnology, v. 35, n. 11, p. 1353-1357, 2008.

YARROW, D. Methods for the isolation and identification of yeasts. In: The Yeasts, a taxonomic study. 4a. Ed. Amsterdam: Kurtzman e Fell. p. 77-100, 1998.

Yu, Z., & Wen, X. (2005). Screening and identification of yeasts for decolorizing synthetic dyes in industrial wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 56(2), 109-114.

WANG, H. et al. Biological decolorization of the reactive dyes Reactive Black 5 by a novel isolated bacterial strain *Enterobacter* sp. EC3. Journal of Hazardous Materials, v. 171, n. 1, p. 654-659, 2009.

## **DESENHO DE PRIMERS SSRs PARA MAMONEIRA**

## DESENHO DE PRIMERS SSRs PARA MAMONEIRA

Pesquisa realizada como avaliação final do componente curricular Estágio Supervisionado II do curso de Bacharelado em Biologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

Ítalo Paim<sup>1</sup>; Priscila Silva<sup>2</sup>; Edna Machado<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Aluno do curso de graduação em Bacharelado em Biologia pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, paimitalo@hotmail.com

<sup>2</sup> Aluna do curso de graduação em Bacharelado em Biologia pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, prisilva.bio@gmail.com

<sup>3</sup> Professora Adjunto da UFRB, ednalobo@ufrb.edu.br

### Introdução

A Mamoneira (*Ricinus communis* L.) é uma espécie pertencente a família Euphorbiaceae, tem como fruto a mamona ou rícinos e sua nomenclatura popular pode se alterar de acordo com o estado ou o país em que se encontra. A mamoneira não apresenta grande exigência climática para seu desenvolvimento, fator que contribui para uma grande importância sócio- econômica; seu principal produto, o óleo de mamona ou óleo de rícino, tem características muito singulares (o que assegura sua importância nas indústrias químicas, farmacêuticas e bioenergéticas). Ainda é um importante produto na produção de biodiesel, pois é o único óleo vegetal que tem uma hidroxila (OH) ligada a uma cadeia carbônica, o que confere uma viscosidade, maleabilidade e temperatura características que permitem ao óleo de mamona ser o único solúvel em álcool, o que propicia a interação e flexibilidade na sua utilização. (BAJAY, 2009).

O conhecimento da diversidade é de fundamental importância para o melhoramento de plantas, pois além de identificar combinações que possam expressar elevada heterose, aumenta a perspectiva de seleção de segregantes superiores, com a potencialização da variabilidade por meio do cruzamento de genótipos divergentes (NETO et al., 2010).

A mamoneira é uma planta com grande variabilidade genética. Há variação quanto ao porte; à coloração e tamanho da folhagem e do caule; ao formato, tamanho, peso e coloração da semente; a cor e ao conteúdo de óleo; e a

tolerância/resistência a pragas e doenças e a estresse ambiental (apud MACHADO, 2011). Estudos que tratam da variabilidade genética de *Ricinus communis*, por meio de marcadores moleculares, são encontrados em grande escassez, o que torna ainda mais necessário que tais estudos se realizem, visto que é uma espécie de grande potencial econômico e por isso são consideradas essenciais no programa de melhoramento da espécie (apud MACHADO, 2011).

Marcadores de DNA são derivados de pequenas regiões do DNA que apresentam polimorfismo entre indivíduos de uma espécie. A utilização desses marcadores é de fundamental importância para o estudo da variabilidade genética, conservação da biodiversidade da espécie e auxílio em programas de melhoramento. Dentre as técnicas de marcadores moleculares destacam-se os microssatélites ou SSRs (LITT e LUTY, 1989), que são sequências de repetições em tandem encontradas no DNA. A identificação dessas regiões é possível após amplificação do fragmento de DNA desejado empregando-se um par de iniciador específico.

O sequenciamento do genoma da mamoneira (CHAN et AL., 2010) possibilitou a identificação de regiões contendo Sequências Simples Repetidas (SSRs) e desenho de primer específicos que franqueiam essas regiões. As ferramentas de bioinformática tem se mostrado de grande valia para estudos genéticos, pois, a partir deles se torna possível encontrar sequências informativas e que estejam em condições de serem utilizadas.

Existem algumas limitações no uso de marcadores SSR, pois a obtenção dos primers que serão utilizados na PCR tem um custo elevado e apenas 10% a 20% dos primers são informativos. Assim, faz-se necessária a avaliação da qualidade dos desenhos dos primers, por meio de softwares específicos que simulam uma reação da PCR. Deve se evitar estruturas secundárias nos primers tais como auto anelamento, anelamento cruzado, grampos, repetições e pistas, que podem acontecer devido a reações intra e intermoleculares. Essas reações podem levar a um baixíssimo rendimento do produto da PCR.

Esse trabalho teve como objetivo a identificação de regiões contendo sequências microssatélites no genoma de *Ricinus Communis* L. e o desenho de primers que franqueiam essas regiões.

## Material e Métodos

As Sequências do genoma de *Ricinus communis* depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/wgs/?val=AASG02>) foram utilizadas para fins de identificação de regiões contendo microssatélite e desenho de iniciadores diretos e reversos. As sequências foram utilizadas em formato FASTA.

A identificação de regiões genômicas, contendo os microssatélites e desenho dos primers que franqueiam essas regiões foi realizada por meio do aplicativo web Websat (Martins et. al., 2009, <http://wsmartins.net/websat/>).

Para o desenho dos pares de iniciadores, os parametros utilizados foram: produto final de amplificação apresentando tamanho entre 150 a 300 pb, que é um tamanho compatível com eletroforese em géis de poliacrilamida a 7%; Iniciadores com 19 a 22 pb; porcentagem de GC variando entre 40 a 60%; e a tm entre 55° a 62°C e diferença máxima de 1°C entre os iniciadores de cada par. Essas análises foram realizadas, também, por meio da utilização do software WebSat

A qualidade do desenho dos iniciadores, que franqueiam as regiões microssatélites, foi verificada por meio do aplicativo web NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>) que além de confirmar os valores acima também acusa a formação de estruturas secundárias (auto-anelamento, anelamento cruzado ou formação de grampos), que são indesejáveis se ocorrerem em temperaturas próximas das de reação de PCR.

## Resultados e Discussão

Foram identificados quarenta e dois loci SSR para a mamoneira. Para trinta desses loci foi possível desenhar pares de iniciadores (Tabela1), o que representa um total de 72%. Esses 30 loci SSR apresentaram motivos di (20), tri (6), tetra (1) e hexa- nucleotídeos (3). Não foram identificados loci com motivo penta-nucleotídeo. A porcentagem, de cada tipo dos motivos citado, está representada na figura 1.

A Tm variou entre 55,1 a 60,4, apresentando-se dentro dos critérios desejados e a concentração de guanina e citosina, em porcentagem, variou entre 40% e 60% (Tabela 1). Esses parâmetros são obtidos através da utilização de

programas de bioinformática, específicos, a fim de que os primers se unam à sequência de DNA de interesse (GIRARDON et al., 2009).

**Tabela 1:** Caracterização dos pares de iniciadores SSR para mamoneira

Iniciadores	Tm	GC%	Amplitude do fragmento em pb	motivo	Avaliação
F:AGCGTTGCCCTAACAAGAAG	59.517	50	281	(TCT)9	Dimer e Hairpin
R:AACGTATGGTGGATTGTCATGT	59.104	40,91			
F:CTTTCTTCTTCGTTTCCCACA	59.341	42,86	159	(CT)12	Cross Dimer -3'
R:CTTGTTTGTCCATTTATCAGCC	58.629	40,91			
F:AGAGAGGTAAAAGGGCAGGC	59.848	55	300	(GA)11	Dimer; Cross dimer - 3'
R:CCCCACAGACAATTCCATTT	59.647	45			
F:CCCTTCGTGGTGCTTAAATG	60.493	50	258	(AT)33	Dímer - 3'
R:GCGATTCTCATGCCACTTTC	60.754	50			
F:AAGGAGAATGCTGGGGAGAT	60.	50	249	(TA)7	Dimer
R:TGGAAGAGTGTCTCGGCTTT	59.98	50			
F:ATGTAAAAGCGCATCTCAGG	57.99	45	264	(TA)33	S/E
R:TGAAAATTGACGGTAGGGAA	58.06	40			
F:AGTTGCCTCACGAAATCTTCA	59.86	42,86	209	(AT)13	Dimer - 3
R:TCGGCTAAGGGAAATAAAAGTG	59.640	40,91			
F:TCTTCCCATTCTCTGCAA	59.30	47,37	254	(AGA)5	Dimer-3
R:AGCATTCAATAAAGTGGCCCT	58.67	45			
F:CTTCGGGTTTTTCATTCTCA	60.04	45	261	(TA)14	Dímer - 3'
R:GACGCCATCACTATCAACAGTC	59.62	50			
F:GAACTGCATGTGAAAGGGCT	60.26	52,63	278	(AGA)6	S/E
R:CACCTCAAAGCACACCGTT	59.736				
F:TTTCCAGAGGTTTCGTGCTTT	59.85	45	187	(TC)15	Dimer - 3
R:TGCTTTGTTGGAGCTTGCTA	59.75	45			



F:TCCATCGTTTCCCTTCTTTC	59.10	45,	299	(AT)8	Dimer – 3'
R:TCTCACTGGCTTGCATTAAGAT	59	40,91			
F:AATTCACCGCCTTAGATTCCT	59.10	42,86	288	(TTC)5	Dimer -5'
R:CAATTCGCAGAAAGCAAACA	59.99	40,0			Dimer -5'
F:GGATCTTTTAGTTGGCATTGGA	60.31	40,91	244	(AAT)7	Dimer - 5'
R:AATTAGGCGATTGCATTTGG	59.92	40			Dímer - 5' e 3'
F:GCGCACACACCTCTACAAAT	58.80	50	293	(TTTTCT) 3	Dimer 5'
R:AATCCATAATCCGCAACAG	59.78	45			
F:GGTTTTGGTTGGTACTTGGT(21)	60	47,62	293	(GAT)5	Dimer 5'
R:CTGTGCGTGTCTTATCGGTG(20)	60.32	55,0			
F:AATTTGTGGTGTGGCAAT(20pb)	60.0	40	292pb	(CT)12	Dimer 3'
R:TTTTGGGATCAACGAAGAA(20pb)	60.4	40			Dimer 5'
F:CACGCCATTCTTCCTTTGTT	60.1	45,	296pb	(TC)16	S/E
R:GCATCACCGTTCTGTTCTCC	60.6	55			
F:CACGCCATTCTTCCTTTGTT	60.1	45,	296pb	(CTTTT) 3	S/E
R:GCATCACCGTTCTGTTCTCC	60.6	55			
F:AACAGCATCATCCATTCCGT	60.3	45	216pb	(TCC)5	S/E
R:ATGAGTCCAAGAAAGGCGAA	59.8	45			
F:TGACGAAGAGGTGGAGTGC	59.9	57,89	209pb	(TAT)5	Dimers -3' e 5'
R:GGAGACATATTGCCTTTTAGGG	59.0	45,45			
F:TCAACTGTCTGGAAACAGG	59.720	50,0	278pb	(GA)11	Hairpin e Dimer
R:AGTGGCTCAACACCAACAAA	59.187	45			
F:CATCCAAGGTTTGAAGGGAA	59.9	45	286pb	(TC)7	Dimer- 3'
R:CCAACGCACACCAAGTAAAA	59.6	45			
F:CAAAATCAGCTCCTGCACAA	59.9	45	207pb	(TA)9	Dimer 3'-e 5'
R:TGATCCTCTGGCCTTCAATC	60.1	50			Dimer 5' - 3'
F:GAGAATGGAAACATTTTGGC	57.1	40	249pb	(AG)8	Dimer 3' - 5'
R:AAAACCTCCCTCGCACTCAT	57.3	47,3			
F:CTAACCTAGCGTCACCGCA	60.019	57,8	228pb	(AT)12	Hairpin e

R:CGATTAACGAAGGGGAATTG	59.406	45			dimer 5'-e 3'
					Dimer 5'-e 3'
F:CGCTGGATTTGCTTTCTGTT	60.3	45	169pb	(GAG)5	S/E
R:ATCTTCACTGCATTCCCACC	59.9	50			
F:AGAATGACACGCAGTTGCAG	60.0	50,0	162pb	(ATGAT C)4	Dímer 3' Dímer 3'
R:AAACCCTCCCATTCTGAGC	60.4	50,0			
F:CTGCGTGAGGATGACTACGA	60.0	55,0	260pb	(GA)8	Hairpin e dimer 3'
R:AAAGTGTTTTGATTTGCGCC	60.1	40,0			Dímer 3'
F:CTGGTCTTTGTCGCTGATGA	59.9	50,0	173pb	(TGC)5	S/E
R:TATGCCACCATTGCAGAGAG	59.8	50,0			

Tm: temperatura de *melting*; GC: concentração de Guanina e Citosina; S/E: sem estruturas secundárias



**Figura 1:** Frequência de tipos de motivos SSR em 30 loci de mamoneira

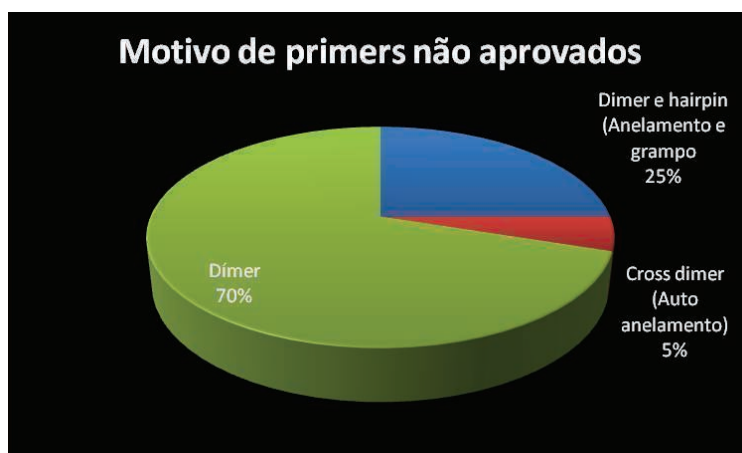
Um total de onze pares de iniciadores desenhados foi avaliado como apropriado (Tabela 2) para síntese e utilização em reações de amplificação do genoma da mamoneira, ou seja, 20%. Essa avaliação foi baseada na ausência ou presença tolerável de estruturas secundárias nos iniciadores que podem comprometer a sua qualidade por interferir no anelamento dos iniciadores ao DNA alvo durante a PCR. Essas estruturas são: auto-anelamentos, anelamentos entre os pares, grampos, pistas e repetições.

A figura 2 mostra a formação de uma grande quantidade de dímeros (anelamentos, 70%) e a combinação de grampos e dímeros (25%). Apenas 5% apresentaram formação de dímeros cruzados e autoanelamento. Todos os iniciadores que apresentaram dímeros na extremidade 3' foram desconsiderados pois, podem acarretar problemas em sua utilização devido a baixa estabilidade dos iniciadores.

Dentre os iniciadores aprovados houve em alguns casos ocorrência de estruturas secundárias, porém as mesmas podem ser toleradas.

5' - 3'	5'-3'
F: GCGTTATCAATCTTTTCGGTG	R:TATAGCAGGCCAAAGGGAGA
F: CCACAGCCTCCTCTTCACTC	R:TTGGTGGAAATAGTGGGAGC
F: AGAAGGGGAAAATGGAGGTG	R:GGAGAAATCTGTGGTAGCGG
F: AGAATGCTGTGAAAAGTGCC	R:TGAAAAGCACCAAGCAAGAA
F: AAAGGGAGGGAAGGAAGTGA	R:CATCTGCCGTTCTCCATAC
F: CACCAAGCACAGTTCACCAC	R: ATAAGTTGCTGCTGATGGGG
F: CAGGGACATAGTCGTCTCTTTA	R: CTGGATTCTTGACGTTGCTA
F: CATAACCCACAAATGAAAGTC	R: ATGCCTTTGCGAATCATAAC
F: GGAGCCTACTCTTGCCCTTC	R: AATGTCTGGGCGTAAGCAGT
F: ACAACCCAGCCCAAGTAA	R: ACACTCGCCGTTTTGTCTCT
F: CATAACCCACAAATGAAAGTC	R: ATGCCTTTGCGAATCATAAC

Tabela 2. Sequências dos pares de iniciadores SSR selecionados.



### Conclusão

Apesar da presença de um grande número de sequencias repetidas (SSR) para mamoneira, existe uma grande dificuldade em encontrar primers que possam ser utilizados numa posterior prática de PCR decorrente da possibilidade de formação de estruturas secundárias.

O desenho de iniciadores SSR mostra-se de fundamental importância para que se obtenha uma PCR com sucesso, pois apesar do desenho de primers ser um trabalho relativamente simples, envolve grandes custos para a posterior otimização dos mesmos.

**Palavras-chave:** *Ricinus communis*, Marcadores moleculares, Microsatélites, Diversidade genética.

### **Referências Bibliográficas**

BAJAY, M.M. **Desenvolvimento de marcadores microsatélite e caracterização do banco de germoplasma de mamona (*Ricinus communis* L.)**. 96p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba. 2009.

BUSO, G. S. C.; CIAMPI, A. Y.; MORETZSOHN, M. C.; AMARAL, Z. P. S.; BRONDANI, R. V. Desenvolvimento e caracterização de marcadores microsatélites em espécies vegetais tropicais/ Gláucia Salles Cortopassi. et al- **Revista biotecnologia ciência e desenvolvimento**- edição n° 30- Janeiro/ Junho. 2003.

CHAN, A.P.; CRABTREE, J.; ZHAO, Q.; LORENZI, H.; ORVIS, J.; PUIU, D.; MELAKE-BERHAN, A.; JONES, K.M.; REDMAN, J.; CHEN, G.; CAHOON, E.B.; GEDIL, M.; STANKE, M.; HAAS, B.J.; WORTMAN, J.R.; FRASER-LIGGETT, C.M.; RAVEL, J.; RABINOWICZ, P.D. Draft genome sequence of the oilseed species *Ricinus communis*. **Nature Biotechnology**, v.28, p.951-956, 2010.

GIRARDON, L. F.; SANTOS, F. F.; CHAVES, A. L.; OLIVEIRA, A. C. **A Importância do Desenho de Primers**. 2009.

LITT, M.; LUTY, J. A. A Hypervariable Microsatellite Revealed by In Vitro Amplification of a Dinucleotide Repeat within the Cardiac Muscle Actin Gene/ Michael Litt and Jeffrey A. Luty – Portland, 401 p. 1989.

MARTINS, W.S.; LUCAS, D.C.S.; NEVES, K.F. de S.; BERTIOLI, D.J. WebSat – a web software for microsatellite marker development. **Bioinformatics**, v.3, p.282-283, 2009.

MACHADO, E. L. **GENOTIPAGEM, TEOR DE ÓLEO, OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO GRAVIMÉTRICO E DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSATÉLITE EM *Ricinus communis* L.** Edna Lobo Machado- Cruz das Almas, 118 pg. 2011.

---

NETO, F. V. B. et al. Descritores quantitativos na estimativa da divergência genética entre genótipos de mamoneira utilizando análises multivariadas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 2, p. 294-299, 2010.

PREMIER BIOSOFT. **NetPrimer**. Available at: . Accessed on: 1 Dec. 2013.

---

**PRODUÇÃO DE CELULASE EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA  
UTILIZANDO RESÍDUO LIGNOCELULÓSICO DE SISAL (*Agave  
sisalana*)**



## **PRODUÇÃO DE CELULASE EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO RESÍDUO LIGNOCELULÓSICO DE SISAL (*Agave sisalana*)**

Vinícius de J. Nunes<sup>1</sup>, Jackeline P. Andrade<sup>2</sup>, Naíra Suele da C. Santos<sup>3</sup>, Carina S. Guedes<sup>3</sup>, Dayana da S. Correia<sup>4</sup>, Rodrigo P. do Nascimento<sup>5</sup>, Phellippe Arthur S. Marbach<sup>6</sup>

Pesquisa Institucional desenvolvida no Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Laboratório de Biologia Evolutiva (LABEV), Projeto de trabalho de conclusão de Curso.

<sup>1</sup>Aluno do curso de Mestrado em Solos e Qualidade de Ecossistemas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, [viniciusjnunes@gmail.com](mailto:viniciusjnunes@gmail.com); <sup>2</sup>Aluna do curso de Doutorado em Biotecnologia (Renorbio), Universidade Federal da Bahia, [jackelineandrade@hotmail.com](mailto:jackelineandrade@hotmail.com); <sup>3</sup>Aluna do curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, bolsista Fapesb, [nairasuele@yahoo.com.br](mailto:nairasuele@yahoo.com.br), [cari.guedes@hotmail.com](mailto:cari.guedes@hotmail.com); <sup>4</sup>Pós-Doutora da Universidade Federal da Bahia, bolsista Fapesb, [dayana.ufba@gmail.com](mailto:dayana.ufba@gmail.com); <sup>5</sup>Professor Doutor da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, [rpn1978@gmail.com](mailto:rpn1978@gmail.com); <sup>6</sup>Professor Doutor do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Orientador, [phmarbach@hotmail.com](mailto:phmarbach@hotmail.com).

### **Introdução**

O sisal (*Agave sisalana*) é uma das principais culturas do semi-árido Brasileiro, uma vez que ele tolera as condições edafo-climáticas dessa região, caracterizadas pela limitada disponibilidade de água e altas temperaturas. Por isso, essa cultura se tornou uma importante alternativa para muitas famílias que vivem nessa região e em regiões próximas. O sisal é cultivado para produção de fibras lignificadas que são utilizadas desde o artesanato até a construção civil.

O Estado da Bahia é o maior produtor da fibra de sisal, com 96,5 % da produção nacional (IBGE, 2012). Com base no Levantamento Sistemático de Produção Agrícola – IBGE, em 2012 a área plantada no estado com o sisal foi em torno de 253.059 ha, com uma produção de 242.852 toneladas de fibra de sisal. O processamento da fibra de sisal gera 90 % (m/m) de resíduos, entre eles o suco de sisal 81 % (m/m). Esses resíduos ainda são pouco aproveitados, embora sejam ricos em carboidrato, o suco de sisal, por exemplo, possui em torno de 5,3 % de carboidratos solúveis (CAMPOS, 2010).

Os resíduos sólidos (resíduos lignocelulósicos) e líquidos (suco do sisal) proveniente do beneficiamento da fibra do sisal são fontes alternativas de carbono de baixo custo, abundantes na região nordeste do Brasil e ainda pouco explorados para

produção de celulase por fungos filamentosos. Considerando o percentual de resíduo lignocelulósico descartado durante a produção da fibra de sisal, a produção de etanol de segunda geração a partir destes resíduos é uma alternativa a ser considerada para a produção deste biocombustível.

A hidrólise da celulose é a etapa inicial do processo de produção do etanol de segunda geração, sendo, em geral, feita por celulases produzidas por microrganismos. As celulases atuam nas ligações glicosídicas  $\beta$  (1,4) das microfibrilas de celulose, resultando na liberação de oligossacarídeos, celobiose e glicose (DILLON, 2004).

A completa degradação da celulose requer ação sinérgica de um complexo de enzimas celulolíticas, composto por: endoglucanases - (EC 3.2.1.4) hidrolisam randomicamente as ligações glicosídicas da estrutura amorfa da fibra de celulose, liberando oligossacarídeos com diferentes graus de polimerização e novos terminais redutores e não redutores; exoglucanases - são formadas por duas enzimas distintas, a 1,4- $\beta$ -D-glucana-glucano-hidrolase (EC 3.2.1.74) que libera glicose diretamente do polímero e 1,4- $\beta$ -D-glucana-celobio-hidrolase (EC 3.2.1.91) que catalisa a hidrólise dos terminais redutores (enzimas do tipo I) e não redutores (enzimas do tipo II) da fibra celulósica e oligossacarídeos em celobiose;  $\beta$ -glicosidases - (EC 3.2.1.21), hidroliza celobiose e oligossacarídeos solúveis em glicose (LYND et al., 2002)

Dentre os gêneros de fungos filamentosos que apresentam bom arsenal enzimático para degradar a celulose está o gênero *Penicillium* sp. Em geral, as espécies desse gênero são especialmente boas produtoras de endoglucanases, contudo existem espécies que também são boas produtoras de exoglucanase, por exemplo, o *Penicillium occitanis*, que apresentou excelente produção dessa enzima, superando o *Trichoderma reesei* RUT-C30 considerado referência para produção de exoglucanase (BHIRI et al., 2010). Além disso, espécies desse gênero também são utilizadas no controle biológico, produção de metabólitos secundários, alimentos, fármacos (PALLU, 2010).

A restinga é um local favorável para encontrar esses fungos celulolíticos, por ser um ambiente hostil, com restrição nutricional e conter muita matéria orgânica de origem vegetal disponível. Por isso, pode-se inferir que esses fungos devem competir pela celulose, secretando grande quantidade de celulase ou produzindo celulases com alta atividade catalítica.

Nesse contexto esse trabalho teve como objetivo isolar fungos filamentosos celulolíticos da serrapilheira da Formação Arbustiva Aberta (moita) e da mata periodicamente inundada (mata) da restinga de Guaibim, Bahia e avaliar o potencial biotecnológico de isolados do gênero *Penicillium* sp. quanto a produção de endoglucanase e exoglucanase utilizando resíduo lignocelulósico de sisal como fonte de carbono.

## Metodologia

### Obtenção dos microrganismos

Foram realizadas três coletas de serapilheira na moita e na mata da restinga de Guaibim, nos meses de Agosto, Outubro e Novembro de 2012. Em cada formação vegetacional foram coletadas amostras compostas de serapilheira em quatro pontos denominados Moita Norte, Moita Sul, Mata Norte e Mata Sul. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis e transportadas para o laboratório de Biotecnologia Microbiana, na UFRB para posterior manipulação.

### Processamento das Amostras

A serapilheira foi lavada em água destilada, em seguida foi pesada 25 g e fracionada em pedaços pequenos de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>. Estes fragmentos foram transferidos para um Erlenmeyer de 500 mL, foram lavadas por 15 vezes com água destilada mais tween 20 (0,001%) e logo após, mais 5 vezes com água destilada. Posteriormente as lavagens, os fragmentos foram triturados no liquidificador com 225 mL de solução salina 0,85 % (p/v), sendo obtida a diluição 10<sup>-1</sup>. Uma alíquota de 1 mL foi transferida para 9 mL de solução salina 0,85 % (p/v), obtendo então a diluição 10<sup>-2</sup>, esse procedimento foi repetido para obter a diluição de 10<sup>-3</sup>. A partir da última diluição, 1,0 mL foi transferido para três placas de Petri contendo meio de sais, suplementado com celulose microcristalina como única fonte de carbono. As placas foram incubadas em B.O.D. a 28 °C durante dez dias. Após esse período, os isolados foram transferidos para meio de ágar malte 50 % para selecionar os diferentes morfotipos. Todos os isolados obtidos foram salvos pelo método de Castellani (FIGUEIREDO, 1967) e incorporados ao acervo de fungos celulolíticos do Laboratório de Biologia Evolutiva (LABEV) da UFRB.

### Verificação da produção de endo e exoglucanase utilizando resíduo de sisal

Dentre os diferentes gêneros que foram obtidos com essas coletas, apenas os isolados do gênero *Penicillium* sp. foram utilizados para verificar a produção de celulase utilizando resíduo de sisal por meio de fermentação submersa. Um disco de 15 mm de cada fungo foi transferido para dois Erlenmeyers de 500 mL contendo 120 mL de solução de sais minerais, constituído por (MANDELS; WEBER, 1969) pH 6,0 (grama por litro): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,4; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,3; CaCl<sub>2</sub> 0,3; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,005; MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0,00156; ZnSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O 0,0014; CoCl<sub>2</sub> 0,0043; Extrato de Levedura 3,0 e suplementado com 1,2 g de resíduo de sisal seco e moído com partículas de 1 mm. Em seguida os Erlenmeyers foram incubados em agitador a 28 °C por 6 dias, a 150 rpm. A cada dois dias foram retirados alíquotas de 2,5 mL, centrifugadas a 4500 rpm a 4 °C por 15 minutos e, em seguida, realizadas as quantificações enzimáticas de endo e exoglucanase, como descrito por Ghose (1987).

## Determinação da atividade de Exoglucanase (FPase) e de Endoglucanase (CMCase)

A atividade de FPase foi determinada por meio da quantificação dos açúcares redutores produzidos durante a incubação da mistura reacional, que consiste em 0,5 mL do extrato enzimático com 1,0 mL tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4.8), contendo 50 mg de papel filtro Whatman n°1, a 50 °C por 60 min (GHOSE, 1987), pelo método do Ácido Dinitrosalicílico (MILLER, 1959). A leitura das atividades foi realizada em espectrofotômetro a 550 nm e os resultados foram apresentados em U/mL onde cada unidade (U) corresponde à quantidade de  $\mu$ moles de açúcares redutores liberados por minuto.

A atividade de CMCase foi determinada por meio da quantificação dos açúcares redutores produzidos durante a incubação da mistura reacional que consiste em 0,6 mL do extrato enzimático com 0,6 mL da solução 2,0 % carboximetilcelulose (CMC) em tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4.8), 50 °C por 20 min (GHOSE, 1987), pelo método do Ácido Dinitrosalicílico (MILLER, 1959). A leitura das atividades foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm e os resultados também foram apresentados em U/mL.

## Resultados e Discussão

Foram obtidos 516 isolados fúngicos celulolíticos da serapilheira de dois ambientes diferentes (moita e mata) da restinga de Guaibim. Isolados do gênero *Penicillium* sp. foram os mais representativos em ambos ambientes, totalizando 54 morfotipos. Por esse motivo e pelo fato de já existir na literatura estudos mostrando o potencial biotecnológico de espécies desse gênero para produção de enzima, eles foram selecionados para esse estudo.

Os isolados de *Penicillium* apresentaram uma maior atividade de endoglucanase (CMCase) do que de exoglucanase (FPase) (Figuras 1 e 2). Os isolados que apresentaram maior atividade de CMCase (Figura 1) foram: 2PE1MTS, PE2MOS e PE4MOS, com uma atividade enzimática de 1,013, 0,935 e 0,804 U/mL, respectivamente. Todos eles tiveram o pico de atividade no sexto dia de fermentação. Nunes et al. (2011) utilizaram o isolado *Penicillium* sp. IS-07 em um planejamento fatorial, variando concentrações de resíduo de sisal como fonte de carbono, o qual apresentou atividade de CMCase de 0,31 U/mL, mostrando que os isolados 2PE1MTS, PE2MOS e PE4MOS, obtiveram valores superiores aos utilizados no trabalho citado.

Santos (2012) trabalhou com fungos celulolíticos obtidos do solo da Formação Arbustiva Fechada da restinga de Guaibim. Com esses fungos foi realizada quantificação da atividade de CMCase utilizando papel filtro como fonte de carbono. Dois desses isolados (*Penicillium* sp. IS-15 e IS-06) se destacaram com uma atividade de 2,003 U/mL e 1,701 U/mL respectivamente, no sétimo dia de fermentação. Andrade (2013), também trabalhou com fungos celulolíticos obtidos do

solo da restinga de Guaibim, mas da Formação Arbustiva Aberta (moita e entre moita). Com todos os isolados também foi realizada a quantificação da atividade de CMCase, utilizando como fonte de carbono o papel filtro. A espécie *Penicillium guanacastense* se destacou apresentando 0,98 U/mL de atividade.

Os isolados com maior atividade de FPase (Figura 2) não corresponderam aos melhores produtores de CMCase, sendo os melhores, os isolados 2PE1MOS (0,087 U/mL), PE15MTN (0,084 U/mL) e PE5MON (0,083 U/mL), estes também apresentaram atividade máxima no sexto dia de fermentação.

Em estudo envolvendo a quantificação da atividade de FPase pelo fungo *Penicillium brasilianum* IBT 20888, quando cultivado em biorreator em meio contendo extrato de levedura e madeira de pinheiro foi observado valor de 0,59 U/mL de FPase (JORGENSEN; OLSSON, 2006).

Andrade et al. (2011) obteve de solo da Formação Arbustiva Aberta da restinga de Guaibim, um isolado de *Trichoderma* sp. IS-05. A atividade de FPase desse isolado foi quantificada utilizando farelo de trigo como fonte de carbono. Após a otimização da atividade da enzima, atingiu a produção de 1,224 U/mL. Esse é mais um estudo que reforça o potencial biotecnológico da micobiota da restinga. Deste modo, este trabalho corrobora com outros estudos, onde são observados fungos com potencial para a produção de enzimas celulolíticas.

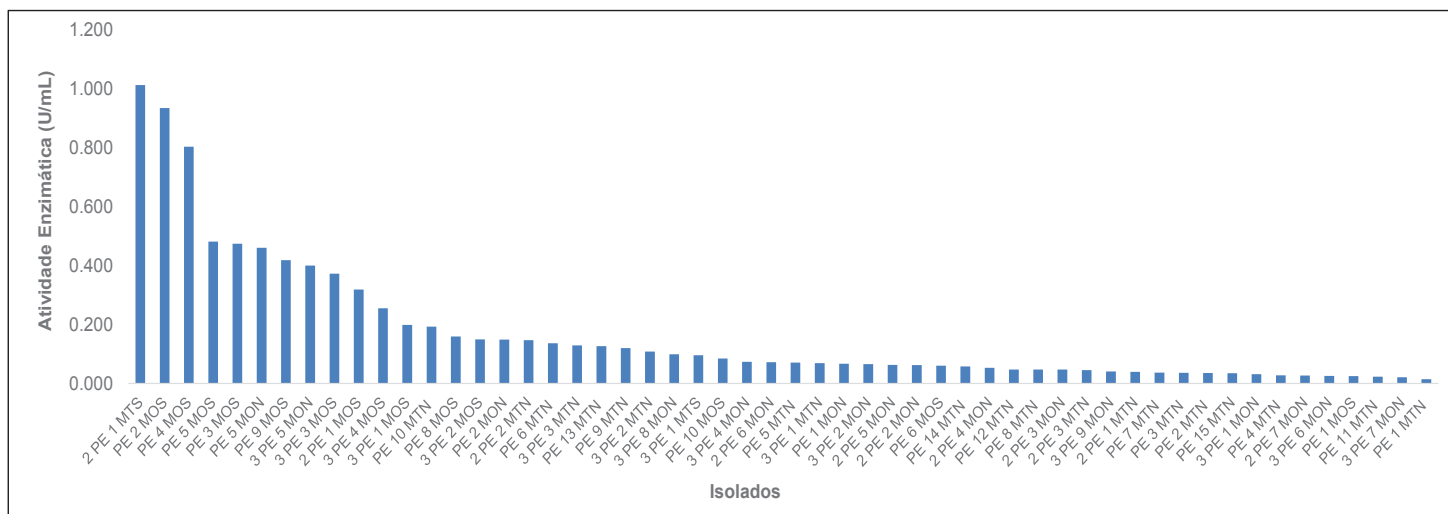


Figura 1. Melhor atividade enzimática de CMCase de todos os isolados do gênero *Penicillium* sp. utilizando resíduo lignocelulósico de sisal como fonte de carbono.



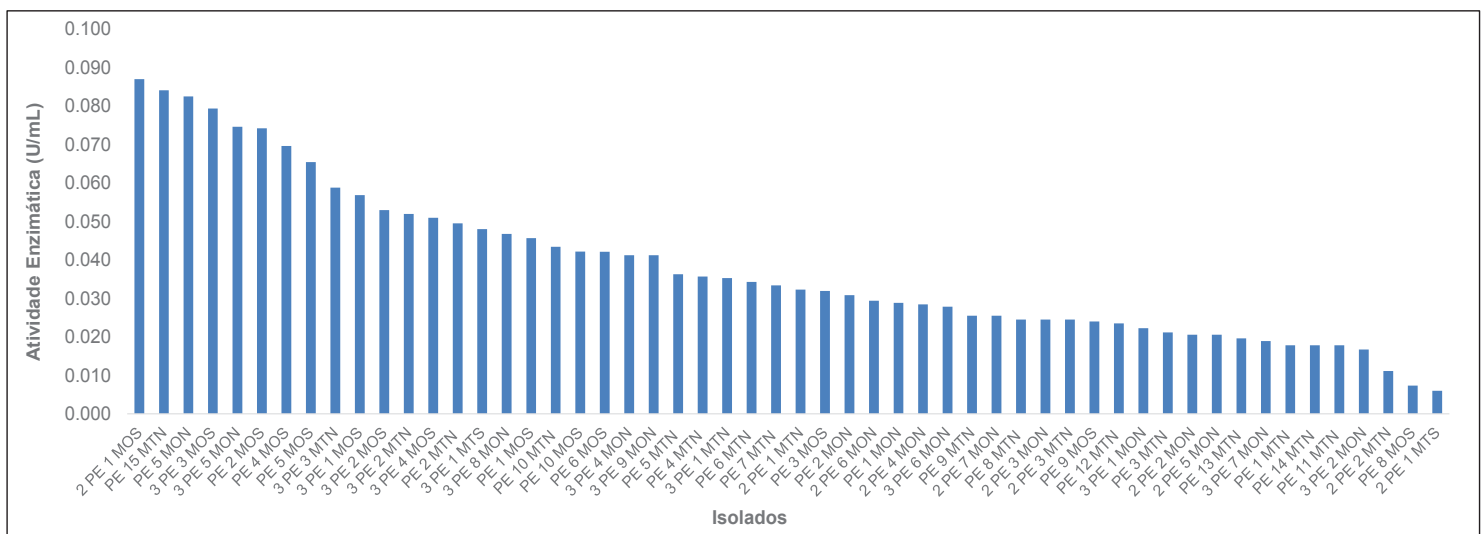


Figura 2. Melhor atividade enzimática de FPase de todos os isolados do gênero *Penicillium* sp. utilizando resíduo lignocelulósico de sisal como fonte de carbono.

## Conclusão

Os isolados do gênero *Penicillium* sp., foram promissores na obtenção de enzimas celulolíticas, principalmente endoglucanase (CMCase) utilizando resíduo de sisal.

**Palavras-Chave:** celulase, fungos, restinga

## Agradecimentos

Apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (CNPq).

## Referências

ANDRADE, J. P. Fungos Celulolíticos da Formação Arbustiva Aberta da Restinga de Guaibim, Bahia. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas (BA), 2013.

ANDRADE, J. P.; BISPO, A. S. R.; MARBACH, P. A. S.; NASCIMENTO, R. P. Production and Partial Characterization of Cellulases from *Trichoderma* sp. IS-05 Isolated from Sandy Coastal Plains of Northeast Brazil. *Enzyme Research*. 7 pg. 2011.

BHIRI, F.; GARGOURI, A.; BEN ALI, M.; BELGHITH, H.; BLIBECH, M.; CHAABOUNI, S. E. Molecular cloning, gene expression analysis and structural modeling of the cellobiohydrolase I from *Penicillium occitanis*. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v. 46, n. 2, p. 74–81. 2010

CAMPOS, M. I. Fermentação de suco de sisal para a produção de goma xantana. Dissertação MSc, Fac. Farmácia, UFBA. 2010.

DILLON, A. Cellulases. In: SAID, S. e PIETRO, R. C. L. Enzimas como agentes biotecnológicos. Ribeirão Preto: *Legis Summa*, p. 243-270, 2004.

FIGUEIREDO, M. B. Estudos sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patógenos em plantas. *O Biológico*, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 9-13, 1967.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. *Pure & Applied Chemistry*, vol. 59, no. 2, pp. 257–268, 1987.

JORGENSEN H.; OLSSON L., Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT 20888 - Effect of substrate on hydrolytic performance. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, 38 381–390. 2006.

LYND, L. R. WEIMER, P., ZYL, W. H. V. e PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MANDELS, M. e WEBER, J. The production of cellulase. *Adv. Chem. Series*, v. 95, pp. 391-414. 1969.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, vol. 31, no. 3, pp. 426–428, 1959.

NUNES, V. J.; SANTOS, J. C.; ANDRADE, J. P.; FERREIRA, M. A.; NASCIMENTO, R. P.,. Produção de endoglucanases por *Penicillium* sp. IS-07 utilizando diferentes condições de cultivo em fermentação submersa. In: Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM, Caxias do Sul. Anais do XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos. 2011.

PALLU, A. P. S. Potencial biotecnológico de fungos de gênero *Penicillium* e interação com cana-de-açúcar. 129 p. Tese Doutorado em Ciências – Universidade de São Paulo. Piracicaba. 2010

SANTOS, J. C. Potencial biotecnológico de fungos filamentosos celulolíticos isolados de restinga. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas (BA), 2012.

**TOLERÂNCIA À SALINIDADE EM PLANTAS DE FEIJÃO  
(*Phaseolus vulgaris* L.) POR BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS**

## **TOLERÂNCIA À SALINIDADE EM PLANTAS DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.) POR BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS**

**Eliane de Souza Silva<sup>1</sup>, Antonia Edina de Souza Silva<sup>2</sup>, Vanessa Ferreira<sup>3</sup>,  
Elizabeth Amélia Alves Duarte<sup>4</sup>, Thiago Alves Santos de Oliveira<sup>4</sup>, Adailson  
Feitoza de Jesus dos Santos<sup>5</sup>, Ana Cristina Fermino Soares<sup>6</sup>**

Pesquisa Institucional desenvolvida no Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, pertencente ao Grupo de Pesquisa em Biotecnologia Microbiana Aplicada à Agricultura; Trabalho de Dissertação da primeira autora.

<sup>1</sup>Mestranda em Microbiologia Agrícola- UFRB ([any1y@hotmail.com](mailto:any1y@hotmail.com)), <sup>2</sup>Graduanda em Biologia licenciatura-UFRB, <sup>3</sup>Graduanda em Engenharia Agrônômica-UFRB, <sup>4</sup>PNPD\Capes-UFRB, <sup>5</sup>Professor- UNEB <sup>6</sup>Professora adjunta UFRB-CCAAB.

### **Introdução**

O semiárido do nordeste caracteriza-se por apresentar baixa pluviosidade e alta evapotranspiração. Diante dessas condições, os principais problemas são a escassez de água aliado a salinização e sodificação dos solos através de processos naturais resultantes primariamente por manejo inadequado do solo e da água (COELHO, 2012).

A salinidade é um dos fatores que mais limita a produtividade na agricultura, devido aos efeitos adversos na germinação, crescimento das plantas e produção agrícola (MUNNS e TESTER, 2008). A diminuição da produtividade é consequência dos acréscimos salinos impostos à cultura, por meio da água de irrigação durante seu ciclo (Bezerra et al., 2010). Estima-se que quase 100 milhões de hectares de solos sob cultivo são afetados pela alta salinidade (SZABOLCS, 1994; MONTEIRO, 2010). O acúmulo de sais no solo acarreta em redução do potencial hídrico do solo, o que prejudica a absorção de água pelas plantas. A deficiência na absorção de água, associada aos efeitos tóxicos dos sais interfere no processo de embebição das sementes, exercendo influência no desenvolvimento normal das plantas (REBOUÇAS, et al., 1989).

Uma das primeiras respostas das plantas ao estresse salino é a redução da expansão da superfície foliar, aliado a uma intensificação do estresse (WANG e NIL 2000). De acordo com Grigore et al., (2011); Matthew e Hasengawa, (2005); Hasegawa et al., (2000); Duca e Bârsan, 2001), o estresse salino envolve um número de mecanismos tais como: homeostase balanço osmótico, síntese e acumulação de muitos osmólitos orgânicos como: prolina, batatina, poliaminas e açúcares solúveis (acredita-se ser osmoprotetores), e proteínas, aumento na taxa de respiração toxicidade de íons (SUDHIR e MURTHY, 2004), mudanças no metabolismo de C e N (KIM et al., 2004), decréscimo na biossíntese de clorofila (KHAN, 2002), bem como ineficiência da fotossíntese (MUNNS, 2002).

Nos últimos anos tem-se dado grande atenção a alternativas ecologicamente viáveis visando uma agricultura sustentável com ênfase no uso de microrganismos benéficos (PAUL, 2014). Segundo Kavamura (2012), a proteção de plantas contra os estresses ambientais pode ser adquirida inoculando-se microrganismos capazes de promover o crescimento em condições de estresse ou ainda pode ser de forma

gênica, por meio da inserção de genes de resistência ao estresse em plantas. O uso de bioinoculantes tolerantes ao sal é melhor alternativa para uma agricultura sustentável em solos salinos (Barua et al., 2012).

Bactérias diazotróficas apresentam atividade fisiológica benéfica, com importantes funções no sistema bactéria-solo-plantas, tais como, solubilização de fosfato inorgânico, fixação biológica de nitrogênio (FBN) e resistência à elevada concentrações de sais. O presente trabalho teve por objetivo selecionar bactérias diazotróficas que promovam o crescimento de plantas de feijão submetidas ao estresse salino, em condições de casa de vegetação, visando a implantação de sistemas de produção agrícola mais sustentáveis, com melhor aproveitamento dos recursos naturais. Esse *screening* deve-se, ao potencial notório desses microrganismos no que se referem aos benefícios proporcionados as plantas principalmente sob estresses abióticos.

## **Metodologia**

### **Indução de salinidade**

Com base em resultados preliminares definiu-se uma dose de 60 mMol de NaCl que corresponde a 6 dS m<sup>-1</sup>. Tal concentração foi suficiente para causar estresse nas plantas de duas variedades de feijão *Phaseolus vulgaris* L. (BRS Estilo e BRS Ametista), respectivamente reportadas como mais e menos tolerantes a estresse salino.

O solo foi coletado na área de pastagem do campus da UFRB e analisado para as características químicas no Laboratório de Irrigação e Salinidade, da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), em Campina Grande, PB. Para indução da salinidade, o solo foi saturado com uma solução contendo água destilada e NaCl na concentração supramencionada. Após a saturação, os vasos foram pesados e esperou-se um período de 5 a 10 dias até que os mesmos atingissem a capacidade de campo, para implantação do experimento. A irrigação foi feita exclusivamente com água destilada, para evitar a alteração da concentração de sal no solo.

### **Obtenção das sementes e preparo do inóculo**

As sementes de ambas as cultivares foram cedidas pela Embrapa Arroz e Feijão de Santo Antônio de Goiás-GO.

Foram avaliados 10 isolados de bactérias diazotróficas, previamente identificados como: *Enterobacter* sp., *Cellulomonas homini*, *Burkholderia cenocepacia*, *Rhizobium* sp., *Geobacillus* sp., *Rhizobium miluonense*, *B. megaterium*, *Bacillus safensis* e mais dois isolados do gênero *Bacillus* ainda não identificadas ao nível de espécie.

As sementes foram desinfestadas superficialmente e microbiolizadas, sendo imersas em uma suspensão bacteriana (Densidade óptica a 600nm= 0,5) que corresponde a 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, por 30 minutos. Em seguida, foram plantadas em vasos plásticos com capacidade para 3 kg, contendo o solo com presença e ausência de NaCl.



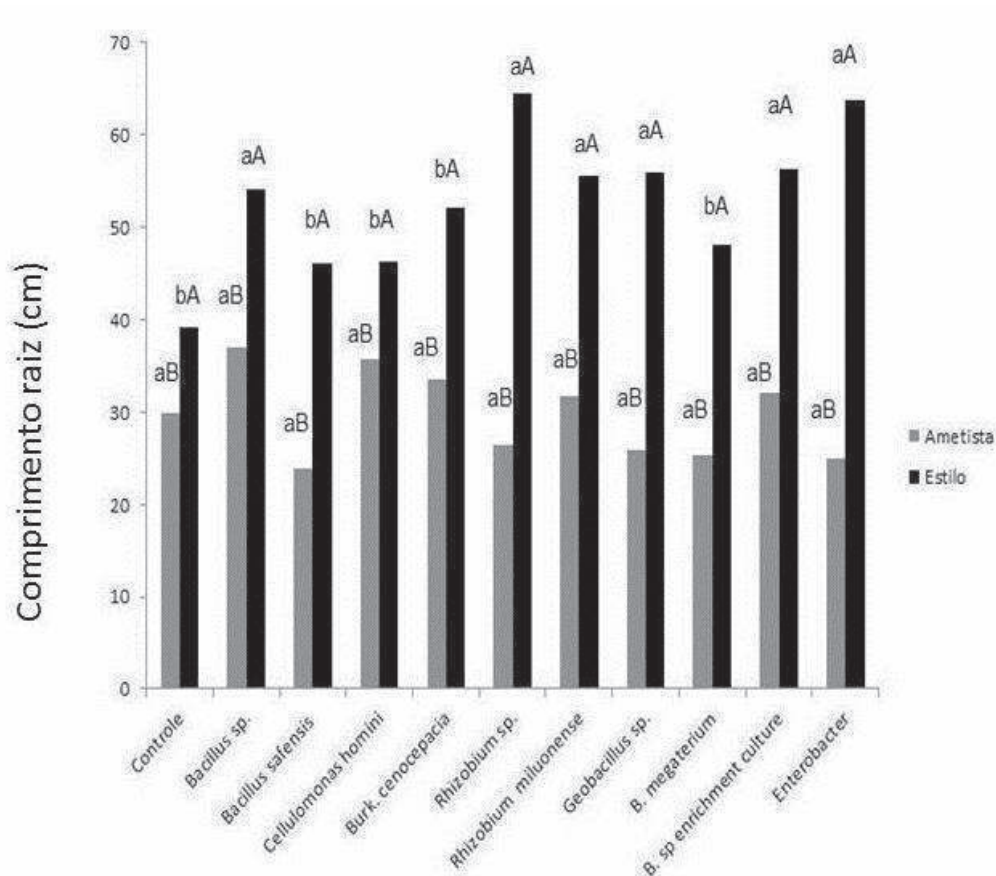
## Delimitação experimental

O experimento foi conduzido em um delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro repetições e com o seguinte esquema fatorial: 10 x 2 x 2 + 2, (10 bactérias; 2 variedades de feijão; presença e ausência de NaCl; 2 testemunhas ambas sem bactérias com e sem sal). Os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando o software estatístico Statistical Analysis System (SAS).

As plantas foram coletadas após um período de 60 dias e foram submetidas às avaliações de comprimento de raiz, massa fresca e seca da raiz.

## Resultados e discussão

Houve efeito significativo apenas para a interação, cultivar x bactérias (Figura 1).



**Figura 1.** Efeito da interação (cultivar x bactéria), referente ao comprimento da raiz em (cm) de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar BRS Estilo e BRS Ametista, submetidas ao cultivo em solo salino e não salino e inoculados com bactérias diazotróficas. Letras maiúsculas comparam as variedades e letras minúsculas comparam o tratamento com bactérias, respectivamente pelo teste F e pelo teste de Scott Knott, ambos 5% de probabilidade.

Para a cultivar 'BRS Estilo', a inoculação com os 10 isolados bacterianos apresentou efeito significativo, com maior comprimento da raiz quando comparado à

testemunha. As bactérias *Rhizobium* sp, *Rhizobium miluonense*, *Geobacillus* sp, *Enterobacter* sp e duas do gênero *Bacillus*, estimularam o crescimento das raízes nas condições de salinidade aplicadas neste trabalho e, possivelmente, remetem à condição de adaptação desta cultivar reportada como tolerante a estresse salino. A presença de bactérias diazotróficas foi descrita como responsável pelo estímulo ao crescimento de raízes de *Phaseolus* em diferentes concentrações de NaCl (EGAMBERDIE, 2011).

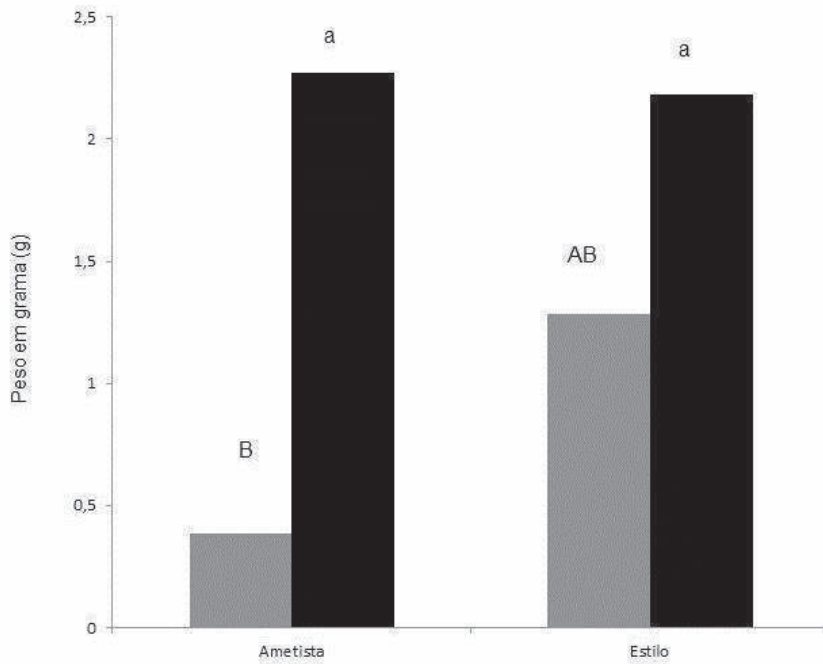
Segundo Davies e Zhang (1991); Zidan et al.,(1992) a inibição do crescimento da raiz pela salinidade causa redução na área radicular efetiva e volume de solo explorado. Como consequência dessa situação, o crescimento da parte aérea é prejudicado, devido ao decréscimo na absorção e no suprimento de nutrientes minerais essenciais e água.

Com relação a cultivar BRS Ametista, as bactérias do presente trabalho não promoveram diferenças significativas entre si e não proporcionaram aumento do comprimento da raiz quando comparada ao controle. Ressalta-se que esta cultivar é reportada como pouco tolerante ao estresse salino.

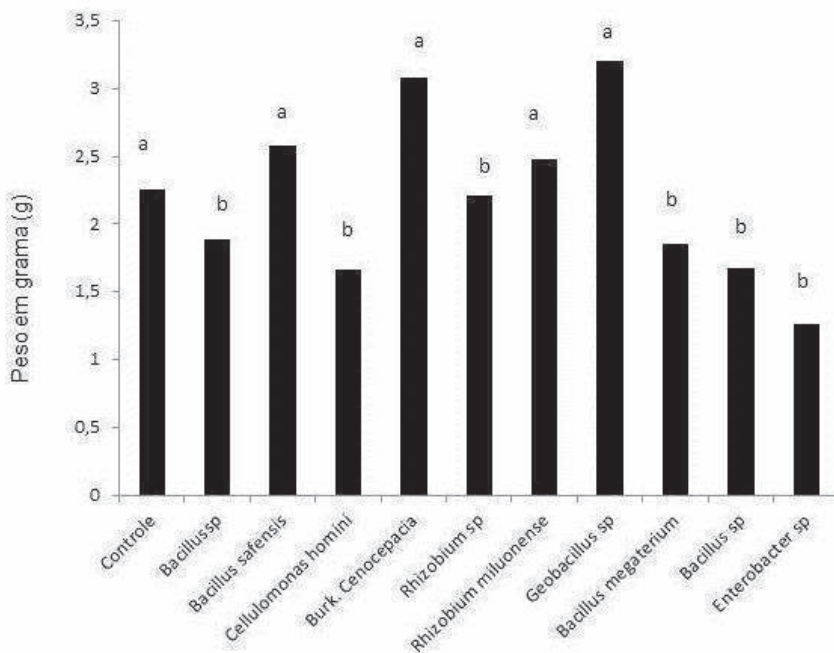
Embora exista uma relação entre os elevados níveis de salinidade com a perda da população bacteriana na rizosfera e raízes, comprometendo o crescimento da planta (SIDDQUI et al., 2003), não podemos inferir que a concentração salina aplicada neste estudo tenha interferido na população bacteriana testada, sobretudo quando observamos o melhor crescimento de raízes na cultivar BRS Estilo.

Geralmente a tolerância à salinidade tem sido estudada com base nos mecanismos de regulação da homeostase iônica e osmótica. A relação  $Na^+/K^+$  é usada como um índice que permite estimar a toxidez de íon  $Na^+$ , uma vez que esse cátion inibe a atividade das enzimas dependentes de íon  $K^+$  (JESCHKE, 1984). Nesse contexto, é válido ressaltar que a capacidade de manter uma relação  $Na^+/K^+$  relativamente baixa no citoplasma, e transportar os íons  $Na^+$  e  $Cl^-$  para longe dos sítios do metabolismo primário (folhas), são duas condições críticas para que ocorra o crescimento da planta em condições salinas (ULLAH et al., 1992; TESTER e DAVENPORT, 2003).

Para a variável massa fresca da raiz houve efeito significativo apenas para as interações (cultivar x sal) e (sal x bactéria) (Figuras 2 e 3).



**Figura 2.** Efeito da interação (cultivar x sal), referente à variável massa fresca da raiz em (g) de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivares BRS Ametista e BRS Estilo, submetidas ao cultivo em solo salino e não salino. Médias seguidas por letras maiúsculas representam a presença do NaCl e médias seguidas por letras minúsculas representam a ausência, ambas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



**Figura 3.** Efeito significativo da interação (sal x bactéria), referente à variável massa fresca da raiz em (g) de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivares BRS Ametista e BRS Estilo, submetidas ao cultivo em solo não salino e inoculados com bactérias diazotróficas. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de significância.

As cultivares de feijão em estudo comportaram-se, de forma semelhante, ou seja, apresentaram menor e maior valor de massa fresca de raiz na ausência e presença do NaCl respectivamente. Entretanto, a cultivar BRS Estilo quando cultivada em solo salino, apresentou maior tolerância ao estresse salino (Figura 4).

Na ausência do estresse salino, as cultivares se comportaram de forma análoga não diferindo entre si.

Lima (2008) observou redução da biomassa fresca (parte aérea e raízes), em duas cultivares de coentro submetidas a estresse salino. Tal fato pode estar relacionado à redução do potencial osmótico da solução do solo, que dificulta a condução da água em direção às células (Tester e Davenport, 2003) ou ainda por um suprimento inadequado de nutrientes para a planta devido a um desequilíbrio iônico provocado pelo excesso de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  (ALBERICO E CRAMER, 1993; TESTER e DAVENPORT, 2003).

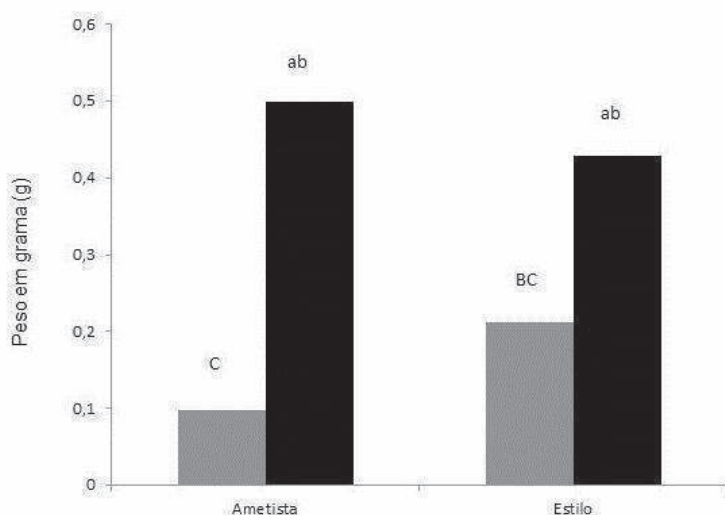
Para a interação (salinidade x bactéria), em solo salino, os tratamentos não diferiram entre si, diferiram apenas na ausência do NaCl (Figura 3).

O uso de isolados efetivos e eficientes para inoculações em leguminosas, em solos salinos, depende do potencial desses em crescer e persistir nessas condições (HASHIM et al., 1998). Sendo assim as bactérias que contribuíram para incremento de massa fresca da raiz foram: *Bacillus safensis*, *Burkholderia cenocepacia*, *Rhizobium miluonense* e *Geobacillus* sp. que diferiram entre as demais, porém, não diferiram entre si.

Ambas as cultivares apresentaram decréscimo de massa seca da raiz, na presença do NaCl. Na ausência do sal, observaram-se maiores valores de fitomassa seca de raiz. No entanto, as cultivares não diferiram entre si estatisticamente (Figura 5).



**Figura 4.** Raiz das cultivares BRS Ametista e BRS Estilo submetidas ao cultivo em solo salino.



**Figura 5.** Efeito da interação (cultivar x sal), referente à variável massa seca da raiz em (g) de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivares BRS Ametista e BRS Estilo, submetidas ao cultivo em solo não salino. Médias seguidas por letras maiúsculas representam a presença do NaCl e médias seguidas por letras minúsculas representam a ausência ambas pelo teste de Tukey a 1% de significância.

O estresse salino influenciou no crescimento das raízes, mas não influenciou no aumento de massa seca. Isso possivelmente está relacionado ao déficit de absorção de nutrientes, mesmo na cultivar 'BRS Estilo' que mostrou-se tolerante a

concentração salina aplicada. A alta concentração de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> compete com outros íons nutrientes, como K<sup>+</sup>, Ca<sup>+</sup>, N e P, resultando em prejuízo nutricional e, conseqüentemente redução na qualidade e produtividade vegetal (GRATTAN; GRIEVE, 1999).

Em um trabalho realizado por Basso et al., (2012), constatou-se que a maior massa seca de raiz proporcionou as melhores produções, mas não garantiu que a melhor produção estivesse relacionada a maior massa seca de raiz. Para Medeiros, Soares e Guimarães (2005) a compactação do solo e ou substrato, provoca redução da porosidade e da aeração diminuindo drasticamente a matéria seca de raiz.

### **Conclusões**

A cultivar BRS Ametista apresentou-se sensível a salinidade, quando comparada com BRS Estilo, independente da inoculação com as bactérias.

Não houve influencia das bactérias na tolerância a sensibilidade da cultivar BRS Ametista.

A cv 'BRS Estilo' apresentou-se tolerante a concentração de sal e essa condição parece ter sido influenciada pelas bactérias testadas, principalmente na variável comprimento da raiz.

**Palavras-Chave:** bactérias diazotróficas, feijão, tolerância, NaCl

### **Agradecimentos**

A UFRB, e a CAPES pela bolsa de mestrado e o financiamento do projeto de pesquisa.

### **Referências Bibliográficas**

ALBERICO, G.J.; CRAMER, G.R. Is the salt tolerance of maize related to sodium exclusion? I. Preliminary screening of seven cultivars. **Journal of Plant Nutrition**, v.16, n.11, p.2289-2303, 1993.

BARUA, S., TRIPATHIA, S., CHAKRABORTYB, A., GHOSH, S., CHAKRABARTIA, K. Characterization and crop production efficiency of diazotrophic bacterial isolates from coastal saline soils. **Microbiological Research** 167,95– 102, 2012.

BASSO, J. M.; TAKAHASHI, H. W.; FREGONEZI, G. A. F. Cultivo de feijão-vagem em vaso em diferentes substratos e condutividades elétricas da solução nutritiva. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 6, p. 2149-2162, 2012.

BEZERRA, A.K.P., LACERDA, C.F., HERNANDEZ, F.F.F., SILVA, F.B., GHEYI, H.R. Rotação cultural feijão caupi/milho utilizando-se águas de salinidades diferentes. **Ciência Rural** 40: 1075-1082, 2010.

COELHO, J. B. M., **Ponto de murcha permanente fisiológico e solutos orgânicos no feijoeiro vigna cultivado em solos salinos**. 72 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2012.



DAVIES, W.J.; ZHANG, J. Root signals and the regulation of the growth and development of plants in drying soil. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.42, p.55-76, 1991.

DUCA, M.; BÂRSAN, A. The modification of protein metabolism of sunflower plants under saline stress. **Romanian Agricultural Research**, 16, p.5-16, 2001.

EGAMBERDIEVA, D. Survival of *Pseudomonas extremorientalis* TSAU20 and *P. chlororaphis* TSAU13 in the rhizosphere of common bean (*Phaseolus vulgaris*) under saline conditions. **Plant soil environmental**, 6 p. 2011.

GRATTAN, S. R. e GRIEVE, C. M. Salinity- mineral nutrient relations in horticultural crops. **Sci. Hort.** v. 78, p. 127-157, 1999.

HASEGAWA, P. M; BRESSAN, R. A; ZHU, J. K. BOHNERT H. J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Physiology*. **Plant Mol Biol** 51:463–99. doi:[10.1146/annurev.arplant.51.1.463](https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.51.1.463), 2000.

GRIGORE, M. N.; BOSCAIU, M. VICENTE, O. Assessment of the Relevance of Osmolyte Biosynthesis for Salt Tolerance of Halophytes under Natural Conditions, **The European Journal of Plant Science and Biotechnology**, 5(2), pp.12-19, 2011.

HASHEM, F. M.; SWELIM, D. M.; KUYKENDALL, L. D.; MAHAMED, A. I.; WAHAB, A.; HEGAZI, N. I. Identification and characterization of salt and thermotolerant *Leucaena-nodulating Rhizobium* strains. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 27, p. 335-341, 1998.

JESCHKE, W.D. K<sup>+</sup>-Na<sup>+</sup> exchanges at cellular membranes, intracellular compartmentation of cations, and salt tolerance. In: STAPLES, R.C.;

LIMA, A. B. **Respostas fisiológicas e bioquímicas de cultivares de coentro (*Coriandrum sativum* L.) submetidas ao estresse salino.** Recife, 2008.55f. :il. Dissertação (mestrado)- Universidade Federal Rural de Pernambuco,2008.

KAVAMURA, V. N. **Bactérias associadas às cactáceas da Caatinga: promoção de crescimento de plantas sob estresse hídrico.** Piracicaba, 2012. 244 p: il. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2012.

KHAN, N.; ANSARI, M. H.; KHAN, R. M. Effect of phytohormones on growth and yield of Indian mustard. *Indian J. Plant Physiology.*,7, p 75-78, 2002.

KIM, Y.; ARIHARA, J.; NAKAYAMA, T., NAKAYAMA, N.; SHIMADA, S.; USUI, K. Antioxidative responses and their relation to salt tolerance in *Echinochloa oryzicola* vasing and *Stereaia viridis* (L.) Beauv. **Plant Growth Regul.**, 44, 87-92, 2004.

MATTHEW, A. J.; HASEGAWA, P. M., *Plant Abiotic Stress*, Blackwell Publishing, pp. 38-58, 2005.

MEDEIROS, R. D.; SOARES, A. A.; GUIMARÃES, R. M. Compactação do solo e manejo da água. I: efeitos sobre absorção de N, P, K, massa seca de raízes e parte

aérea de plantas de arroz. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 5, p. 940-947, 2005.

MONTEIRO, C.C. **Análise bioquímica do mutante hormonal de tomateiro *Never ripe (Nr)* submetido aos estresses por cádmio e salinidade**.120p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, SP, 2010.

MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell and Environment**, v.25, p.239-250, 2002.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, 59, 651-681, 2008.

PAUL, D.; LADE, H. Plant-growth-promoting rhizobacteria to improve crop growth in saline soils: a review. **Agron. Sustain. Dev.** 16p, 2014.

REBOUÇAS, M. A. A.; FAÇANHA, J. G. G. V.; FERREIRA, L. G. R.; PRISCO, J. T. Crescimento e conteúdos de N, P, K e Na em 3 cultivares de algodão sob condições de estresse salino. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 1, n. 1, p. 79-85,1989.

SIDDIQUI, I.A., SHAUKAT, S.S., KHAN, G.H., Ali N.I. Suppression of *Meloidogyne javanica* by *Pseudomonas aeruginosa* I.E.-6S+ in tomato: the influence of NaCl, oxygen and iron level. **Soil Biology and Biochemistry**, 35: 1625–1634, 2003.

SUDHIR, P.; MURTHY, S. D. S. Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. **Photosynthetica**, 42, pp. 481- 486, 2004.

SZABOLCS, I. Retrospects of soil salinity for the 21st century. In: world congress of soil science, 15. Acapulco. **Proceedings** Acapulco: Mexico University, p. 123-141, 1994.

TESTER, M.; DAVENPORT, R. Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants. **Annals of Botany**, v.91, p.503-527, 2003.

TOENNIESSEN, G.H. **Salinity tolerance in plants: strategies for crop improvement**. New York: John Wiley and Sons, p.37-66,1984.

ULLAH, S.M.; SOJA, G.; GERZABEK, M.H. Ion uptake, osmoregulation and plant-water relations in faba beans (*Vicia faba* L.) under salt stress. **Die Bodenkultur**, v.44, n.4, p.291-301, 1992.

WANG Y, NIL, N. Changes in chlorophyll, ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase, glycine betaine content, photosynthesis and transpiration in *Amaranthus tricolor* leaves during salt stress. **J. Hortic. Sci. Biotechnol.**, 75, pp. 623-627, 2000.

ZIDAN, I.; SHAVIV, A.; RAVINA, I.; NEUMANN, P.M. Does salinity inhibit maize leaf growth by reducing tissues concentrations of essential mineral nutrients? **Journal of Plant Nutrition**, v.15, p.1407-1419, 1992.

**XYLANASE PRODUCTION USING PEACH PALM (*Bactris gasepaes* Kunt.) WASTE ON SOLID STATE FERMENTATION AND SUBMERGED FERMENTATION**

# XYLANASE PRODUCTION USING PEACH PALM (*Bactris gasipaes* Kunt.) WASTE ON SOLID STATE FERMENTATION AND SUBMERGED FERMENTATION

Elck Almeida Carvalho<sup>1,2</sup>, Laís Vieira Nunes<sup>3</sup>, Ana Paula T. Uetanabaro<sup>2,4</sup>,  
Marcelo Franco<sup>3</sup>, Waldemar de Sousa Barreto<sup>4</sup>, Andréa Miura da Costa<sup>5\*</sup>,

<sup>1</sup>Federal Institute Baiano / Campus Uruçuca - Food Technology Center, CEP:  
45680-000, Ilheus - Bahia.

<sup>2</sup>Post graduate Program in Biology and Microbiol Biotechnology (PPGBBM),  
State University of Santa Cruz (UESC), CEP: 45662-900, Ilheus - Bahia.

<sup>3</sup>Department of Physical and Technological Sciences, State University of Santa  
Cruz, CEP: 45662-900, Ilheus - Bahia.

<sup>4</sup>CEPLAC, Executive Committee of the plan of cacao plantations, CEP: 45653-  
919, Ilheus - Bahia.

<sup>5</sup>Department of Biological Sciences, State University of Santa Cruz, CEP:  
45662-900, Ilheus - Bahia - \*corresponding author: [amcosta@uesc.br](mailto:amcosta@uesc.br)

## Introduction

In the manufacturing of peach palm, large volumes of waste are generated. Processing data of peach palm point out that only a palm plant can produce approximately 135 ton. month<sup>-1</sup> of waste throughout the year (MORAES et al., 2011). The accumulation of this waste creates environmental problems and also the loss of resources, with a significant contribution to the problem of recycling and conservation of biomass. Therefore, the use of waste in bioprocesses is a rational alternative for the production of substrates because these residues are sources for obtaining food, chemical and fuel products, since these lignocellulosic materials occupy a prominent place, especially in according to their abundance and their renewable nature (REYES et al., 1998).

The xylan is the major constituent of hemicellulose, considerable amounts of this biopolymer are found in agroindustrial waste. Its structure is composed of  $\beta$ -xylopyranose residues linked by  $\beta$ -1,4 linkages, with variable degrees of substitution in side chains. Xylan complete breakdown in nature requires the action of several enzymes, which are produced by different microorganisms, such as bacteria, yeasts and fungi. Some of the enzymes involved in this process are: endo- $\beta$ -1.4 xylanases (EC 3.2.1.8), which make the hydrolysis of the  $\beta$ -1.4 linkages on the main chain of the polysaccharide; and the  $\beta$ -xilosidases (EC 3.2.1.37), which hydrolyze the xylooligosaccharides to D-xylose (SANTOS and HISHII, 2011).

Xylanases have a great number of industrial applications such as: pulp bleaching, baking, bioconverting lignocellulosic biomass into simple sugars, used as an additive in monogastric feeding and producing various industrial chemicals, including biofuels (MARTIN-SAMPEDRO et al., 2011; BAREKATAIN et al., 2013; XIN and HE, 2013; OLIVEIRA et al., 2014; PANWAR et al., 2014).

The production of this enzyme from industrial peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) waste can be a way to reduce its final cost, and also reduce the

environmental problem of disposal of such waste. Fungi tend to easily adapt to growth and degradation of the waste, since they are able to synthesize enzymes bioconvertors easily assimilated compounds for their metabolism (PRADEEP et al., 2013).

The two main strategies for enzyme production by microorganisms are solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). The differentiation of these two types of processes is the water content present in the medium (ROBINSON and NIGAM, 2003). There are plenty of free water in the fermentation medium in the SmF. In the SSF the microorganism growth on humidified solid substrates and occur in absent of the free water.

Thus, this study aimed to select a filamentous fungus capable of producing significant amounts of the enzyme xylanase using peach-palm (*Bactris gasepaes*, Kunt.) waste in solid state fermentation and submerged fermentation.

## **Materials and Methods**

### **Peach-palm acquirement and preparation**

The waste, generated from peach-palm (*Bactris gasepaes*, Kunt.) processing, was acquired from the AGROCERES/INACERES Company, located in Uruçuca city, Bahia, Brazil. After the waste was washed in running water, it was submitted to a dehydration process in a drying chamber with air being circulated at 40°C for a 48 hour maximum period. After drying, the waste was grinded in a knife mill, packaged in polyethylene bags and stored at a temperature between 20°C and 25°C until use.

### **Chemical and Physico-chemical characterization of peach palm waste**

The peach palm waste were analyzed regarding humidity, ash, lipids, protein and crude fiber content according to the methodologies established by Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). The total caloric values of the peach palm waste were calculated from the centesimal composition data, using the conversion of following factors: 9 kcal g<sup>-1</sup> lipid, 4 kcal g<sup>-1</sup> protein, 4 kcal g<sup>-1</sup> carbohydrate. The mineral profile of peach palm waste was determined using atomic absorption spectrophotometry Perkin-Elmer, model 3030, USA, for Ca, Cu, Mg, Zn and Mn, molecular absorption spectrophotometry Varian, series 6345, USA, for Fe and flame photometry Micronal, model B-262, Brazil for K.

### **Fungi acquirement and maintenance**

The fungi that were used in this research were made available for use by isolating and selecting environmental microorganisms that were collected from the southern region of Bahia, these specimens belonged to a collection of fungal cultures from the Microbiology laboratory of Agroindustrial at State University of Santa Cruz, Bahia - Brazil. The isolates of *T. stromaticum* were acquired from the Almirante Cacau/ M&M Mars collection (Itajuípe, BA) and belongs to two different genetic groups: I (643) and II (64 and 113) [11]. All

isolates were kept for periodic sampling in potato dextrose agar, incubated at 30°C for up to 6 days and subsequently stored at 4°C until use.

#### Pre-selection of the fungus for xylanase production

Cultivation in solid medium plates was used to qualitatively analyze xylanase production by the staining method with Congo Red in a medium containing xylan as the only carbon source (MEDDEB-MOUELHI et al., 2014). The degradation capacity of the xylan was verified in the medium by the presence of clear zones, indicating hydrolysis halos, around the cultures. The enzymatic index (E.I.) of each microorganism was calculated by dividing the measurements of the hydrolysis halo with the diameter of the colony after a 24 hour growth period. Fungi with  $\geq 1.5$  enzymatic indexes were selected and forwarded to the fermentation step.

#### Submerged fermentation (SmF)

Erlenmeyer flasks (125 mL) were used containing 25 mL of Czapek liquid medium [ $\text{NaNO}_3$  (0.3%),  $\text{KHPO}_4$ , (0.1%),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.05%), and  $\text{KCl}$  (0.05%),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.001%)], pH 6.0. 10 g/L of dehydrated and grinded peach-palm waste was added to each flask as a carbon source. The medium was sterilized in an autoclave at 121°C for 15 minutes and subsequently inoculated with  $10^6$  spores/mL (JOSHI and KHARE, 2011). Incubation was performed at 30°C under agitation in a shaker (150rpm), for up to 9 days. Every 24 hours, aliquots of fermented material were removed which were then vacuum filtered in Whatman filter paper n°1 in order to obtain a crude limpid extract.

#### Solid State Fermentation (SSF)

Erlenmeyer flasks (125 ml) were used, 2.5g of dehydrated peach-palm waste were added and then humidified with MSS-1 salt medium [ $\text{NaNO}_3$  (0.3%),  $\text{KHPO}_4$ , (0.1%)  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.05%), and  $\text{KCl}$  (0.05 %),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.001 %)], pH 5.0, at a ratio of 2 mL/gds. The medium was sterilized in an autoclave at 121°C for 15 minutes and subsequently inoculated with  $10^6$  spores/g [13]. Incubation was performed at 30°C for 6 days in static cultivation. The cultivation was resuspended with the addition of sterile distilled water at a liquid/solid ratio of 10 mL/g of dry initial substrate and agitated in a shaker at 150 rpm for 30 minutes, after that, the material was filtered in 4 layers of gauze and the supernatant centrifuged at 12,000 g at 4°C for 15 minutes in order to obtain a crude limpid extract.

#### Xylanase activity

Xylanase activity in the obtained extracts was measured through the determination of reducing sugars as produced by the DNS method [14]. Spectrophotometric readings were performed at 540 nm. One unit of xylanase activity was defined as the amount of enzyme which is able to release  $1\mu\text{mol}$  of reducing groups per minute.



## Results and discussion

We tested 25 fungi filamentous on plates containing 0.5% xylan as substrate. We selected 4 filamentous fungi the *Penicillium* genus (*P. notatum*, *P. canescens*, *P. jathinellum*, *P. simplicissimum*,) and 4 of *Trichoderma* genus (*T. deliquescens*, *T. stromaticum* 064 and *T. stromaticum* 113 and *T. stromaticum* 643) for cultivation in SSF and SmF using as substrate the residue of peach palm (enzymatic index  $\geq 1.5$ ).

The xylanase activity when used SmF were much lower than the values found in the culture extract with SSF for all isolates, representing 1.2 to 9% of the values of activities obtained by the same crops in SSF (Table 02). Other studies (DATTA and SHAH, 2005; AGNIHOTRIET al, 2010) revealed that the xylanase production by SSF is typically much larger than SmF, possibly due to the cultivation of this way resemble the conditions under which the most of the microorganisms growing in nature and due to less dilution of the enzymes in a medium with low water content (ROBINSON and NIGAM, 2003).

The proposed residue seems to have favored the production of xylanase enzyme due to its rich mineral composition and limited by easily fermentable nutrients, leading the fungi to produce enzymes for energy through the complex carbohydrates breakdown such as hemicellulose (Table 01).

Also the SSF method have been favored by the wealth of peach palm fibers (29.9 g \* kg<sup>-1</sup>) which results in a porous agglomeration of its particles after drying and maceration. This type of clustering provided without promoting humidification of the compression means, which probably favored its aeration and allowed greater accessibility to the substrate

A range of studies demonstrates the feasibility and the best techniques for the use of lignocellulosic residues in SSF. For exemple, the studies of Azin et al., (2007) Sadaf and Khare, (2014) which optimized the production of xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* and *Sporotrichum thermophile* using the mixture of wheat bran and wheat straw, and *Jatropha* pie. This technique has the advantages of low initial investment cost of deployment, simplicity with high process volumetric productivity (SINGHANIA et al., 2010). In addition, the low moisture content of the substrate also reduces the problem of bacterial contamination, since many bacteria are unable to grow under these conditions (SHAH and DATTA, 2005).

Nonetheless, most producers of xylanase producing this enzyme using pure substrates with high cost and submerged fermentation technique (SMF) (almost 90% of the total xylanase sales worldwide) (POLIZELI et al., 2005). An alternative to this problem would be a narrowing between research centers and industries, as well as intensification of joint studies of cost and production optimization that would accelerate the introduction of these techniques on the market, which probably lead to cost reduction with consequent increase in enzyme consumption in industrial processes.

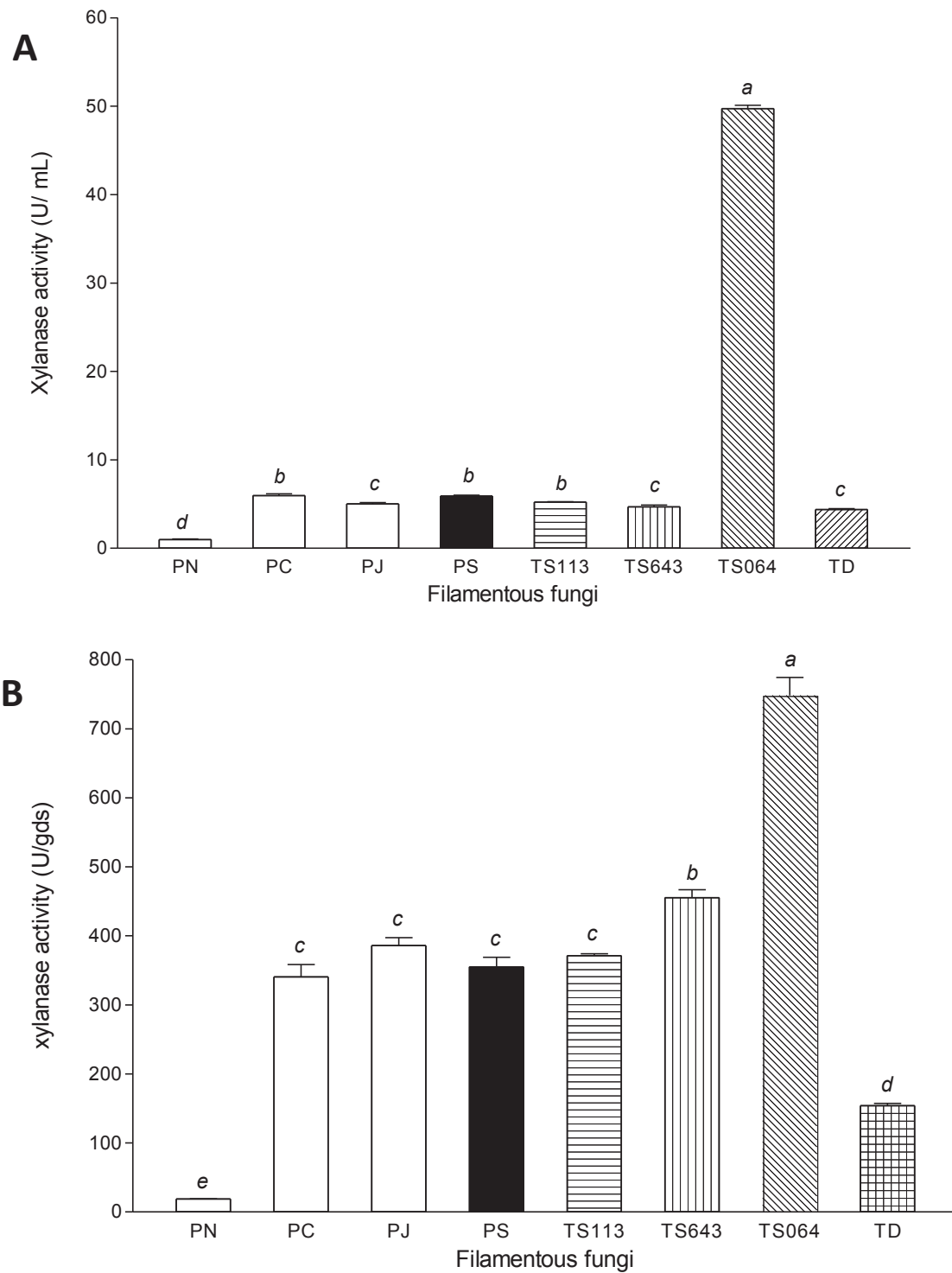


Figure 01 - Xylanase production by different filamentous fungi using peach palm waste and CZAPEC medium. A) SmF; B) SSF. PN: *Penicillium notatum*, PC: *Penicillium canescens*, PJ: *Penicillium jathinellum*, PS: *Penicillium simplicissimum*, TS113: *Trichoderma stromaticum* 113, TS643: *Trichoderma stromaticum* 643, TS064: *Trichoderma stromaticum* 064, TD: *Trichoderma deliquescens*. Averages of three experiments followed by different letters differ statistically  $p \leq 0.05$ .

The *T. stromaticum* 064 (Figure 01 A e B) was the best producer of xylanase enzyme using the peach palm waste in both SmF (50.00 U / mL extract) and in SSF (551.5 U / g of solid substrate) (Table 02; Figure 02).

Table 01 - Composition of the peach palm waste

Components	
Energy	219.65 Kcal*kg <sup>-1</sup>
	<b>Teor (g*kg<sup>-1</sup>)</b>
<b>Macronutrients</b>	
Humidity	11.91 ± 0.03
Protein	7.19 ± 0.02
Ash	5.13 ± 0.02
Lipids	1.53 ± 0.01
Carbohydrates *	44.28
Crude fiber	29.9 ± 0.05
	<b>Teor (mg*kg<sup>-1</sup>)</b>
<b>Micronutrients</b>	
Nitrogen	17.14 ± 0.01
Potassium	30.18 ± 0.03
Match	1.91 ± 0.01
Calcium	6.11 ± 0.01
Magnesium	4.34 ± 0.02
Iron	161.23 ± 0.03
Zinc	62.32 ± 0.01
Copper	15.65 ± 0.01
Manganese	87.13 ± 0.01

\* Carbohydrates were calculated by difference; Analyses carried out in triplicate.

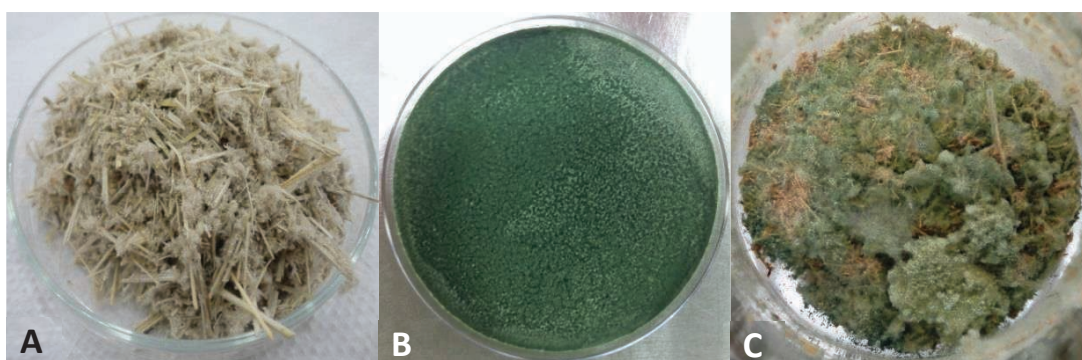


Figure 02 - A) Peach palm waste (crushed and dehydrated), B) *T.stromaticum* 064 growth on agar Saboroud and C) *T. stromaticum* 064 growth on peach palm waste.

The *T. stromaticum* xylanase activity in SSF was a greater than 11 times that found in the cultivation of SmF. There are reports in the literature that the fungi of the genus *Trichoderma* are responsible for the production of a wide range of enzymes, especially lignocellulolytic enzymes which are involved in the breakdown of agricultural wastes (DE SOUZA et al., 2006; CASAS-FLOWERS and MONFIL, 2014).

These fungi has been extensively studied as an antagonist to *Moliniophthora pernicioso*, agent of witches cocoa (*Theobroma cacao*) (DE SOUZA et al., 2006; LOGUERCIIO et al, 2009), however this is the first report of xylanase production.

The search and knowledge of new microorganisms that produce xylanase with potential biotechnological application is very important. because each microorganism has unique characteristics and the unique genome and different skills desirable from the industrial point of view (SOUZA et al., 2008). However, due to differences in physiological nature, nutrition and biochemistry of microorganism selected the medium composition factors and growth environment should be investigated (PRAKASHAM et al, 2005; LAKSHMI et al, 2009).

## Conclusion

These work demonstrated the potential application of the peach palm waste as sole substrate for the xylanase enzyme production by solid state fermentation. The potential of industrial application of *T. stromaticum* is due to the fact that it produced significant amounts of xylanase in the culture in conditions and extraction still not optimized.

**Keywords:** biodegradation, xylanase, peach palm waste, filamentous fungi .

## Acknowledgment

The authors thanks the Bahia State Research Foundation (FAPESB), the State University of Santa Cruz (UESC) and the National Council for Scientific and Technological development (CNPq) for providing grants and fellowships as well as financial support.

## References

- AZIN, M., MORAVEJ R.; ZAREH D. Production of xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* on a mixture of wheat bran and wheat straw: Optimization of culture condition by Taguchi method. *Enzyme Microb. Tech.* v. 40, p. 801-805, 2007.
- AGNIHOTRI, S., DUTT D., TYAGI, C.H., KUMAR A., UPADHYAYA J.S. Production and biochemical characterization of a novel cellulase-poor alkali-thermo-tolerant xylanase from *Coprinellus disseminatus* SW-1 NTCC 1165. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 26, p. 1349–1359, 2010.
- BAREKATAIN, M.R., ANTIPATIS, C., CHOCT, M., IJI, P.A. Interaction between protease and xylanase in broiler chicken diets containing sorghum distillers dried grains with soluble animal feed. *Sci. Technol.*, v. 182, p. 71-81, 2013.
- DE SOUZA, J. T.; POMELLA, A. W. V.; BOWERS, J.; PIROVANI, C. P.; LOGUECIO, L. L.; HEBBAR, P. Genetic and Biological Diversity of *Trichoderma stromaticum*, a Mycoparasite of the Cocoa Witches' Broom Pathogen *Phytopathology.*, v. 96, p. 61-67, 2006.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. São Paulo: Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz, IV ed. 1° digital, p.1002, 2008.

CHÁVEZ, R, BULL, P., EYZAGUIRRE, J. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. *J. Biotechnol.*, v. 123, p. 413-433, 2006.

HANKIN, L., ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia* v.67, p.597-607, 1975.

JOSHI C., KHARE S.K. Utilization of deoiled *Jatropha curcas* seed cake for production of xylanase from thermophilic *Scytalidium thermophilum*. *Bioresource Technol.*, v. 102 (2), p. 1722–1726, 2011.

LAKSHMI, G.S., SUBBA RAO, C., SREENIVAS RAO, R. Enhanced production of xylanase by a newly isolated *Aspergillus terreus* under solid state fermentation using palm industrial waste: A statistical optimization. *Biochemical Engineering Journal*, v. 48, p. 51–57, 2009.

LOGUERCIO, L. L., CARVALHO, A. C., NIELLA, G. R.; SOUZA, J. T.; POMELLA, A. W. V. Selection of *Trichoderma stromaticum* isolates for biological control of the witches broom disease in cacao. *Biological Control*, v. 51, p. 130-139, 2009.

MARTÍN-SAMPEDRO, R.; M.E. EUGENIO, J.C. VILLAR. Biobleaching of *Eucalyptus globuleskraft* pulps: comparison between pulps obtained from exploded and non-exploded chips. *Bioresource Technol.*, v. 102 (6), p. 4530–4535, 2011.

MEDDEB-MOUELHI, F., MOISAN, J.K., BEAUREGARD, M.A.. Comparison of plate assay methods for detecting extracellular cellulase and xylanase activity, enzyme and microbial technology. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 66, p.16-19, 2014.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, v. 31, p. 426-428, 1959.

MORAES, J. E. Nutrients and ways of using agro residue of peach-palm feed in the Ribeira Valley. *Res. Technol.*, v. 8 (2), p. 1-5, 2011.

MONFIL, V. O., CASAS-FLORES S. Molecular Mechanisms of in *Trichoderma* spp. and Their Applications in Agriculture Biotechnol. *Biol. of Trichoderma*, v. 32, p. 429–453, 2014.

NAGAR, S., MITTAL. A., E GUPTA, V.K. A cost effective method for screening and isolation of xylan degrading bacteria using agro waste material. *Asian Journal of Biological Sciences*, v. 5 (8), p. 384 – 394, 2012.

OLIVEIRA, D.S, TELIS-ROMERO, J. DA-SILVA, R., FRANCO, C.M.L. Effect of a *Thermoascus aurantiacus* thermostable enzyme cocktail on wheat bread quality. *Food Chem.*, v. 143, p. 139-146, 2014.

PANWAR, D., SRIVASTAVA, P.K., KAPOO, M. Production, extraction and characterization of alkaline xylanase from *Bacillus* sp. PKD-9 with potential for poultry feed. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 3, p. 118-125, 2014.

POLIZELI, M.L.T.M, RIZZATTI, A.C.S, MONTI, R., TERENCEZI, H.F., JORGE, J.A., AMORIM, D.S. Xylanase from fungi: properties and industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.67, p. 577-91, 2005.

PRADEEP G.C., CHOI, Y.H., CHOI, Y.S., SEONG, C.N., CHO, S.S., LEE, H.J., YOO, J.C. A novel thermostable cellulase free xylanase stable in broad range of pH from *Streptomyces* sp. CS428. *Process Biochem.*, v. 48, p. 1188–1196, 2013.



PRAKASHAM, R.S SUBBA RAO, CH. SREENIVAS RAO, R. SARMA, P.N. Alkaline protease production by an isolated *Bacillus circulans* under solid-state fermentation using agroindustrial waste: process parameters optimization, *Biotechnol. Prog.*, v. 21, p. 1380–1388, 2005.

REYES, J., PERALTA-ZAMORA, P., DURÁN, N. Hidrólise enzimática de casca de arroz utilizando-se celulases. Efeito de tratamentos químicos e fotoquímicos. *Química Nova*, v. 21, n. 2, p. 140-143, 1998.

ROBINSON, T., NIGAM, P. Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 197–203, 2003.

ROBL, D., DELABONA, D.S., MERGEL, C.M., ROJAS J.D., COSTA, P.S., PIMENTEL, I.C., VICENTE, V.A., PRADELLA, J.G.C., PADILLA, G. The capability of endophytic fungi for production of hemicellulases and related enzymes. *BMC Biotechnology*. 13 (1), p. 94-106, 2013.

SADAF, A, KHARE, S.K. Production of *Sporotrichum thermophile* xylanase by solid state fermentation utilizing deoiled *Jatropha curcas* seed cake end its application in xylooligosachharide synthesis. *Bioresource Technol.*, v. 153, p. 126-130, 2014.

SANTOS, L.F., HISHII, P.L. Xylanases: Methodologies and kinetic parameters. *J. Biotechnol. Biodivers.*, v. 2, p. 7-15, 2011.

SHAH, A.R., DATTA, M. Xylanase production under solid-state fermentation and its characterization by an isolated strain of *Aspergillus foetidus* in India. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, p. 21, v. 233-243, 2005.

SINGHANIA, R.R., SUKUMARAN, R.K., PATEL, A.K., LARROCHE, C., PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme Microb. Tech.*, v. 46, p. 541-549, 2010.

SOUZA, J.T., BAILEY, B.A., POMELLA, A.W.V, ERBE, E.F, MURPHY, C.A., BAE, H., HEBBAR P.K. Colonization of cacao seedlings by *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of the witches' broom pathogen, and its influence on plant growth and resistance. *Biol. Control.*, v. 46, p. 36-45, 2008.

XIN, F., HE, J. Characterization of a thermostable xylanase from a newly isolated *Kluyveraspecies* and its application for biobutanol production. *Bioresource Technol.*, v. 135, p. 309-315, 2013.



Multidisciplinary

**ANÁLISE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM EXTRATOS  
METANÓLICOS DE FOLHAS DE *Physalis angulata*  
SUBMETIDAS A TRATAMENTO COM NIM**



# I WORKSHOP INTERNACIONAL POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ESPÉCIES VEGETAIS E DE MICROORGANISMOS

ANÁLISE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM EXTRATOS METANÓLICOS DE FOLHAS DE *Physalis angulata* SUBMETIDAS A TRATAMENTO COM NIM.

Pesquisa Institucional desenvolvida na Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) pertencente ao grupo de pesquisa Estudos Químicos e Atividades Biológicas em Produtos Naturais, Projeto de Iniciação Científica.

**Jéssica Lima de Souza**<sup>1</sup>; Dayse Alessandra Almeida Silva<sup>2</sup>; José Luiz Carneiro da Rocha<sup>3</sup>; Lenaldo Muniz de Oliveira<sup>4</sup>; Hugo Neves Brandão<sup>5</sup>, Marilza Neves do Nascimento<sup>6</sup>

1. Aluna do Curso de Graduação em Farmácia, UEFS, bolsista PIBIC/FAPESB, Jessica\_uefs2011@hotmail.com.
2. Aluna do Curso de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, UEFS, bolsista CAPES, dayse.aasilva@hotmail.com.
3. Aluno do Curso de doutorado em Recursos Genéticos Vegetais, UEFS, bolsista FAPESB, luiz\_farmaco@hotmail.com.
4. Professor Doutor do Departamento de Biologia, UEFS, lenaldo.uefs@gmail.com.
5. Professora Doutora Departamento de Biologia - UEFS, marilzaagro@hotmail.com.
6. Professor Doutor do Departamento de Saúde, UEFS, Orientador, hugo@uefs.br.

## Introdução

O uso de produtos naturais pela humanidade, no tratamento de diversas enfermidades, acontece desde os primórdios, pois os saberes populares fazem parte de uma determinada cultura que é transmitida entre gerações (OLIVEIRA; ARAUJO 2007). Estudos mostram que cerca de 80% da população brasileira utiliza produtos naturais, seja para cura ou prevenção (FERNANDES; SOARES *et al*, 2012). Com o intuito de regulamentar a utilização popular dessas plantas surgiu a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que foi aprovada através do decreto presidencial Nº. 5.813, de 22 de junho de 2006, com objetivo de assegurar a população, acesso seguro e racional as plantas medicinais e fitoterápicos, além de criar mecanismo de incentivo a pesquisa de plantas medicinais e manter o conhecimento das comunidades tradicionais e indígenas vivas (BRASIL, 2006).

O Brasil é um país que se destaca pela biodiversidade de espécies vegetais, estimando-se que cerca de 20% das espécies totais do planeta são de posse do território brasileiro (BRASIL, 2006). Dentre essa diversidade, encontra-se a família Solanaceae que apresenta 92 gêneros e cerca de 2300 espécies. O gênero *Physalis*

é um representante dessa família que apresenta importância no ramo econômico, alimentício e terapêutico, sendo seu fruto utilizado na fabricação de polpa e doces. Isso ocorre devido à facilidade de cultivo, bem como boa adaptação climática (MUNIZ; KRETZSCHMAR; RUFATO, 2011). Geralmente, espécies desse gênero crescem como plantas silvestres nas zonas tropicais da América, sendo originária da Amazônia e países Andinos como: Colômbia, Peru e Equador, algumas variedades são cultivadas na América, Europa e Ásia (MUNIZ; KRETZSCHMAR; RUFATO, 2011). A *Physalis angulata* é nativa do Brasil, cresce de forma ereta, ramificada e seu fruto é protegido por uma folha em formato de balão. É conhecida popularmente como: bucho-de-rã, joá-de-capote, camampu, mata-fome, bate-testa e balão-rajado (THOMÉ; OSAKI, 2010).

Com os avanços tecnológicos e aumento do interesse dos pesquisadores em pesquisar sobre a utilização das plantas medicinais, tem crescido a recomendação do uso das mesmas, pelos profissionais da saúde, com fins curativos (ARNOUS *et al*, 2005). Dessa forma, é de fundamental importância estudar os constituintes das plantas para contribuir com desenvolvimento de fármacos, tendo em vista que muitos medicamentos disponíveis no mercado farmacêutico utilizam fármacos sintetizados a partir de compostos naturais bioativos (BRAZ, 2010).

Segundo Tomassoni e colaboradores (2000) o gênero *Physalis* é considerado o mais evoluído da família, devido à presença de metabolitos polioxigenados. Espécies desse gênero destacam-se pela abundante produção de vitaesteróides. Além disso, *Physalis* possui em sua composição metabolitos como: quercetina, rutina, ácido ascórbico, carotenóides e alcalóides. Em estudo realizado por Ariati e colaboradores (2012) foi possível detectar a presença de saponinas, flavonóides, taninos em extratos de *Physalis peruviana* e *Physalis pubescens*.

Os metabolitos secundários desempenham importante papel na atividade biológica das espécies de *Physalis* como: antimicrobiana, antitumoral, imunoduladora, antiinflamatória, tripanossomicida (TOMASSONI; BARBI *et al*, 2000). Entre os metabolitos encontrados nesse gênero destacam-se esteróides ( $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, campesterol, 24-metileno-colesterol), ácidos graxos de cadeia linear, ácido ascórbico, alcalóides, fisalinas e os flavonóides (canferol, rutina e quercetina). Esses últimos apresentam-se de forma abundante nos vegetais, além de representarem um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados, possuindo ampla distribuição no reino vegetal (SUANAZZI, 2000). Os flavonóides desempenham funções importantes nas plantas, protegendo contra microrganismos, herbívoros, e também influenciando no crescimento do vegetal (NEGAI, 2012).

Nesse contexto Fumagali e colaboradores (2008) afirma que esses metabolitos secundários são produzidos pelas plantas e atualmente também podem ser denominadas como princípios ativos, proporcionando poder medicinal às estas plantas. Bezerra (2008) também afirma que o metabolismo primário é essencial para o desenvolvimento do vegetal, diferente do metabolito secundário que está ligado à sobrevivência do vegetal e perpetuação de sua espécie no ecossistema. Além disso, esses metabolitos são produzidos de forma ampla e diversificados em cada espécie vegetal (BEZERRA, 2008). Sabe-se que os metabolitos secundários são produzidos pelas plantas, quando as mesmas são expostas a estresse (SUANAZZI, 2000). Gobbo e Lopes (2007) descrevem que diversos fatores podem alterar a taxa de

produção dos metabólitos secundários, os autores ainda afirmam que fatores mecânicos aos quais as plantas estão susceptíveis, tais como ferimentos podem elevar a taxa de produção dessas substâncias protetoras.

Ferreira e colaboradores (1997) define o termo radical livre como uma molécula altamente reativa, que possui elétrons desemparelhados em sua camada de valência. Os mesmos são reativos e instáveis, por isso participam de reações com substâncias químicas orgânicas e inorgânicas, proteínas, lipídeos, carboidratos, particularmente moléculas importantes nas membranas celulares e ácidos nucleicos. Esse evento relaciona-se ao estresse oxidativo que resultam em lesões teciduais (SCHNEIDER et al, 2004). Na atualidade estudos mostram o papel dos radicais livres e outros oxidantes como responsáveis pelo envelhecimento, pelas doenças autoimunes e doenças infecciosas e/ou inflamatórias e pelas doenças degenerativas, como câncer, doenças cardiovasculares, hepatopatias, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Os flavonoides são substâncias químicas que se apresentam de forma abundante nos vegetais, além disso, representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados, possuindo ampla distribuição no reino vegetal (SUANAZZI, 2000). Estudos mostram que os flavonoides possuem estrutura favorável no que diz respeito ao sequestro de radicais livres. Essas espécies reativas estão relacionadas a diversas patologias neurodegenerativas (FERREIRA et al., 1997) e para combater o estresse oxidativo, são utilizados agentes antioxidantes que atuam inibindo os radicais livres, além de complexar metais ( OLIVEIRA et al, 2009). Nesse contexto pode-se destacar a importância de pesquisas voltadas para substâncias de origem vegetal com propriedades antioxidantes, principalmente compostos fenólicos, pois investigações tem comprovado sua atividade antioxidante em espécies do gênero *Physalis* (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Um grande problema na pesquisa de plantas medicinais cultivadas é a contaminação por insetos e pragas. Segundo Muniz (2011) Os principais insetos identificados no cultivo de *Physalis* são, na sua maioria, os que atingem também a cultura do tomate. As pragas que atingem a *Physalis* com frequência são: a broca pequena, mosca branca e ácaros. Outra opção interessante para combater essas pragas é a pulverização de uma solução de Óleo de Nim, que proporciona excelente resultado, afastando insetos que prejudicam a *Physalis*.

Segundo Neves e colaboradores (2003) o uso indiscriminado de fertilizantes e de agrotóxicos desencadeiam problemas, pois contaminam o solo e os recursos hídricos como os aquíferos, lagos e rios, além de causarem danos à população. As práticas agrícolas são dependentes da descoberta e uso de controles químicos de insetos e pragas. Isso remete a contaminação do meio ambiente de forma crescente aumentando devido ao constante uso na tentativa de erradicação de várias pragas e proteção de colheitas agrícolas. Nesse sentido novas pesquisas estão sendo desenvolvidas com objetivo de desenvolver novos produtos pesticidas com base em produtos naturais, além disso, os registros de novos inseticidas sintéticos têm se tornado mais restritos e rigorosos.

Forim e outros (2010) afirmam que o Nim, *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae), planta de origem indiana, é uma fonte promissora de inseticidas orgânicos. Pois

apresenta relativa seletividade a insetos considerados pragas agrícolas. Dessa forma seus produtos vêm sendo recomendados por diversos programas de manejo integrado de controle de pragas ao redor do mundo (FORIM *et al.*, 2010). Os extratos de Nim atua provocando distorções na metamorfose, inibe o crescimento, malformação, redução da fertilidade e morte, principalmente de certos artrópodes que ingerem ou entram em contato com substratos tratados. Sua principal vantagem relaciona-se a largo espectro de ação, além disso, é compatível com outras formas de manejo, não apresenta ação fitotóxica, é praticamente atóxica ao homem e não agride o meio ambiente (Neves *et al.*, 2003).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antioxidante em extratos metanólicos de folhas de *Physalis angulata* que foram submetidas a tratamentos com Nim 0,5% e 1%. Além disso, buscou-se averiguar possíveis variações da atividades mencionadas, comparando-as através do controle.

## **Metodologia**

Os materiais vegetais utilizados foram submetidos a tratamentos com Nim (*A. indica*) em concentrações de 0,5% e 1%, também foi utilizado o material controle, o qual durante seu cultivo não foi aplicado o inseticida natural. As folhas foram submetidas à secagem em estufa a 60 °C, posteriormente foram pulverizadas. Para obtenção dos extratos, foi utilizada proporção metanol/água (80:20) através de refluxo por 40 minutos.

## **Avaliação da atividade antioxidante**

Para avaliação da atividade antioxidante foi empregada à metodologia de sequestro de radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) proposta por Malterud (1993). Inicialmente foi preparada uma solução de DPPH· concentrada, utilizando 45 mg de DPPH e 100mL de álcool metílico. Foi usada alíquota de 10 mL do concentrado para o preparo de uma nova solução de 45 µg/mL, posteriormente as soluções foram armazenadas sob refrigeração e ao abrigo da luz.

Para determinação da concentração efetiva para 50% dos radicais livres DPPH· (CE<sub>50</sub>) foram utilizadas concentrações no intervalo de 16 mg/mL à 1 mg/mL para os extratos metanólicos (folha 1%, folha 0,5% e folha controle). O padrão propilgalato foi utilizado como controle positivo da reação em concentração de 5mg/mL.

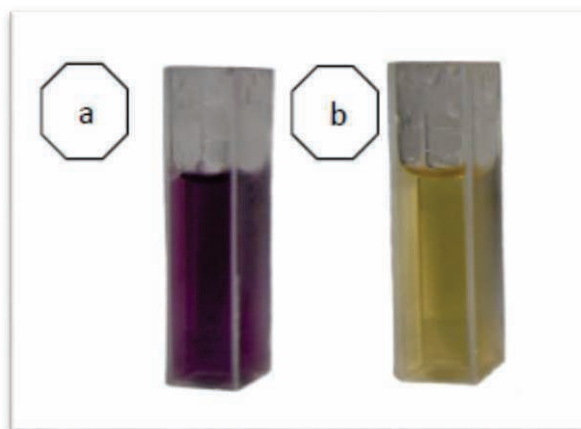
Alíquota de 50 µL das amostras foram adicionadas a 3 mL de DPPH, o mesmo procedimento foi realizado com o padrão. A análise da reação foi feita com auxílio de espectrofotômetro, sendo a leitura realizada em comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 517nm. A primeira leitura foi feita com a cubeta contendo somente a solução do DPPH·, sendo a segunda leitura realizada após 15 minutos de reação. Todos os testes foram realizados em triplicata em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Com auxílio do programa Microsoft Excel foram traçados os gráficos, correlacionando as concentrações das amostras versus os valores das médias de % de DPPH· sequestrado.



## Resultados e discussão

O teste de atividade antioxidante fotocolorimétrico de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) consiste na absorção do radical DPPH $\cdot$  na faixa de absorvância de 517 nm em espectrofotômetro. Sendo assim, é necessário o monitoramento da absorvância inicial e final, pois ao adicionar a amostra em solução de DPPH $\cdot$  (Cor Roxa - Figura 1a) ocorre mudança de coloração (amarelo) levando a redução da absorvância indicando a transferência do elétron do radical hidrogênio. A partir desse parâmetro pode-se avaliar o potencial da amostra em sequestrar o radical livre. Os resultados expressos em EC<sub>50</sub> determinam quantidade de antioxidantes necessária para diminuir em 50% a concentração inicial de DPPH da solução. Quanto menor o valor do EC<sub>50</sub> melhor será atividade do extrato em sequestrar os radicais livres, em contrapartida se o EC<sub>50</sub> encontrado for elevado, menor será sua atividade antioxidante (ANTOLOVICH et al 2002; LIMA et al, 2008; COSTA et al, 2010).

**Figura 1-** Cubeta com DPPH $\cdot$  (a) e cubeta com DPPH $\cdot$  e amostra após 15 minutos (b).



Fonte: AUTORA, 2105

As amostras submetidas à avaliação antioxidante pelo método de DPPH em concentração de 15mg/mL mostraram sequestro de radicais livres acima de 90%, os resultados obtidos foram: 98% para folha controle, 95% de sequestro de radicais para o extrato da folha com tratamento de 0,5% de Nim e 92% para folha com tratamento de 1% de Nim. Os resultados foram obtidos através dos cálculos das absorvâncias, posteriormente foram traçados os gráficos e realizadas as regressões lineares para obtenção da concentração efetiva (CE<sub>50</sub>) de cada amostra analisada. A folha controle apresentou CE<sub>50</sub> de 7,5 mg/mL, já a folha 0,5% CE<sub>50</sub> de 7,1 mg/mL e a folha 1% apresentou CE<sub>50</sub> de 7,7 mg/mL.

Estudos desenvolvidos por Lima e colaboradores (2012) mostram que frutos de *Physalis peruviana* apresentam atividade antioxidante significativa no início de sua maturação. Além disso, Frankel (1993) afirma que diversos fatores podem influenciar na atividade antioxidante dos vegetais como: fatores genéticos, condições ambientais, além do grau de maturação, variedade da planta pelo solvente e a técnica de extração empregada.

Santos e colaboradores (2003) descrevem que substâncias fenólicas são potentes antioxidantes, pois suas estruturas apresentam esqueleto carbônico que favorecem a estabilização de radicais livres. Estudos mostram que espécies reativas denominadas de radicais livres são formadas durante os processos metabólicos ou são provenientes de fontes exógenas. Essas substâncias reativas são responsáveis por diversas patologias como: Parkinson, acidente vascular cerebral, doença de Alzheimer, esclerose múltipla, catarata e câncer (FERREIRA *et al.*, 1997). Cerqueira e colaboradores (2007) relatam que administração de antioxidantes em grupos que apresentem deficiência plasmáticas inadequadas destes micronutrientes, são eficazes na prevenção de doenças crônicas relacionadas ao estresse oxidativo. O autor também descreve que o uso de antioxidantes está associado a um envelhecimento saudável e à longevidade funcional.

## **Conclusão**

O presente estudo permitiu avaliar a influência do uso de inseticida natural (Nim) no cultivo em *Physalis angulata*, pois se sabe que diversos fatores influenciam na produção de tais substâncias. Além disso, foi possível estimar a concentração de extrato capaz de sequestrar 50% dos radicais livres. Com base nos resultados encontrados foi possível observar as propriedades antioxidantes dessa espécie.

Nesse contexto percebe-se a importância de estudos com extratos de *Physalis* com objetivo de verificar se substâncias presentes nos mesmos podem contribuir com sua ação antioxidante atuando em doenças que se relacionam com os processos oxidativos e formação de radicais livres.

Ao analisar a influência do Nim no potencial de sequestro de radicais das folhas de *Physalis* pode-se perceber que não houve variação significativa entre as amostras. Sendo assim, outros testes devem ser realizados com objetivo de analisar a interferência de produção dos metabolitos secundários nesse gênero ao aplicar o inseticida natural no processo do cultivo.

**Palavras-chave:** Nim; DPPH; *Physalis*; Plantas medicinais; Antioxidante

**Agradecimentos:** À CAPES, ao CNPq e à FAPESB pelo apoio financeiro.

## **Referências**

ALVES, C. Q. *et al.* Avaliação da atividade antioxidante de flavonoides. **Revista da Rede de Ensino FTC**, ano 5, p. 1-8, 2007.

ANTOLOVICH, M., et al. Methods for testing antioxidant activity. **J. Royal Soc. Chem.** v. 127, p. 183-198, 2002.

ARIATI, A. C. OLIVEIRA.M.C. Compostos do metabolismo secundário presentes em *Physalis* spp. L. (Solanaceae). In: Seminário de iniciação científica e tecnologia da Universidade Tecnologia Federal Paraná. **Resumo**, 2010.

BRAZ FILHO,R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química. Nova**, v. 33, p. 229-239, 2010.

BRASIL. Decreto nº. 5.813, de 22 de junho de 2006. Dispõe da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, Brasília, DF.

CERQUEIRA, F. M. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas **Química Nova**, v. 30, 441-449, 2007

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, p. 99-105, 1998.

COSTA, L. M; MOURA N. F; MARANGONI, C; MENDES, C. E; TEIXEIRA A. O. Atividade antioxidante de pimentas do gênero *Capsicum*. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, 2010.

FERREIRA,A.L.A; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**, v. 43, p. 61-8, 1997.

FERNANDES-PEDROSA, M .F; SOARES,L .A .L; CARVALHO,M. C.R. Identificação Botânica e Química de Espécies Vegetais de Uso Popular no Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. v. 14, p. 548-555, 2012.

FORIM, M. R. Uso de CLAE no controle de qualidade em produtos comerciais de nim: reprodutibilidade da ação inseticida. Moacir Rossi, **Química. Nova**, v. 33, n. 5,p. 1082-1087, 2010.

GOBBO-NETO,L.;LOPES,N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374-381. 2007.

ISMAIL,N; ALAM,M. A novel cytotox flavonóideglycoside from *Physalis angulata*. **Fitoterapia**. v. 72, n 6, 2001

LIMA, A. Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos presentes no Pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). Tese (Doutorado)- Faculdade de Ciência Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. São Paulo 182p, 2008.

MALTERUD, K. E. *et al.* Antioxidant and radical scavenging effects of anthraquinones and anthrones. **Pharmacology**, v. 47, p. 77-85. 1993.

MUNIZ, J; KRETZSCHMAR, A. A; RUFATO, L. Sistemas de condução para o cultivo de *Physalis* no Planalto Catarinense. **Revista. Brasileira. Fruticultura**. v. 33, n. 3, p. 830-838, 2011.

NEGAI, A. efeito induzido pelo vírus Y da batata (potato virus y) no metabolismo secundário do camapu ( *Physalis angulata L*) São Paulo. Dissertação, universidade de são Paulo, 2012.

NEVES, B. P. Cultivo e Utilização do Nim Indiano. **EMBRAPA**, 2003.

OLIVEIRA, C.J; ARAUJO,T.L. Plantas medicinais: usos e crenças de idosos portadores de hipertensão arterial. **Revista Eletronica de Enfermagem**. v. 09, n. 01, p. 93 - 105, 2007. Disponível em: <<http://www.fen.ufg.br/revista/v9/n1/v9n1a07.htm>>. Acesso em: 16 dez. 2015.

OLIVEIRA, A. C;VALENTIM, I.B; GOULAR, M.O.F.TREVISAN, M.T.S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Quimica Nova**, v. 32, p. 689-702, 2009.

PEREIRA, R.J; CARDOSO, M.G. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits,**Journal of Biotechnology and Biodiversity**. V. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

POTHITIRAT, W. *et al.* Comparison of bioactive compounds content, free radical scavenging and anti-acne inducing bacteria activities of extracts from the mangosteen fruit rind at two stages of maturity. **Fitoterapia**, v. 80, p. 442–447, 2009.

RIBANI,M.; JARDIM,I.C.S.F.; MELO,L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quimica Nova**. v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004

SANTOS, L. C; PIACENTE, S; MONTORO, P; PIZZA, C; VILEGAS, W. Atividade antioxidante de xantonas isoladas de espécies de *Leiothrix* (Eriocaulaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 67-74, 2003.

SUANAZZI,J. A. S. **Farmacognosia da planta ao medicamento** 2. ed. Rev Porto Alegre: Florianópolis: Ed. da UFRGS, Ed. da UFSC, 2000

TOMASSINI,T.C. B.;BARBI,N. S.; RIBEIRO,I.M. Gênero *Physalis* - uma revisão sobre vitaesteróides. **Química. Nova**. v. 23, n 01, 2000.

THOMÉ, M; OSAKI, F.; Adubação de nitrogênio, fósforo e potássio no rendimento de *Physalis* spp. **Revista Acadêmica Ciências Agrária Ambiental** . v. 8, n. 1, p. 11-18, 2010.

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DAS  
FRAÇÕES CLOROFÓRMICA E HIDROMETANÓLICA DO  
EXTRATO DA RAIZ DE *Cereus jamacaru* DC. (Cactaceae)**

# ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DAS FRAÇÕES CLOROFÓRMICA E HIDROMETANÓLICA DO EXTRATO DA RAIZ DE *Cereus jamacaru* DC. (Cactaceae)

**Amanda Ferreira Santana**<sup>1</sup>; Angélica Maria Lucchese<sup>2</sup>; Marilene Lopes da Rocha<sup>3</sup>; Horácio Freitas Bomfim<sup>4</sup>

1. Mestranda em Recursos Genéticos Vegetais pela Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS. [afs.27@hotmail.com](mailto:afs.27@hotmail.com)

2. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>./Orientadora DEXA – UEFS.

3. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>./Coorientadora DCBIO – UEFS.

4. Graduando em Farmácia - UEFS.

## 1. INTRODUÇÃO

A Caatinga é um dos biomas mais ricos do estado da Bahia, apresentando elevada diversidade de espécies e altos índices de endemismo (SAMPAIO *et al.*, 2002). A família Cactaceae conta com 124 gêneros e aproximadamente 1.440 espécies (HUNT *et al.*, 2006). As cactáceas apresentam grande potencial como fonte de substâncias de uso medicinal, cosmético e alimentício (BIAVATTI *et al.*, 2007).

*Cereus jamacaru* DC. popularmente conhecido como mandacaru, é um cacto colunar característico da região semiárida do Brasil (BRAUN *et al.*, 2013). Na Bahia, o estudo mais recente citando o uso de cactáceas na medicina popular registrou a utilização de chás das raízes de *Cereus jamacaru* para tratar infecções urinárias (ANDRADE, 2008). No Brasil existe atualmente um medicamento fitoterápico composto registrado na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) com a espécie *Cereus jamacaru*, sendo utilizado para o tratamento do climatério e outros cinco medicamentos a partir de outras espécies do gênero (*C. grandiflorus*, *C. hildemarianus* e *C. peruvianus*) (BRASIL, 2013).

É notável o grande desenvolvimento do uso de plantas medicinais em várias áreas, tanto como medicamentos fitoterápicos e fonte de fármacos (ALVES, 2010). Muitos são os trabalhos publicados no mundo sobre estudo farmacológico de plantas buscando atividade antinociceptiva. O termo nocicepção está relacionado com o reconhecimento de sinais dolorosos pelo sistema nervoso, que formulam informações relacionadas à lesão (KLAUMANN *et al.*, 2008).



Embora o número de pesquisas sobre plantas com atividades anti-inflamatórias tenha crescido ao longo dos anos, somente em 2005 foi desenvolvido o primeiro anti-inflamatório fitoterápico brasileiro, conhecido como Acheflan®, a partir do óleo essencial de *Cordia verbenacea*, eficaz no tratamento de contusões, tendinite e reumatismos (MICHIELIN, 2009). A inflamação é uma resposta não específica da microcirculação do tecido lesionado provocado por estímulos biológicos, físicos, químicos ou pela combinação destes (NATHAN, 2002).

Resultados ainda não publicados, de trabalhos em andamento do nosso grupo de pesquisa (Grupo de Pesquisa em Química de Produtos Naturais e Bioativos / Farmacologia de Produtos Naturais), indicaram que os extratos brutos metanólicos da raiz da espécie *Cereus jamacaru* apresentaram ação antinociceptiva, anti-inflamatória e antimicrobiana. Levando-se em consideração que são escassos os trabalhos científicos sobre o uso medicinal de espécies da família Cactaceae, justifica-se a importância de avaliar a atividade biológica das frações clorofórmica e hidrometanólica oriundas do extrato bruto de *C. jamacaru*, averiguando as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória através dos testes da formalina e edema de pata induzido pela carragenina.

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1 COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO**

A coleta do material botânico foi realizada na zona rural do município de Feira de Santana (12°12'32,9"S e 38°55'59"W) em abril de 2014. Esta espécie foi previamente identificada conforme exsicata depositada no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana.

### **2.2 OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DO EXTRATO BRUTO**

As raízes da espécie selecionada foram colocadas para secar à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, sendo posteriormente pulverizado em moinhos de facas. O material pulverizado foi submetido à extração, três vezes consecutivas, por maceração com metanol em recipientes de vidro. Os extratos brutos foram

concentrados em evaporador rotatório e o resíduo de solvente foi retirado por evaporação em capela de exaustão.

## **2.3 FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO**

O extrato metanólico da raiz de *C. jamacaru* foi fracionado por partição líquido-líquido para obtenção das frações. 20g do extrato metanólico bruto foi ressuspenso em metanol:água (7:3) e extraído com clorofórmio para obtenção da fração clorofórmica (FC) e fração hidrometanólica (FHM), visando uma semi-purificação das substâncias através de suas polaridades.

## **3. ENSAIOS BIOLÓGICOS**

### **3.1 ANIMAIS UTILIZADOS**

Os testes biológicos foram realizados no Laboratório de Farmacologia localizado no Biotério Central da UEFS, que forneceu os camundongos machos adultos (25 a 30g) utilizados como cobaias. A sala foi mantida a uma temperatura de 20 a 22° C e com ciclos de 12 h claro / 12 h escuro, de acordo com os padrões recomendados para roedores (GHIRALDINI, 1995; MERUSSE; LAPICHICK, 1996). As gaiolas com os animais foram transferidas para a sala de experimentação, onde foram realizados todos os experimentos, com pelo menos uma hora de antecedência à execução dos mesmos, a fim de promover uma adaptação do animal ao novo ambiente e evitar possíveis alterações fisiológicas e comportamentais decorrentes do estresse causado pela remoção e manuseio dos animais.

Todos os procedimentos experimentais foram analisados e previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA/UEFS, protocolo n° 003/2014.

### **3.2 TESTE DA FORMALINA**

Para este teste foi utilizado cinco grupos com oito camundongos cada. Os animais receberam o tratamento com três doses das frações clorofórmica e hidrometanólica do extrato da raiz de *Cereus jamacaru* (75, 150 ou 300 mg/Kg,

via oral), um grupo controle recebeu o veículo e outro grupo foi tratado com morfina (10mg/Kg), que funcionou como padrão. Decorridos 60 minutos, os camundongos receberam 20µL de formalina (2,5% formaldeído em solução salina) a qual foi injetada na região subplantar da pata posterior esquerda. Depois da injeção de formalina, os animais foram colocados em caixas individuais de observação e o tempo gasto, em segundos, na lambida da pata injetada foi considerado indicativo de nocicepção. A primeira fase da resposta nociceptiva normalmente ocorre entre 0-5 minutos e a segunda ocorre de 15-30 minutos após a injeção de formalina (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

### **3.3 TESTE DO EDEMA DA PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA**

Para realização do teste do edema de pata induzido pela carragenina foi utilizado cinco grupos com oito camundongos. Os animais receberam os tratamentos com as frações clorofórmica e hidrometanólica do extrato da raiz de *Cereus jamacaru* (75, 150 ou 300mg/Kg) veículo (v.o.), e o outro grupo dos animais foram tratados com indometacina (10 mg/kg). Após 60 minutos os animais receberam 50 µL de carragenina (2,5% diluída em solução salina) a qual foi injetada na região subplantar da pata posterior esquerda, e igual volume de solução salina (NaCl a 0,9%) na pata posterior direita (NSONDE NTANDOU *et al.*, 2010). Em seguida o volume das patas foi medido imediatamente e 60, 120, 180 e 240 minutos após a administração de carragenina e solução salina na região subplantar usando um pletismômetro. O edema foi considerado pela diferença do volume entre a pata tratada com carragenina e a que recebeu a solução salina.

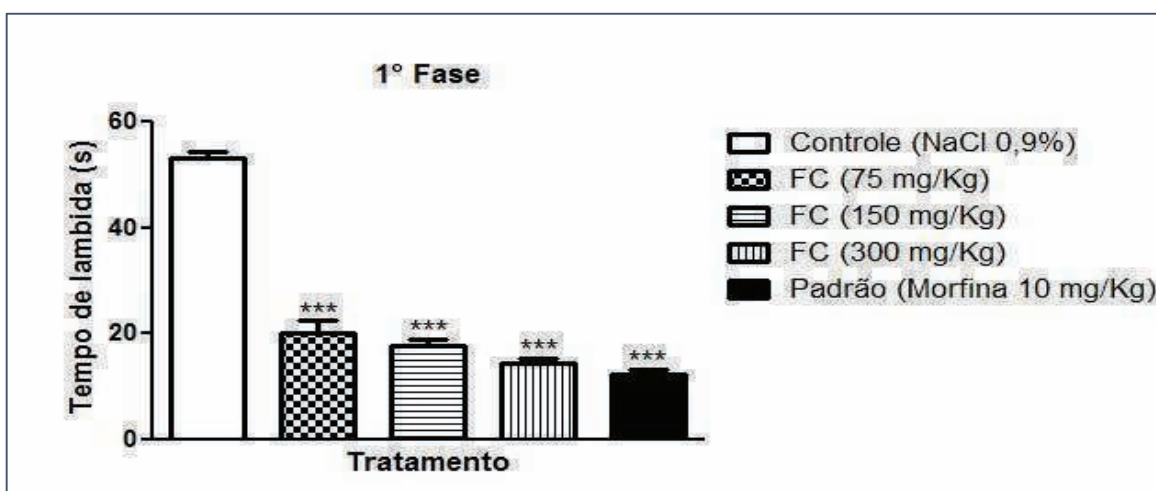
### **4.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS TESTES BIOLÓGICOS**

Os dados obtidos nos experimentos foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M) e analisados pelo teste ANOVA (análise de variância) de uma via seguida do teste Dunnett, quando necessário, mediante a utilização do programa estatístico *Graph Pad Prism*, versão 6.0. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$  (WINER *et al.*, 1991).

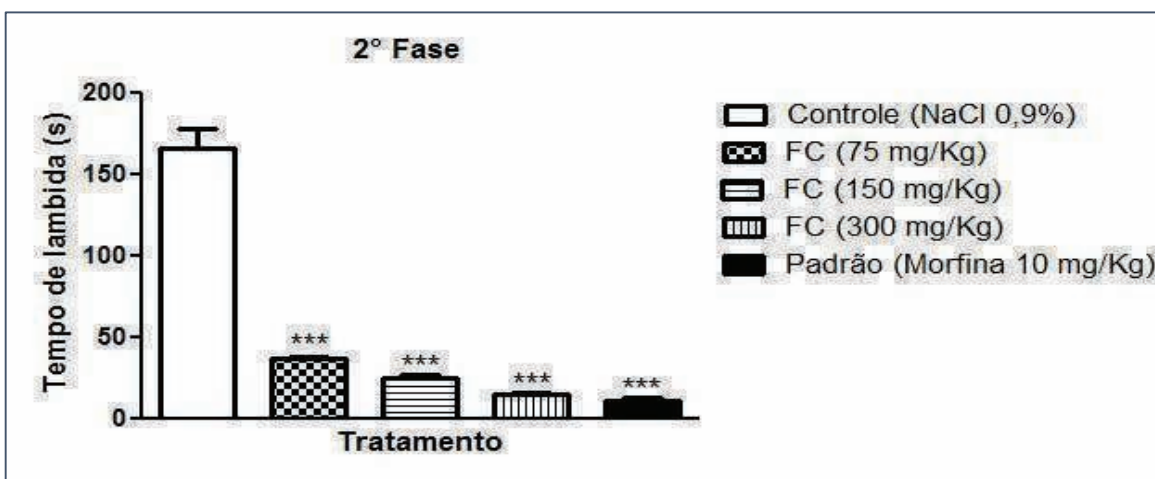
## 5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 TESTE DA FORMALINA

Esse teste é um método comportamental para estudo de nocicepção química em animais que mede a resposta a um estímulo nociceptivo de longa duração, portanto, se aproxima mais da dor clínica que outros métodos que medem a resposta apenas à um breve estímulo nocivo (DENNIS; MELZACK, 1980). A FC nas doses de 75, 150 ou 300 mg/kg reduziu de forma significativa o tempo de lambidas e mordidas na pata tanto na fase 1 (neurogênica) (Figura 1A) com valores de  $20,13 \pm 2,40$ ;  $17,63 \pm 1,35$ ;  $14,38 \pm 0,90$ , respectivamente, quanto na fase 2 (inflamatória) (Figura 1B) com valores de  $33,13 \pm 1,49$ ;  $25,38 \pm 1,83$ ;  $15,63 \pm 1,02$ , respectivamente, quando comparadas ao grupo controle (fase 1:  $53,25 \pm 1,11$  e fase 2:  $166,1 \pm 12,37$ ). Essa redução foi similar ao padrão (indometacina) fase 1:  $12,25 \pm 1,01$  e fase 2:  $11,63 \pm 1,38$ .

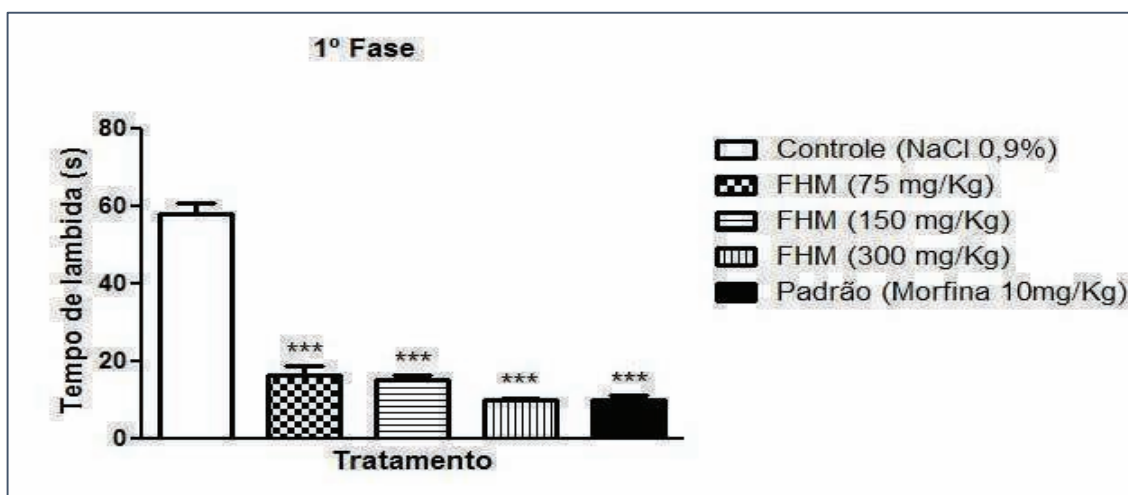


**Figura 1A.** Efeito da FC (fração clorofórmica) (75, 150 e 300mg/kg) na primeira fase do teste da formalina em camundongos. Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m.(n=8). \*\*\*p<0,001 vs controle (ANOVA – seguido de Dunnet).

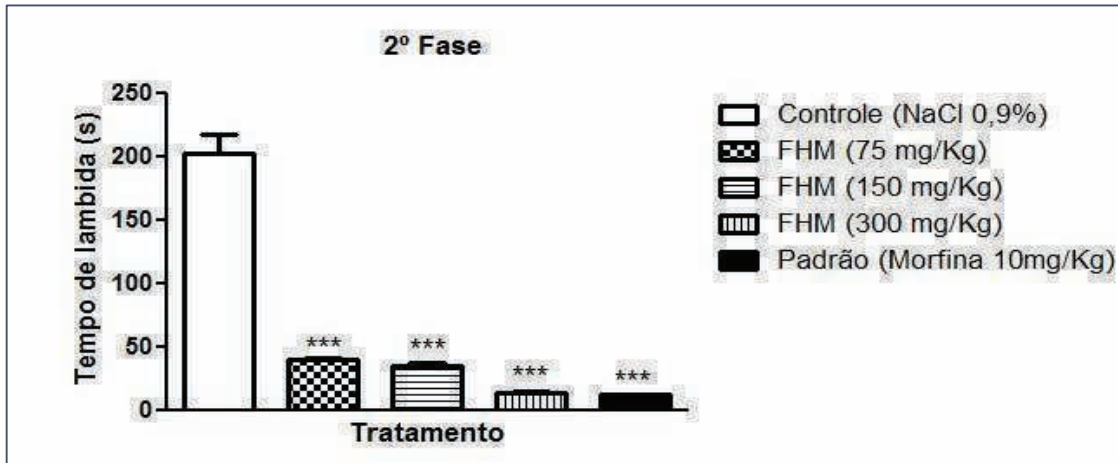


**Figura 1B.** Efeito da FC (fração clorofórmica) (75,150 e 300mg/kg) na segunda fase do teste da formalina em camundongos. Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m.(n=8). \*\*\*p<0,001 vs controle ( ANOVA – seguido de Dunnet).

Como ilustrado na figura 2A, os camundongos administrados com a FHM nas doses de 75, 150 e 300mg/kg apresentaram redução bastante significativa no tempo de lambidas e mordidas na pata na fase 1 com valores de  $16,63 \pm 2,28$ ;  $15,25 \pm 1,37$ ;  $10,00 \pm 0,65$ , respectivamente, quando comparados ao grupo controle (fase 1:  $58,25 \pm 2,53$ ). Na fase 2 (figura 2B), os valores foram de  $39,63 \pm 2,07$ ;  $35,50 \pm 1,82$ ;  $14,25 \pm 0,73$ , respectivamente, quando comparadas ao grupo controle (fase 2:  $203,00 \pm 15,20$ ). Redução similar ao padrão (indometacina) em ambas as fases (fase 1:  $10,13 \pm 1,00$  e fase 2:  $12,13 \pm 0,99$ ).



**Figura 2A.** Efeito da FHM (fração hidrometanólica) (75,150 e 300mg/kg) na primeira fase do teste da formalina em camundongos. Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m.(n=8). \*\*\*p<0,001 vs controle (ANOVA – seguido de Dunnet).



**Figura 2B.** Efeito da FHM (fração hidrometanólica) (75,150 e 300mg/kg) na segunda fase do teste da formalina em camundongos. Valores expressos como média ± e.p.m.(n=8). \*\*\*p<0,001 vs controle (ANOVA – seguido de Dunnet).

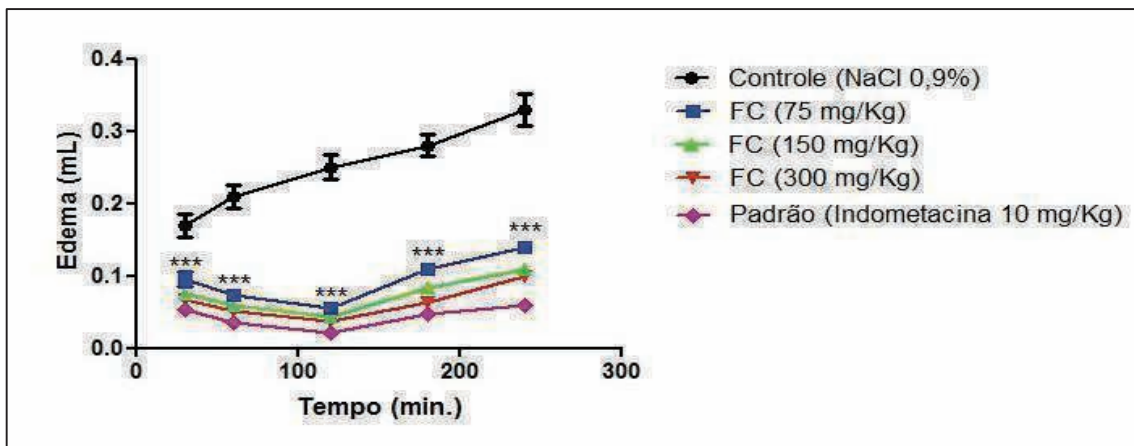
## 5.2 TESTE DO EDEMA DE PATA EM CAMUNDONGOS INDUZIDO POR CARRAGENINA

A FC nas doses de 75, 150 e 300 mg/Kg reduziu significativamente o edema das patas nos tempos de observação de 30, 60, 120, 180 e 240 minutos, com valores de: (75mg/kg, T<sub>30</sub>: 0,095±0,0094; T<sub>60</sub>: 0,073±0,0070; T<sub>120</sub>: 0,056±0,0038; T<sub>180</sub>: 0,11±0,0031 e T<sub>240</sub>: 0,14±0,0037); (150mg/kg, T<sub>30</sub>: 0,076±0,0071; T<sub>60</sub>: 0,06±0,0038; T<sub>120</sub>: 0,043±0,0031; T<sub>180</sub>: 0,084±0,0032 e T<sub>240</sub>: 0,11±0,0030); (300 mg/kg, T<sub>30</sub>: 0,068±0,0053; T<sub>60</sub>: 0,051±0,0048; T<sub>120</sub>: 0,038±0,0025; T<sub>180</sub>: 0,063±0,0031 e T<sub>240</sub>: 0,10±0,0026) em relação ao controle (T<sub>30</sub>: 0,17±0,016; T<sub>60</sub>: 0,21±0,016; T<sub>120</sub>: 0,25±0,017; T<sub>180</sub>: 0,28±0,015 e T<sub>240</sub>: 0,33±0,022) (Figura 3A). A FHM também reduziu significativamente o edema das patas dos camundongos em todos os tempos de observação (75mg/kg, T<sub>30</sub>: 0,074±0,0063; T<sub>60</sub>: 0,05±0,0042; T<sub>120</sub>: 0,025±0,0027; T<sub>180</sub>: 0,07±0,0057 e T<sub>240</sub>: 0,081±0,0052); (150mg/kg, T<sub>30</sub>: 0,07±0,0071; T<sub>60</sub>: 0,055±0,0057; T<sub>120</sub>: 0,03±0,0060; T<sub>180</sub>: 0,065±0,0071 e T<sub>240</sub>: 0,08±0,0042); (300 mg/kg, T<sub>30</sub>: 0,066±0,0053; T<sub>60</sub>: 0,043±0,0053; T<sub>120</sub>: 0,023±0,0031; T<sub>180</sub>: 0,054±0,0042 e T<sub>240</sub>: 0,081±0,0030) após a administração da carragenina quando comparados ao grupo controle (T<sub>30</sub>: 0,17±0,016; T<sub>60</sub>: 0,21±0,016; T<sub>120</sub>: 0,25±0,017; T<sub>180</sub>: 0,28±0,015 e T<sub>240</sub>: 0,33±0,022) (Figura 3B). O grupo tratado com o padrão (indometacina) apresentou os seguintes resultados: (T<sub>30</sub>: 0,053±0,0053; T<sub>60</sub>:

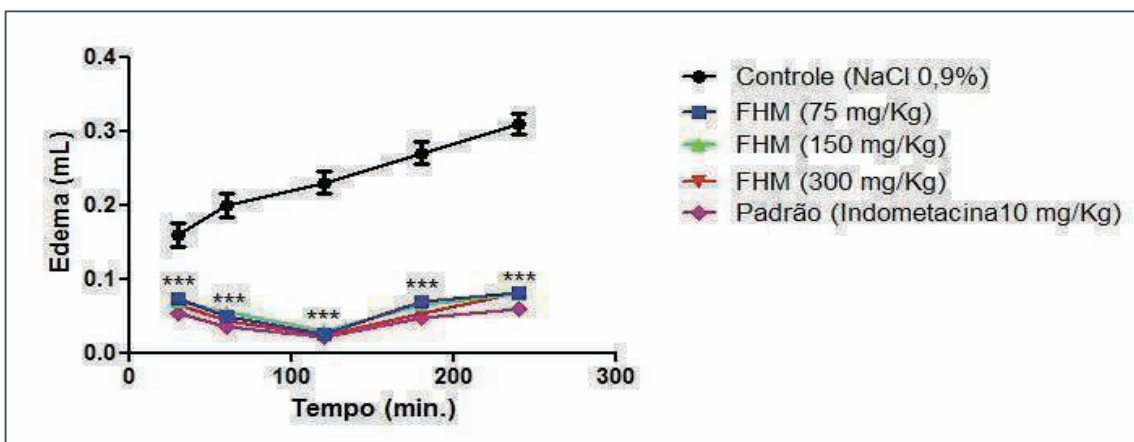


0,035±0,0050; T<sub>120</sub>: 0,021±0,0044; T<sub>180</sub>: 0,048±0,0045 e T<sub>240</sub>: 0,06±0,0042). Ambas as frações apresentaram resultados semelhantes ao padrão.

Este teste é um modelo de nocicepção térmica. O efeito anti-inflamatório apontado pelo teste da formalina foi confirmado, avaliando as propriedades anti-edematogênica das FC e FHM no modelo do edema de pata induzido por carragenina. Este modelo tem sido amplamente utilizado para avaliar o efeito de agentes anti-inflamatórios não esteroidais (ARA *et al.*, 2010). O desenvolvimento do edema provocado pela carragenina é um processo que envolve três fases. À fase inicial (os primeiros 90 min) é atribuída à liberação de histamina e serotonina; a segunda fase (90-150 min) é mediada por cinina e a última fase (após 180 min) é mediada por prostaglandinas (DI ROSA *et al.*, 1971).



**Figura 3A:** Efeito da FC (fração clorofórmica) (75,150 e 300mg/kg) sobre o edema de pata induzido por carragenina em camundongos. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao controle. \*\*\*p< 0,001.(ANOVA two-way-Tukey).



**Figura 3B:** Efeito da FHM (fração hidrometanólica) (75,150 e 300mg/kg) sobre o edema de pata induzido por carragenina em camundongos. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao controle. \*\*\*p< 0,001.(ANOVA two-way-Tukey).

## 6. CONCLUSÃO

A presente pesquisa evidenciou que as frações clorofórmica e hidrometanólica oriundas da raiz de *C. jamacaru* apresentam propriedades antinociceptivas e anti-inflamatórias.

Os agentes ativos responsáveis pelos efeitos observados estão sendo investigados para complementar os estudos descritos acima.

**Palavras-chave:** *Cereus jamacaru*; Planta Medicinal; Substâncias Bioativas; Antinociceptivo; Anti-inflamatória.

### Agradecimentos:

À Instituição Universidade Estadual de Feira de Santana, e a CAPES.

## 7. REFERÊNCIAS

- ALVES, L. F. **Plantas Medicinais e Fitoquímicas no Brasil: Uma Visão Histórica**. Janeiro: UFRJ/IQ, 2010.
- ANDRADE, C. T. da S. **Cactos úteis na Bahia: ênfase no semiárido**. Pelotas: Ed. USEB. 2008.
- ARA, A. et al. Anti-inflammatory activity of *Adenanthera pavonina* L., Fabaceae, in experimental animals, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20(6), p.929-932, 2010.
- BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consulta a banco de dados**. Disponível em: < [http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/ConsultaProduto/comconsulta\\_medicamento.asp](http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/ConsultaProduto/comconsulta_medicamento.asp)>. Acesso em: 26/09/2013.
- BIAVATTI, M.; MARENSI, V.; LEITE S. N.; REIS, A. Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest. *Rev Bras Farmacogn*, v.17, 2007.
- BRAUN, P.; MACHADO, M.; TAYLOR, N. P. *Cereus jamacaru*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. 2013. Acesso em: 22 de novembro de 2013.
- DENNIS, S.G. and MELZACK, R., Pain modulation by 5-hydroxytryptaminergic agents and morphine as measured by 3 pain tests, **Experimental Neurology**, v.69, p.260-270, 1980a.
- DI ROSA, M.; GIROUD, J.; WILLOUGHBY, D. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **Journal of Pathology**, v.104, p.15-29, 1971.
- GHIRALDINI, M. A. **Curso: Animais de experimentação**. São Paulo. 70 p. 1995.
- HUNSKAAR S.; HOLE, K. The formalin test in mice-dissociation between inflammatory and noninflammatory pain. *Pain* 30: 103-114, 1987.

HUNT, D. R.; TAYLOR, N. P.; CHARLES, G. (eds.) The New Cactus Lexicon. Text. dh Publications, Milborne Port. 2006.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Pathophysiology of pain. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, p. 1-12, 2008.

MERUSSE, J. L. B.; LAPICHICK, V. B. V. Instalações e equipamentos. In: LUCA, R. R. et al. eds. Manual para técnicos em bioterismo. 2. ed. São Paulo: Comissão de Ensino do Colégio Brasileiro de Experimentação animal, cap. 3, p. 15-25. 1996.

MICHIELIN, E.M.Z. Obtenção de extrato de erva baleeira (*Cordia verbenacea* D.C.) por diferentes técnicas: medida da atividade biológica, modelagem matemática e determinação do equilíbrio de fases. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. 235 p.2009.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, p. 846-852, 2002.

NSONDE NTANDOU, G. F.; BANZOUZI, J. T.; MBATCHI, B.; ELION-ITOU, R. D. G.; ETOUSSIBI, A. W.; RAMOS, S.; BENOIT-VICAL, F.; ABENA, A. A.; OUAMBA, J. M. Analgesic and anti-inflammatory effects of Cassia siamea Lam. Stem bark extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 127, p.108–111, 2010.

SAMPAIO, E. V. S. B.; GIULIETTI, A. M.; VIRGINIO, J.; CAMARRA-JORAS, C. F. L. Vegetação e Flora da Caatinga. Recife, Associação Plantas do Nordeste (APNE), Centro Nordestino de Informações sobre Plantas (CNIP). 2002.

WINER, B. J.; BROWN, D. R.; MICHELIS K. M. Statistical principles in experimental design. 3rd.ed. New York: McGraw Hill; p.100-65. 1991.

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE  
*Polygala boliviensis***

## ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Polygala boliviensis*

Pesquisa Institucional desenvolvida na Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), pertencente ao Grupo de Pesquisa Estudos Químicos e Atividades Biológicas em Produtos Naturais; Projeto de Mestrado.

Danielle Figuerêdo da Silva<sup>1</sup>; Priscila Pinto Costa<sup>2</sup>; José Luiz Carneiro da Rocha<sup>3</sup>; Clayton Queiroz Alves<sup>4</sup>; Hugo Neves Brandão<sup>5</sup>.

1 Aluna do Curso de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, UEFS, bolsista CAPES, danielle.figs@gmail.com;

2 Aluna do Curso de Graduação em Farmácia, UEFS, bolsista CNPq, priiscilacosta@hotmail.com;

3 Aluno do Curso de Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais, UEFS, bolsista FAPESB, luiz\_farmaco@hotmail.com;

4 Professor Doutor do Departamento de Exatas, UEFS, cleiroz@yahoo.com.br ;

5 Professor Doutor do Departamento de Saúde, hugo@uefs.br.

### Introdução

A busca por novas fontes terapêuticas faz parte da história do homem (FERREIRA, 2006). Segundo Newmann e Cragg (2012), entre os anos de 1981 a 2010, foram aprovados para uso terapêutico 50 substâncias isoladas de produtos naturais e 247 obtidas a partir de semissíntese, que tratam os mais diversos tipos de patologias, desde doenças inflamatórias, até câncer ou Mal de Alzheimer. Dentre as fontes naturais, destacam-se os vegetais, devido à diversidade e complexidade estrutural dos metabólitos que eles produzem, sendo então considerados uma das maiores fontes de substâncias bioativas (BRANDÃO *et al.*, 2010).

O envelhecimento e algumas patologias, tais como artrite, choque hemorrágico, doenças do coração, catarata, disfunções cognitivas, câncer e AIDS, estão ligados ao excesso de radicais livres no organismo humano, podendo este ser a causa ou o fator agravante do quadro (BARREIROS, DAVID, DAVID, 2006). Dessa forma, a busca de antioxidantes naturais foi iniciada com o objetivo de substituir, parcial ou totalmente, a utilização dos antioxidantes sintéticos, aos quais se atribuem efeitos deletérios ao organismo animal quando utilizados em doses elevadas (BROINIZI *et al.*, 2007).

As substâncias fenólicas são um dos mais importantes grupos de substâncias que ocorrem nas plantas e que contribuem para as propriedades antioxidantes. Essas substâncias são provenientes do metabolismo secundário das plantas, isto é, elas não apresentam uma função direta nas atividades bioquímicas primárias, mas estão envolvidas na adaptação à condição de estresses ambientais, seja na defesa contra a radiação ultravioleta ou agressão por patógenos (FERREIRA, 2010; JABERIAN; PIRI; NAZIRI, 2013).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos se deve principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Essas características desempenham papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação, como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (SOUSA *et al.*, 2007; SOUSA, VIEIRA, LIMA, 2011).

A investigação da atividade antioxidante de substâncias ou de extratos vegetais pode ser realizada em laboratório, utilizando-se várias metodologias. O teste do sequestro do 1,1-difenil- 2-picrilhidrazil (DPPH•) é frequentemente utilizado para avaliação da

capacidade de eliminação de radicais livres. Nesse teste, a concentração do DPPH• é monitorada, através da espectrofotometria no Ultravioleta-Visível (UV-VIS), na presença de antioxidantes que possam sequestrá-lo (KUÇUK *et al.*, 2007).

Diversas espécies da família Polygalaceae Hoffmannseg & Link são conhecidas por conterem uma grande diversidade de compostos químicos (LAPA, 2006). São conhecidos 22 gêneros e cerca de 1.300 espécies descritas com ampla distribuição no mundo (ROCHA *et al.*, 2012), sendo as regiões temperadas, quentes e tropicais seus principais centros de diversidade (FURNESS, S. H.; STAFFORD, 1995). No Brasil, está representada por oito gêneros e cerca de 250 espécies, das quais, as do gênero *Polygala* correspondem a cerca de 75% (MARQUES; PASTORE, 2006).

De acordo com Rocha e colaboradores (2012), o gênero *Polygala*, responsável pela distribuição cosmopolita da família, compreende atualmente cerca de 725 espécies e 8 subgêneros, sendo comumente apresentado na forma de ervas ou mais raramente subarbustos. As flores são, em geral, brancas, amareladas, róseas ou violáceas, sendo mais raramente atropurpureas ou azuis (LAPA, 2006).

Investigações com espécies do gênero *Polygala* mostram interessantes propriedades biológicas, a exemplo da *P. japonica*, apresentando efeito neuroprotetor (LI *et al.*, 2012), *P. tenuifolia*, utilizada como anti-inflamatória (CHEONG *et al.*, 2011) e *P. senega*, cujo extrato apresentou atividade anticâncer (PAUL *et al.*, 2010).

A disponibilidade de espécies de *Polygala* no campus da UEFS, bem como a falta de relatos sobre a composição química e atividades de *P. boliviensis* estimulou a realização da pesquisa com o intuito de contribuir com o conhecimento acerca das atividades biológicas da espécie. Nesse sentido, o presente estudo visou avaliar a atividade antioxidante dos extratos e frações de *P. boliviensis* através do método do sequestro do radical livre DPPH•.

## **Metodologia**

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada pelo método de sequestro do radical livre DPPH•, de acordo com a metodologia descrita por Malterud e colaboradores (1993).

O teste foi realizado, inicialmente, com o extrato metanólico bruto (EBPB) e os extratos semipurificados por partição, hexânico (EHPB), clorofórmio (ECPB) e acetato de etila (EAPB), além do extrato padronizado de *Ginkgo biloba* (EGb761), que serviu como padrão positivo para comparação. Em seguida, o extrato mais ativo foi selecionado para dar continuidade ao estudo. Nesse sentido, as frações obtidas da coluna cromatográfica do EAPB foram submetidas ao teste, para avaliar, qual delas tinha maior potencial de inibição do radical livre DPPH•.

Após análise dos resultados da atividade, foram selecionadas as amostras mais ativas para determinação da concentração efetiva para sequestrar 50% dos radicais livres DPPH• (CE<sub>50</sub>). O propilgalato foi utilizado como controle positivo no teste (5mg/mL).

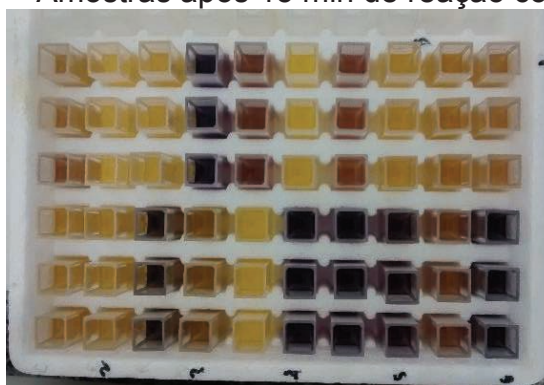
Alíquotas de 50 µL das amostras foram adicionadas a 3 mL da solução de DPPH• (45µg/mL), incubadas à temperatura ambiente e protegidas da luz por 15 minutos. O branco foi preparado substituindo a amostra pelo mesmo volume de etanol. A primeira leitura no espectrofotômetro foi feita com a cubeta contendo somente a solução do DPPH•, e a segunda leitura, após 15 minutos da adição das amostras (Figura 1). As



medidas de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro da marca BEL Photonics, modelo 1105, em um comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 517 nm.

A atividade antioxidante foi expressa em porcentagem e calculada através da Equação 1. Em que  $A_0$  = absorvância inicial da solução de DPPH•;  $A_f$  = absorvância final da amostra após reação de 15 minutos com DPPH•;  $A_{0p}$  = absorvância inicial do padrão e  $A_{fp}$  = absorvância final do padrão após reação de 15 minutos com DPPH•.

**Figura 1** – Amostras após 15 min de reação com DPPH•



Fonte: AUTORA (2015).

**Equação 1** – Cálculo para porcentagem de sequestro de radical livre DPPH•

$$\%SRL = \frac{100 (A_0 - A_f)}{A_{0p} - A_{fp}}$$

Fonte: MALTERUD *et al*, 1993.

As análises estatísticas foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA), utilizando-se o método de Tukey para avaliar os resultados das amostras entre si, bem como Scott-Knott, quando apropriado. Foi utilizado também o método de Dunnett para comparar as amostras com o padrão positivos. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados como indicativos de significância. Para o cálculo da  $CE_{50}$  foi utilizada a regressão linear, sendo considerados valores de  $R \geq 0,99$ .

## Resultados e discussão

Inicialmente, os extratos de *P. boliviensis* foram submetidos ao teste de sequestro do radical livre DPPH•. A partir das medidas das absorvâncias foi determinada a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres no meio reacional (%SRL) para cada extrato (Tabela 1).

**Tabela 1** – Atividade antioxidante dos extratos de *P. boliviensis* pelo método do DPPH•

Amostras (10mg/mL)	EBPB	EHPB	ECPB	EAPB
% SRL	66,05±2,33	10,36±0,89	29,98±1,09	89,72±1,13

Fonte: AUTORA (2015).

Analisando a Tabela 1, observa-se que o EAPB foi o mais ativo na concentração de 10 mg/mL, sequestrando 89,72% de radicais livres. É evidente também que o EBPB apresentou atividade superior a 50% nessa mesma concentração e que o fracionamento do extrato acarretou em diminuição da atividade para os extratos EHPB e ECPB.

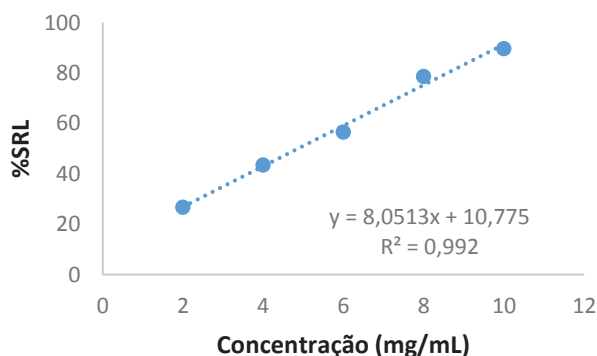
O extrato bruto apresenta uma mistura complexa de metabólitos secundários que podem agir sinergicamente para expressão de determinada atividade biológica, ou podem antagonizar a ação de algum componente químico. A partição com solventes de diferentes polaridades possibilitou a obtenção de extratos semipurificados, devido a seleção dos componentes químicos que ocorre pela afinidade desses com o solvente extrator.

Nesse sentido, pode-se inferir que a partição do EBPB acarretou no aumento da atividade do EAPB devido ao aumento da concentração dos componentes apresentados no extrato bruto que se encontravam em menores concentrações nesse ou sofriam interferência de antagonistas, e, conseqüente diminuição das atividades nos demais extratos. Tal resultado corrobora com os dados da literatura, em que o fracionamento com acetato de etila implica no aumento da atividade antioxidante expressada, isso porque os compostos relacionados a essa atividade, como flavonoides, cumarinas, taninos e outros fenólicos estão em maior concentração nesse tipo de extrato (BALESTRIN *et al.*, 2008; MANETTI *et al.*, 2010; MISSAU, *et al.*, 2007; TREVISAN, 2010).

Devido à maior atividade do EAPB, o teste de sequestro do radical livre DPPH• foi repetido em diferentes concentrações (2, 4, 6, 8, 10 mg/mL) para que fosse determinada a Concentração Efetiva para sequestro de 50% dos radicais (CE<sub>50</sub>). Os resultados de %SRL foram calculados com base nas absorbâncias e, em seguida, foi traçado um gráfico e realizada a regressão linear para o cálculo (Gráfico 1), encontrando valor de CE<sub>50</sub> do EAPB, equivalente a 4,87±0,13 mg/mL.

Lapa (2006) encontrou valor de CE<sub>50</sub>=61,2 mg/mL para o extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* e, apesar do valor obtido, relacionou à atividade gastroprotetora do extrato. Já Mendes (2008) apresentou valores de CE<sub>50</sub> de 63,76 µg/mL para o extrato hidroalcoólico de *P. sabulosa* e 110, 50 µg/mL para o extrato acetato de etila. Sakthidevi e Mohan (2012) obtiveram valores de CE<sub>50</sub> equivalentes a 48,26, 59,10 e 41,58 µg/mL para *P. javana*, *P. chinensis* e *P. rosmarinifolia*, respectivamente.

**Gráfico 1** – Curva para determinação da CE<sub>50</sub> do EAPB



Fonte: AUTORA (2015).

Segundo Fadda e colaboradores (2014) fatores como tempo de reação, concentração inicial do DPPH• e comportamento cinético das diferentes amostras, influenciam no valor de CE<sub>50</sub> obtido, dificultando a comparação de resultados. Nesse sentido, apesar do relato na literatura de estudos com outras espécies do gênero *Polygala*, a comparação dos resultados é dificultada devido a diferentes formas de execução do teste de sequestro do radical livre DPPH•. Dessa forma, foi realizado também, pelo mesmo método, a determinação da CE<sub>50</sub> do extrato padronizado de *Ginkgo biloba* utilizado como padrão positivo para o teste, sendo este de 3,28±0,38 mg/mL.

Comparando esses resultados com o obtido para EAPB pelo teste de Dunnett (p<0,05) a diferença é significativa, no entanto, é possível avaliar que o valor de CE<sub>50</sub> do EAPB é um valor próximo ao EGb761, que, de acordo com Bridi, Steffen e Henriques (2001) tem sua atividade antioxidante relacionada com os efeitos benéficos desse extrato em doenças neurodegenerativas. Nesse sentido, a atividade apresentada pelo EAPB também pode influenciar na expressão de outras atividades biológicas que apresentam relação com a atividade antioxidante pelo sequestro de radicais livres.

Devido à melhor atividade do EAPB, o mesmo foi fracionado por CC e as frações resultantes foram testadas pelo mesmo método. Foi feita uma triagem prévia, na qual as frações foram avaliadas na concentração de 10 mg/mL para analisar qual dessas apresentaria melhor atividade. As amostras FAPB01 e FAPB02 não foram avaliadas por falta de massa. Através de análises estatísticas, as melhores frações foram as FAPB10, FAPB13 e FAPB15 (Tabela 2).

**Tabela 2** – Resultado da triagem da atividade antioxidante com frações acetato

Amostra	%SRL	Amostra	%SRL
FAPB03	0,44±1,69 <sup>a</sup>	FAPB11	61,90±3,16 <sup>c</sup>
FAPB04	3,42±0,81 <sup>a</sup>	FAPB12	96,19±4,11 <sup>f</sup>
FAPB05	25,50±0,39 <sup>b</sup>	FAPB13	100,00±4,33 <sup>e</sup>
FAPB06	2,69±0,61 <sup>a</sup>	FAPB14	100,00±1,10 <sup>e,f</sup>
FAPB07	68,34±1,61 <sup>c</sup>	FAPB15	100,00±2,08 <sup>e</sup>
FAPB08	1,71±0,81 <sup>a</sup>	FAPB16	75,46±1,66 <sup>c</sup>
FAPB09	84,42±7,05 <sup>d</sup>	FAPB17	96,34±2,81 <sup>c</sup>
FAPB10	100,00±2,66 <sup>e</sup>		

Estatística realizada: ANOVA e Teste Tukey (p<0,05)

Fonte: AUTORA (2015).

As frações que apresentaram melhor atividade foram submetidas novamente ao teste em diferentes concentrações para a determinação da CE<sub>50</sub>. Para FAPB10 foram utilizadas 7, 6, 4, 2 e 1 mg/mL; para FAPB13 valores de 7, 6, 5, 2 e 1, mg/mL; e para FAPB15 as concentrações foram 7, 6, 5, 2 e 0,5 mg/mL. Os resultados de %SRL foram calculados com base nas absorbâncias e, em seguida, foi traçado um gráfico e realizada a regressão linear para cálculo da CE<sub>50</sub>. As frações analisadas apresentaram CE<sub>50</sub> conforme descrito na Tabela 3.

**Tabela 3 - CE<sub>50</sub> das frações mais ativas do EAPB**

Amostras	CE <sub>50</sub> (mg/mL)	R <sup>2</sup>
FAPB10	4,32±0,19 <sup>a</sup>	0,990
FAPB13	3,67±0,34 <sup>a</sup>	0,998
FAPB15	4,13±0,21 <sup>a</sup>	0,993

Estatística realizada: ANOVA e Teste Scott-Knott (p<0,05)

Fonte: AUTORA (2015).

As frações FAPB10, FAPB13 e FAPB15 não apresentaram diferença significativa pelo teste de Scott-Knott (p<0,05). De acordo com as análises estatísticas, o fracionamento do EAPB proporcionou aumento significativo da atividade antioxidante para essas frações, pois, quando comparados os valores de CE<sub>50</sub> do EAPB e frações, houve diferença significativa pelo teste de Dunnett (p<0,05). Vale ressaltar ainda que a fração mais ativa (FAPB13) não apresentou diferença significativa, pelo teste Dunnett, quando comparada ao EGb761, mostrando-se como uma fração promissora para análise de outras atividades relacionadas com a ação de sequestro de radicais livres.

### Conclusões

O presente estudo permitiu a avaliação dos extratos e frações de *Polygala boliviensis*. O extrato acetato de etila se mostrou o mais ativo, o que pode estar relacionado com sua composição química, visto que comumente o extrato acetato é o mais rico em substâncias antioxidantes, como fenólicos.

A fração mais ativa, a FAPB13, apresentou CE<sub>50</sub> comparável ao extrato de *Ginkgo biloba* (EGb761), que tem seus efeitos neuroprotetores relacionados à atividade antioxidante, podendo essa fração ter boa relação com atividades ligadas ao potencial antioxidante.

De modo geral, a diversidade de metabólitos e as atividades biológicas observadas em espécies de *Polygala* justificam o interesse no estudo de espécies deste gênero. Acredita-se que essa espécie apresenta boas perspectivas de estudo, com interessante potencial químico e farmacológico a ser descoberto.

**Palavras-Chave:** Atividade biológica. DPPH. Polygalaceae.

### Agradecimentos

À CAPES, ao CNPq e à FAPESB pelo apoio financeiro.

## Referências Bibliográficas

BALESTRIN, L.; DIAS, J.F.G.; MIGUEL, O.G.; DALL'STELLA, D.S.G.; MIGUEL, M.D. Contribuição ao estudo fitoquímico de *Dorstenia multiformis* Miquel (Moraceae) com abordagem em atividade antioxidante. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n.2, p. 230-235, 2008.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, n.1, p. 113-123, 2006.

BRANDÃO, H.N.B.; DAVID, J.P.; NASCIMENTO, J.A.P.; DAVID, J.M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p.1359-1369, 2010.

BRIDI, R.; STEFFEN, V.M.; HENRIQUES, A.T. Investigação da atividade antioxidante do extrato padronizado de *Ginkgo biloba* (EGb 761) em ratos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.37, n.2, p. 159-164, 2001.

BROINIZI, P.R.B.; ANDRADE-WARTHA, E.R.S.; SILVA, A.M.O.; NOVOA, A.J.V.; TORRES, R.P.; AZEREDO, H.M.C.; ALVES, R.E.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.4, p. 902-908, 2007.

CHEONG, M.H.; LEE, S.R.; YOO, H.S.; JEONG, J.W.; KIM, G.Y.; KIM, W.J.; JUNG, I.C.; CHOI, Y.H. Anti-inflammatory effects of *Polygala tenuifolia* root through inhibition of NF- $\kappa$ B activation in lipopolysaccharide-induced BV2 microglial cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n.3, p. 402–1408, 2011.

FADDA, A.; SERRA, M.; MOLINU, M.G.; AZARA, E.; BARBERIS, A.; SANNA, D. Reaction time and DPPH concentration influence antioxidant activity and kinetic parameters of bioactive molecules and plant extracts in the reaction with DPPH radical. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 25, p. 112-119, 2014.

FERREIRA, E.I. Como nascem e se desenvolvem os novos medicamentos. In: SILVA, P. (Org.). **Farmacologia**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 213-221.

FERREIRA, M.A. **Perfil cromatográfico das substâncias fenólicas presentes em extratos de mel de assa peixe e avaliação de seu poder antioxidante**. 2010. 77 p. Monografia (Curso de graduação em Química) – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

FURNESS, S.H.; STAFFORD, P.J. The Northwest European Pollen Flora, Polygalaceae. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 88, n. 1-4, p. 61-82, 1995.

JABERIAN, H.; PIRI, K.; NAZARI, J. Phytochemical composition and *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of some medicinal plants. **Food Chemistry**, v.136, p. 237-244, 2013.

KUÇUK, M.; KOLAYLI, S.; KARAOĞLU, S.; ULUSOY, E.; BALTACI, C.; CANDAN, F. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. **Food Chemistry**, v.100, n.2, p. 526–534, 2007.



LAPA, F. R. **Avaliação da Atividade Antinociceptiva, Antiinflamatória e Protetora Gástrica do Extrato Hidroalcoólico Bruto da *Polygala paniculata* L.** 2006. 120 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Departamento de Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

LI, C.; FU, J.; YANG, J.; ZHANG, D.; YUAN, Y.; CHEN, N. Three triterpenoid saponins from the roots of *Polygala japonica* Houtt. **Fitoterapia**, v. 83, n.7, p. 1184–1190, 2012.

MALTERUD, K.E.; FARBROT, T.L.; HUSE, A.E.; SUND, R.B. Antioxidant and radical scavenging effects of anthraquinones and anthrones. **Pharmacology**, v. 47, n. 1, p. 77-85. 1993.

MANETTI, L.M.; TURRA, A.F.; TAKEMURA, O.S.; SVIDZINSKI, T.I.E.; LAVERDE JUNIOR, A. Avaliação das atividades antimicrobiana, citotóxica, moluscicida e antioxidante de *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.4, p.406-413, 2010.

MARQUES, M.C.M.; PASTORE, J.F.B. Duas espécies novas de *Polygala* L. (Polygalaceae) para o Brasil. **Rodriguésia**, v. 57, n.1, p. 99-102, 2006.

MENDES, B.G. ***Polygala sabulosa* A.W.Bennett**: obtenção de estirilpironas e cumarinas, preparo de análogos e ensaios de atividades biológicas. 2008. 192 p. Tese (Doutorado em Química) – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MISSAU, F.C.; MORESCO, H.H.; BRIGHENTE, I.M.C.; PIZZOLATTI, M.G. Avaliação dos extratos e compostos isolados de *Polygala paniculata* através de testes antioxidantes e toxicidade frente à *Artemia salina*. In: 25ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, Águas de Lindóia, 2007. **Anais da 25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. Disponível em: <<http://sec.s bq.org.br/cdrom/30ra/resumos/T1140-1.pdf>>. Acesso em: 01 jan. 2015.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Product**. Edição especial em homenagem ao Gordon M. Cragg, p. 311-335, 2012.

PAUL, S.M.; MANDAL, S.K.; BHATTACHARYYA, S.S.; BOUJEDAINI, N.; KHUDBUKHSH, A.R. *In vitro* and *in vivo* studies demonstrate anticancer property of root extract of *Polygala senega*. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies**, v. 3, n.3, p. 188–196, 2010.

ROCHA, J.L.C.; PASTORE, J.F.B.; BRANDÃO, H.N.; AZEREDO, A.; DAVID, J.P.; SANTOS, E.O.; DAVID, J.M. Quantificação de salicilato de metila em quatro gêneros de Polygalaceae por CLAE-DAD. **Química Nova**, v.35, n.11, p. 2263-2266, 2012.

SAKTHIDEVI, G.; MOHAN, V.R. Comparative *in vitro* free radical scavenging activity of *Polygala javana* DC., *Polygala chinensis* L. and *Polygala rosmarinifolia* Wight & Arn (Polygalaceae). **Journal of Current Chemical & Pharmaceutical Sciences**, v.2, n.4, p. 294-298, 2012.

SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-JR, G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v.30, n.2, p. 351-355. 2007.



SOUSA, M.S.B.; VIEIRA, L.M.; LIMA, A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro* de resíduos de polpas de frutas tropicais. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n.3, p. 202-210, 2011.

TREVISAN, R. F. **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades biológicas das cascas de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent Umaceae**. 2010. 109 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

**CARACTERIZAÇÃO EM PROGÊNIES MEIO-IRMÃO DE *Jatropha curcas* L. QUANTO AO CARÁTER TEOR DE ÓLEO NA SEMENTE E MARCADORES RAPD**

# CARACTERIZAÇÃO EM PROGÊNIES MEIO-IRMÃO DE *JATROPHA CURCAS* L. QUANTO AO CARÁTER TEOR DE ÓLEO NA SEMENTE E MARCADORES RAPD

Pesquisa Institucional Desenvolvida no Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, pertencente ao Grupo de Pesquisa NBIO; Projeto de Pesquisa de Iniciação científica e de Tese.

Priscila Patricia dos Santos Silva<sup>1</sup>; Simone Alves Silva<sup>2\*</sup>; Dyane Coelho Queiroz<sup>3</sup>; Deoclides Ricardo de Souza<sup>2</sup>; Daniel Passos Assis<sup>4</sup>; Vanessa de Oliveira Almeida<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Aluna do curso de Graduação em Bacharelado em Biologia pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Bolsista PROPAE. prisilva.bio@gmail.com

<sup>2</sup> Professor Doutor do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da UFRB. \*Orientador, Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq, sas@ufrb.edu.br;

<sup>3</sup> Aluna do Curso de Doutorado em Ciências Agrárias pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Bolsista CAPES/REUNI, dyanecq@hotmail.com

<sup>4</sup> Graduando em Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, eng.agrodaniel@gmail.com

<sup>5</sup> Pós-doutoranda em Ciências Agrárias pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Bolsista FAPESB/CAPES, voagro@hotmail.com

## INTRODUÇÃO

*Jatropha curcas* L. comumente chamada de pinhão manso é uma planta perene, decídua e diplóide ( $2n=22$ ), cuja espécie arbustiva pertence à família Euphorbiace e originária da América Central (FAIRLESS, 2007; LEELA et al., 2011). Uma das vantagens desta cultura é seu longo ciclo produtivo podendo alcançar até 40 anos, possibilitando a fixação da mão-de-obra no campo, além de contribuir na inserção da agricultura familiar na cadeia dos biocombustíveis bem como ao desenvolvimento sustentável (CASTRO et al., 2008).

O pinhão manso pode ser considerado uma das mais promissoras oleaginosas para utilização como biodiesel, pois suas amêndoas podem gerar de 50 a 52% de óleo depois de extraído com solventes e 32 a 35% em caso de extração por expressão (MELLO, 2009). Apresentando utilização não apenas como uma fonte potencial de energia, mas também em produtos biofarmacêuticos, cosméticos e biopesticidas (KUMAR e SHARMA, 2008; LEELA et al., 2011), além de não competir com a produção de óleos comestíveis (PÊSSOA et al., 2011).

Para a indústria de biodiesel, os fatores de maior relevância, no momento da compra de grãos são o teor de óleo e sua qualidade determinada pelo percentual de ácidos graxos livres (SANTOS et al., 2012), o que salienta a importância do estudo do teor de óleo.

Apesar de todo potencial para a produção de biocombustível, o pinhão manso é uma espécie com pouco tempo de cultivo, ainda com grandes lacunas para utilização como cultura, principalmente no que diz respeito a estudos científicos que provem o

seu potencial produtivo. Ainda não domesticada completamente, necessitando desta forma de pesquisas sobre seleção de genótipos estáveis em diferentes ambientes (CASTRO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2010, BRASILEIRO, 2010; OLIVEIRA, 2013).

Alguns autores têm desenvolvido estudos relacionados com a divergência genética do pinhão manso (JUHÁSZ et al.; 2009; CARVALHO et al., 2009; MELLO et al., 2009; BRASILEIRO, 2010; LAVIOLA et al., 2011; LAVIOLA et al., 2012; OLIVEIRA, 2013). No entanto, as evidências científicas sobre seu comportamento genético são praticamente inexistentes, por conta disto há ausência de cultivares melhorada que possam ser recomendadas com confiança (JONGSHAAP et al., 2007; BRASILEIRO, 2010; OLIVEIRA, 2013).

Com o propósito de conter os riscos e aprimorar o desempenho da cultura nas mais variadas condições edafoclimáticas, é fundamental investir na caracterização, seleção e melhoramento genético (OLIVEIRA et al., 2010).

Porém, antes de dar início a um programa de melhoramento é essencial à coleta de material genético, a caracterização e a avaliação desses materiais (BRASILEIRO 2010). Essa caracterização pode ser realizada através do uso de marcadores ou descritores agronômicos, morfológicos e moleculares. Todavia os marcadores moleculares, baseados no DNA do indivíduo, tem maior precisão, pois não sofrem influência do ambiente (OLIVEIRA et al., 2010).

Diversos tipos de marcadores moleculares encontram-se disponíveis para a constatação da variabilidade genética em nível de DNA, como por exemplo, RAPD, AFLP, ISSR, SSR, RFLP, dentre outros, visando à detecção de polimorfismo genético. Dentre esses marcadores, o RAPD (Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) é uma técnica que merece destaque por ser acessível, por ter menor custo, menor número de etapas e obtenção de resultados mais breve (OLIVEIRA et al., 2007).

A técnica de RAPD é basicamente uma variação do protocolo de PCR, com algumas características distintas: utiliza como primer um único oligonucleotídeo, contendo de 9 a 10 bases, ao invés de um par de iniciadores, e sua sequência é construída ao acaso, resultando na amplificação de uma sequência alvo desconhecida, por conta disso são denominados iniciadores aleatórios ou arbitrários (CASTIGLIONI e BICUDO, 2003).

O marcador molecular RAPD já vem sendo usado com sucesso em estudos para caracterização da divergência genética em várias espécies, baseando-se na amplificação de fragmentos de DNA por PCR (*Polymerase Chain Reactions*) fazendo-se uma importante ferramenta na contribuição para avanços em programas de melhoramento genético desta espécie.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar e caracterizar progênies meio-irmãos de pinhão manso por meio de marcadores moleculares RAPD, e o caráter teor de óleo na semente.

## **METODOLOGIA**

### **TEOR DE ÓLEO**

O trabalho foi desenvolvido no Campo Experimental e Laboratório do Núcleo de Melhoramento Genético e Biotecnologia (NBIO) pertencente ao Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. A população de pinhão manso encontra-se no 4º ano de cultivo (48 meses após plantio). O teor de óleo foi estimado em sementes de 20 progênies meio irmãos de pinhão manso por meio do método químico Soxhlet, com utilização do solvente hexano, de acordo com AOCS (1976).

Para tanto, foi macerado em torno de cinco gramas (5g) de sementes de pinhão-manso com tegumento. As amostras foram colocadas no extrator *Soxhlet*, por 6 horas. O volume utilizado de hexano em cada extração foi de 300 mL, sendo realizadas três repetições para cada amostra. Decorrido o tempo de 6 horas no extrator, as amostras foram retiradas e secas à temperatura ambiente por aproximadamente 24 horas e pesadas novamente. Os valores correspondentes aos teores de óleo nas sementes foram obtidos por meio da diferença de peso antes e depois da extração com hexano e expressos em percentagem. Os resultados foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) e comparação entre médias múltiplas pelo teste de Duncan a 5%, utilizando o Software SAS.

### **RAPD**

Para a caracterização molecular foram utilizados marcadores do tipo RAPD. Das 20 progênies de meio irmãos de pinhão manso, presentes no campo experimental, foram selecionados dois de cada progênie para análise da diversidade genética (UFRB-PM 1, UFRB-PM 2, UFRB-PM 3, UFRB-PM 4, UFRB-PM 5, UFRB-PM 6, UFRB-PM 7, UFRB-PM 8, UFRB-PM 9, UFRB-PM 10, UFRB-PM 11, UFRB-PM 12, UFRB-PM 13, UFRB-PM 14, UFRB-PM 15, UFRB-PM 16, UFRB-PM 17, UFRB-PM 18, UFRB-PM 19 e UFRB-PM 20) totalizando 40 progênies. Folhas jovens dos 40 indivíduos foram coletadas e DNA foi extraído segundo protocolo Doyle e Doyle (1990) com algumas adaptações: 500 mM Tris pH 8,0; 1,4 M NaCl; CTAB ,2% (p/v); 2% ,β-mercaptoetanol; 20 mM de EDTA. Foi utilizada concentração do β-mercaptoetanol de 2%, representando um aumento de 10x em relação ao protocolo padrão. Após a amplificação foi feita análise pré-liminar do perfil de bandas, fato que possibilitou a constatação de que as amostras da mesma progênie possuíam o mesmo perfil de bandas. Não houve variação entre as duplicatas (duas amostras de cada progênie). Assim, foram consideradas para análises 20 amostras.

Cada reação de RAPD foi realizada em 25 µL de volume, segundo protocolo de Williams et al., (1990). As reações de amplificação foram feitas contendo 1x de tampão da Taq (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, and pH 8.3), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM de cada dNTP, 100 pM de primer, 1 U de Taq polimerase, 10,1 de água miliQ e 50 ng de DNA (Invitrogen). Foram utilizados 20 primers RAPD para realizar a amplificação obtenção dos marcadores de DNA via RAPD (Tabela 1).

Tabela 1. Lista de iniciadores utilizados no estudo de diversidade genética de progênies meio-irmãos de pinhão manso.

<b>Iniciador</b>	<b>Sequência (5'-3')</b>
OPC-15	GACGGATCAG
OPC-16	CACACTCCAG
OPC-20	ACTTCGCCAC
OPA-2	ACTTCGCCAC
OPA-4	TGCCGAGCTG
OPA-13	CAGCACCCAC
OPH-19	CTGACCAGCC
OPH-20	GGGAGACATC
OPE-16	GGTGACTGTG
Primer-211	AGCGCGAT
Primer-203	CACGGCGAGT
Primer-220	GTCGATGTCG
Primer-230	CGTCGCCCAT
Primer-232	CGGTGACATC
Primer-1	GTATTGCCCT
A-6	GGTCCCTGAC
A-11	CAATCGCCGT
B-05	TGCGCCCTTC
B-06	GTCGCCGTCA
N-3	GTCGCCGTCA

As amplificações foram efetuadas em termociclador (peqSTAR universal gradiente) com as seguintes condições de termociclagem: 94 °C por 5 min, 45 ciclos de 94 °C por 1 min, anelamento de primers a 36 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 2 min, e uma extensão final de 72 °C por 10 min. Após o processo de amplificação, os produtos de RAPD foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2 %, em tampão TAE, a 60 V por 5 h. Os géis foram corados com brometo de etídio 1 µg/mL e fotografados em fotodocumentador Locus biotechnology. O DNA ladder de 100 pb foi utilizado como marcador de peso molecular.

Pelo fato de o RAPD ser um marcador dominante, os dados foram computados como ausência (0) e presença (1) de bandas. A diversidade genética das progênies foi determinada por meio da matriz de dissimilaridade genética, gerada pelo programa Genes (CRUZ et al., 2004), tendo-se utilizado o índice de Jaccard.

Com base na matriz de distância/dissimilaridade genética obtida a partir da análise de marcadores RAPD, foi confeccionado um dendrograma, utilizando-se como critério de agrupamento, o método baseado na distância média, construído com



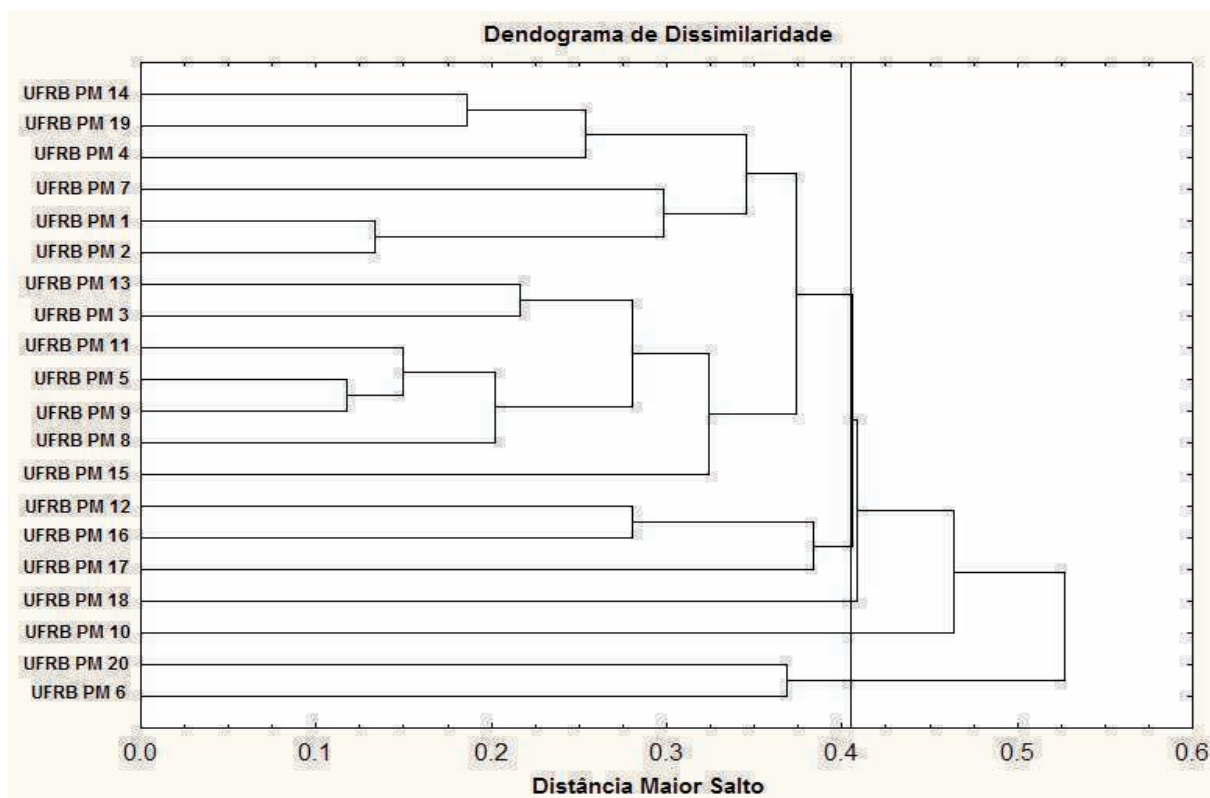
base na média aritmética não ponderada (UPGMA) (Sneath e Sokal, 1973). O ajuste entre a matriz de dissimilaridade e o dendrograma foi estimado pela correlação cofenética entre a matriz de distância e a matriz de agrupamento e foi calculada por meio do Software Genes e Estatística (Cruz e Carneiro, 2003), sendo o ponto de fusão definido de acordo com os critérios propostos por Mingoti (2005).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação à caracterização molecular, através do marcador RAPD foram obtidos resultados indicando a existência de variabilidade genética entre as progênies meio-irmão de pinhão manso avaliadas, e que a mesma deve ser considerada em programa de melhoramento genético da espécie (Figura 1).

A dissimilaridade genética avaliada por meio de marcadores RAPD variou de 0,0476 a 0,6452, sendo o par de acessos mais similar (UFRB PM 13 e UFRB PM 3), e o mais dissimilar UFRB PM 9 e UFRB PM 6 ( Figura 1).

Figura 1. Dendrograma de agrupamento de progênies de *Jatropha curcas* L. pelo método UPGMA, obtido a partir da matriz de distância Mahalanobis. Cruz das Almas, BA. 2013



Dos 20 iniciadores testados, um total de 13 iniciadores amplificaram 91 fragmentos e geraram polimorfismo de 96,2%. Os iniciadores polimórficos foram: OPC-15 ; OPC-16; OPC-20; OPA-13; OPH-19; OPH-20; OPE-16; 220; 230; 232; 211, N3 e OPM-06. Resultados similares foram obtidos por Lella et al. (2011), que relatou ter utilizado 13 iniciadores RAPD para genotipagem em estudos com pinhão manso e adquiriu bandas polimórficas. E por Ikbal et al. (2010) que utilizou 50 iniciadores RAPD, onde

44 amplificaram e foram selecionados para acessar a diversidade genética de 40 genótipos de *J. curcas* L. de cinco populações.

O número de bandas para cada iniciador avaliado variou de 4 a 10. As maiores bandas foram obtidas pelo iniciador 211, seguida pelo iniciador 220. Por consequência, entre os diferentes primers utilizados, os primers 211 e 220 produziram número máximo de bandas, tendo assim competência para serem indicados para estudos de detecção da dissimilaridade genética, contribuindo possivelmente com programa de melhoramento genético da espécie.

Por sua vez OLIVEIRA et al. (2010), analisando genótipos de pinhão manso por meio de marcado molecular RAPD detectaram divergência para dois genótipos indicando esses indivíduos como possíveis de serem usados entre ciclos de seleção em programas de melhoramento, uma vez se constituem em fontes de alelos que não estão presentes na maioria dos indivíduos analisados.

A observação do dendrograma (Figura 1), permite verificar que houve a formação de 5 grupos. Os resultados permitem sugerir que o cruzamento entre os indivíduos avaliados, poderá ser promissor para futuras hibridações dentro do programa de melhoramento genético de pinhão manso. As progênies foram agrupadas com a seguinte distribuição: G1: UFRB PM 6 e UFRB PM 20; G2: UFRB PM 10; G3: UFRB PM 18; G4: UFRB PM 17, UFRB PM 16 e UFRB PM 12 e G5: UFRB PM 15, UFRB PM 8, UFRB PM 9, UFRB PM 5, UFRB PM 11, UFRB PM 3, UFRB PM 13, UFRB PM 2, UFRB PM 1, UFRB PM 7, UFRB PM 4, UFRB PM 19, UFRB PM 14, cuja correlação cofenética (Tabela 2) obtida foi de 0,71 possibilitando considerável ajuste entre a representação gráfica das distâncias e a matriz de distância de Mahalamobis. Para Vaz Patto (2004),  $r > 0,56$  é considerada ideal, refletindo uma boa concordância entre a matriz de dissimilaridade e a de agrupamento.

**Tabela 2.** Coeficiente de correlação cofenética (CCC). Cruz das Almas - BA, 2013

Estatística	Valor
Correlação cofenética (CCC):	0,71
Probabilidade	0,0000**

Para o parâmetro teor de óleo, houve variação entre as progênies avaliadas pelo teste Duncan a 5% de probabilidade (Tabela 3), sendo esta amplitude de variação entre 32,61% a 47,21% (Tabela 3).

Os teores de óleo encontrados nas sementes pinhão-manso analisados por Pêsoa, et al. (2011), apresentaram entre 36,59 e 45,78 %. Já Melo et al. (2006) encontrou 42% de óleo, sendo que este valor está dentro da variação encontrada neste trabalho. Segundo Santos et al. (2012) o estágio de maturação dos frutos pode interferir no teor de óleo das sementes de pinhão-manso, em seu estudo os valores médios de teor de óleo das sementes de pinhão-manso variaram de 7,24 a 26,21%. Assim, as progênies meio-irmãos de pinhão manso poderão por esta razão também servir como fontes para o melhoramento desta cultura. Foi possível observar teor de

óleo maior que 40% (Tabela 3) para a maioria das progênes avaliadas, diferindo estatisticamente apenas a progênie 13 das demais.

**Tabela 3.** Teor de óleo (%) em sementes de progênes meio-irmãos de pinhão manso usando método de extração Soxhlet. Cruz das Almas, 2013.

<b>Progênie</b>	<b>Teor de Óleo (%)</b>
UFRB PM1	37,88 ABC
UFRB PM2	41,94 AB
UFRB PM3	34,75 BC
UFRB PM4	43,40 AB
UFRB PM5	38,85 ABC
UFRB PM6	44,00 AB
UFRB PM7	43,11 AB
UFRB PM8	42,95 AB
UFRB PM9	45,27 A
UFRB PM10	42,64 AB
UFRB PM11	46,49 A
UFRB PM12	43,40 AB
UFRB PM13	32,61 C
UFRB PM14	41,43 ABC
UFRB PM15	44,28 AB
UFRB PM16	43,03 AB
UFRB PM17	47,21 A
UFRB PM18	39,96 ABC
C.V. (%)	11,79
Média	41,85
Máximo	47,21
Mínimo	32,61
DP	3,81

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 0,05 de significância.

## **CONCLUSÃO**

A caracterização por meio marcadores de DNA RAPD e quanto ao carácter teor de óleo na semente, permite detectar a existência de divergência genética entre as progênes meio-irmãos de pinhão manso estudado, possibilitando auxiliar na definição de estratégias a serem utilizadas nos programas de melhoramento da espécie.

**Palavras-chave:** teor de óleo, biodiesel, marcadores moleculares, diversidade genética, melhoramento genético.

## **Agradecimentos**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa do Núcleo de Melhoramento Genético e Biotecnologia (NBIO) da UFRB; a PROPAAE - Pró-Reitoria de Políticas Afirmativas e Assuntos Estudantis pela concessão de Bolsa de estudo à primeira autora; a CAPES pela concessão de Bolsa de Doutorado à terceira autora.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AOCS. **Official methods and tentative methods of the American Oil Chemists' Society**. 3.ed Champaign, 1976.
- BRASILEIRO, B. P. **Conservação e melhoramento genético do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.), brasil**. 2010. 83f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, 2010
- CARVALHO, B. C. L.; OLIVEIRA, E. A. S.; LEITE, V. M.; DOURADO, V. V. **Informações Técnicas para o Cultivo do pinhão-manso no Estado da Bahia**. Salvador: EBDA, 2009. 79p.
- CASTIGLIONI, L.; BICUDO, H. E. M. C.; A Técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e suas aplicações para estudos em genética molecular. **Revista UNORP**, v. 3, n.2, p. 63-77, 2003.
- CASTRO, C. M; DEVIDE, A, C. P.; ANACLETO, A. H. Avaliação de acessos de Pinhão Manso em sistema de Agricultura Familiar. **Revista Tecnologia & Inovação Agropecuária**, v. 1 p. 41-49, 2008.
- CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 2003. v.2.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético** – v. 1, Viçosa , MG. Editora UFV, 2004. 480p.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 27, p.13-15, 1990.
- FAIRLESS, D. Biofuel: the little shrub that could-maybe. **Nature**, n.449, p.652–655 2007.
- IKBAL; BOORA, K. S.; DHILLON, R. S. Evaluation of genetic diversity in *Jatropha curcas* L. using RAPD markers. **India Journal of Biotechnology**, New Delhi , v.9, p. 50- 57, 2010.
- JONGSCHAAP, R. E. E.; CORRÉ, W., BINDRABAN, P. S.; BRANDENBURG, W. A. Claims and facts on *Jatropha curcas* L. Wageningen. **Plant Research International**. 42 p, 2007.
- JUHÁSZ, A. C. P.; SOARES, B. O.; PIMENTA, S.; RABELLO, H.; MORAIS, D. B. L. Parâmetros genéticos de 88 famílias de meio irmãos de *Jatropha curcas* na fase vegetativa. **In: Anais 5º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas. SBMP 2009, (CD ROM)**.

KUMAR, A.; SHARMA, S. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): a review. **Industrial crops and products**, v. 28, p. 1–10, 2008.

LAVIOLA, B.G.; BHERING, L.L.; MENDONÇA, S.; ROSADO, T.B.; ALBRECHT, J.C. Caracterização morfo- agrônômica do banco de germoplasma de pinhão manso na fase jovem. **Bioscience Journal**, v.27, p.371- 379, 2011.

LAVIOLA, B. G.; ALVES, A. A.; GURGEL, F. L.; ROSADO, T. B.; ROCHA, R. B. ALBRECHT. Estimates of genetic parameters for physic nut traits based in the germplasm two years evaluation. **Ciência Rural**, v. 42, p. 429-435. 2012.

LEELA, T.; NARESH, B.; REDDY, M. S.; MADHUSUDHAN, N. CH.; CHERKU, P. D. Morphological, physico-chemical and micropropagation studies in *Jatropha curcas* L. and RAPD analysis of the regenerants. **Applied Energy**. 88, n. 6, p. 2071–2079, 2011.

MELLO, F. D. A.; CAMARGO, J. T.; ALBRECHT, J. C.; CARGNIN, A. **Caracterização e avaliação de acessos de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) em dois níveis de fertilidade do solo**. Trabalho de Conclusão de Curso de Agronomia, Faculdade Integrada - IPIS. Departamento de Agronomia. Planaltina, DF. 2009.

MELO, J. C.; **Avaliação Preliminar do Potencial do Pinhão Manso para a Produção de Biodiesel**, 2006. Disponível em: [http://portal.ftc.br/bioenergia/wp-content/uploads/2010/05/Artigo\\_6.pdf](http://portal.ftc.br/bioenergia/wp-content/uploads/2010/05/Artigo_6.pdf). Acesso em: 16 de Setembro de 2013.

MINGOTI, S. A. **Análise de Dados Através de Métodos de Estatística Multivariada: uma abordagem aplicada**. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2005.

OLIVEIRA, A. C. B. de; CAIXETA, E. T.; ZAMBOLIM, E. M.; ZAMBOLIM, L.; SAKIYAMA, N. S. **Aplicação técnica de marcadores moleculares no melhoramento de plantas**. Campinas: Instituto Agrônômico de Campinas. 2007. 17p. (Instituto Agrônômico de Campinas, Documentos, 81).

OLIVEIRA, M.M. **Caracterização agrônômica em banco de germoplasma de pinhão manso no recôncavo baiano**. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais-RGV). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia-UFRB. Cruz das Almas- BA, p. 71, 2013.

OLIVEIRA, V. D.; LÉDO, A. S.; SILVA, A. V. C. **Variabilidade genética de pinhão manso cultivado em dois agroecossistemas de Sergipe**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Sergipe. São Cristóvão, SE. 2010.

PÊSSOA, G. K. A.; REATO, L. I. B.; LAVIOLA, B. G.; MENDONÇA, S.; SILVA, J. P.; VIEIRA, R. F.; COSTA, T. S. A. Caracterização de 50 acessos de pinhão-manso quanto ao teor de óleo. In...II Congresso Brasileiro De Pesquisas De Pinhão-Manso. Brasília, DF. 2011

SANTOS, S. B.; MARTINS, M. A.; AGUILAR, P. R. M.; CANESCHI, A. L.; CARNEIRO, A. C. O.; DIAS, L. A. S. Acúmulo de matéria seca e óleo nas sementes de pinhão-manso e qualidade do óleo extraído. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.16, n. 2, 2012.

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification**. San Francisco: W.H. Freeman, 1973. 573p.

VAZ PATTO, M. C.; SATOVIC, Z.; PÊGO, S.; FEVEREIRO, P. Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germplasm using microsatellite markers. **Euphytica**, v.137, p.63-67, 2004.

WILLIAMS J.G.K, KUBELIK A.R, LIVAK K.J, RAFALSKI, J.A, TINGEY, SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18., p.6531–6535, 1990.

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE EXTRATOS DE *Asemeia ovata* (POLYGALACEAE)**



## Caracterização química de extratos de *Asemeia ovata* (POLYGALACEAE)

Pesquisa Institucional desenvolvida na Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), pertencente ao Grupo de Pesquisa Estudos Químicos e Atividades Biológicas em Produtos Naturais; Projeto de Doutorado.

José Luiz Carneiro da Rocha<sup>1</sup>; Igor Kennedy Pereira de Oliveira<sup>2</sup>; Danielle Figuerêdo da Silva<sup>3</sup>; Anne Ramos de Santana<sup>4</sup>; Clayton Queiroz Alves<sup>5</sup>; Hugo Neves Brandão<sup>6</sup>.

1 Aluno do Curso de Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais, UEFS, bolsista FAPESB, luiz\_farmaco@hotmail.com;

2 Aluno do Curso de Graduação em Farmácia, UEFS, bolsista FAPESB, igor.kennedy@gmail.com;

3 Aluna do Curso de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, UEFS, bolsista CAPES, danyfigs@hotmail.com;

4 Aluna do Curso de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, UEFS, bolsista FAPESB, anneramosdesantana@gmail.com;

5 Professor Doutor do Departamento de Exatas, UEFS, cleiroz@yahoo.com.br;

6 Professor Doutor do Departamento de Saúde, hugo@uefs.br.

### Introdução

O interesse pela fitomedicina vem crescendo, devido à busca de novas alternativas terapêuticas para o tratamento de diversas doenças, cujos cuidados baseiam-se no uso de medicamentos que apresentam uma série de reações adversas e muitas vezes aliviam parcialmente os sintomas sem tratar a doença. Espécies vegetais da família Polygalaceae Hoffmannseg & Link são utilizadas tradicionalmente em muitas regiões do mundo. Atividades como expectorante, sedativa, antipsicótica, antifúngicas e analgésicas são atribuídas a essas espécies, o que as torna fonte de interesse para estudos de desenvolvimentos de novos produtos fitoterapêuticos. (LAPA, 2006; LAPA, 2009).

Na família Polygalaceae são descritos 22 gêneros e cerca de 1.300 espécies com ampla distribuição no mundo (ROCHA *et al*, 2012), sendo as regiões temperadas, quentes e tropicais seus principais centros de diversidade (FURNESS, S. H.; STAFFORD, 1995). No Brasil, está representada por oito gêneros e cerca de 250 espécies, das quais, as espécies do gênero *Polygala* correspondem a cerca de 75% (MARQUES; PASTORE, 2006). O gênero *Asemeia* compreende 28 espécies americanas (e uma variedade), de ocorrência sazonal, em períodos secos, e encontrado em savanas abertas (ou vegetação comparável), ou com menor frequência associado a vegetação florestal (PASTORE; ABBOTT, 2012).

Estudos com plantas dessa família, como *Polygala paniculata*, *P. cyparissias* e *P. sabulosa*, demonstram a presença de diversos compostos incluindo cumarinas, xantonas, esteroides e flavonoides (CAMPOS, 1997; MEOTTI, 2006; LAPA, 2009). Outro estudo também apresenta salicilato de metila em diferentes espécies dessa família, sendo um possível contribuidor para a atividade antinociceptiva apresentada por algumas espécies (ROCHA, 2012). Espécies desta família também são conhecidas por conter compostos químicos que exibem atividades analgésica, expectorante, sedativa, antifúngica, entre outras (LAPA, 2006).

Em estudos prévios, Rocha e colaboradores (2012) conseguiu validar a técnica de Cromatografia a Líquidos de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD), para identificação e quantificação de salicilato de metila em espécies da família Polygalaceae. Com a validação, foi possível identificar e quantificar o salicilato

de metila nas raízes e partes aéreas de *Asemeia ovata* (Poir.) J.F.B.Pastore & J.R.Abbott utilizando CLAE-DAD. Os valores encontrados para raízes e partes aéreas correspondem à  $97,72 \pm 6,30$  e  $49,33 \pm 5,41$   $\mu\text{g}$  de salicilato em cada grama de vegetal fresco, respectivamente. Corresponde, portanto ao primeiro trabalho em que se utilizou CLAE para quantificação de salicilato de metila e o segundo trabalho em que foi utilizada a técnica para identificação de salicilatos em geral, pois Villa e Colaboradores (2007) já haviam identificado salicilato de benzila por CLAE, porém este não foi quantificado.

Este mesmo grupo de pesquisa também confirmou a atividade antinociceptiva através de modelos experimentais (ROCHA, 2012). Os resultados obtidos no teste de nocicepção induzida por ácido acético permitiu observar que a administração sistêmica, via oral, do extrato bruto de *Polygala boliviensis* reverteu significativamente ( $p < 0,001$ ), de maneira dose dependente, o número de contorções abdominais, com a dose de 1000 mg/kg (93,59%), apresentando efeito estatisticamente igual ao apresentado pela morfina (2,5 mg/kg) - 92,65%. O teste de placa quente mostrou que o extrato analisado aumentou de forma significativa ( $p < 0,05$ ) o tempo de latência de camundongos expostos, sendo a dose mais efetiva de 300 mg/kg ( $17,67 \pm 1,04$  seg), superando o resultado obtido pelo controle morfina (1 mg/kg) -  $12,66 \pm 2,31$  seg.

A presença de compostos fenólicos em espécies de Polygalaceae torna-os fonte de interesse para o desenvolvimento de estudos. As substâncias fenólicas são consideradas como um dos mais importantes grupos de substâncias que ocorrem nas plantas. Entre suas propriedades elas contribuem para as propriedades antioxidantes. Essas substâncias são provenientes do metabolismo secundário das plantas, isto é, elas não apresentam uma função direta nas atividades bioquímicas primárias, mas estão envolvidas na adaptação à condição de estresses ambientais, seja na defesa contra a radiação ultravioleta ou agressão por patógenos (FERREIRA, 2010; JABERIAN; PIRI; NAZIRI, 2013).

O objetivo desse trabalho é identificar compostos fenólicos pela técnica de Cromatografia a líquidos de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), bem como determinar o teor de fenólicos e flavonoides totais para caracterizar quimicamente os extratos de *Asemeia ovata*.

A disponibilidade da espécie em abundância no campus da Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS, bem como a insipiência de estudos químicos com a espécie justificam a realização do presente trabalho. Além disso, estudos como este servem como base para posterior desenvolvimento de produtos fitoterapêuticos, além de servir como mais uma ferramenta de integração entre etnofarmacologia e pesquisas laboratoriais, e contribuir para a quimiosistemática do gênero em estudo.

## **Metodologia**

O extrato metanólico bruto de *Asemeia ovata* (EBAO) foi preparado no Laboratório de Extração de Produtos Naturais do Horto Florestal da UEFS. Todo o material vegetal coletado (planta inteira) foi colocado para secagem em estufa com ar circulante a uma temperatura média de  $40^\circ\text{C}$  durante 5 dias, sendo em seguida, triturado em liquidificador industrial. O pó resultante foi pesado e transferido para erlenmeyer e posteriormente, submetido à técnica de extração por maceração com metanol, com troca de solvente a cada 3 dias, por 5 vezes. O extrato metanólico foi filtrado em papel

filtro e após passagem em rotaevaporador a 60°C, foi transferido para um frasco previamente pesado e identificado. O material concentrado foi colocado na capela para secagem à temperatura ambiente, originando-se o extrato bruto seco (404,8g – 13,9%). Parte desse extrato foi separado para realização dos testes, e o restante foi submetido a partição com solventes orgânicos de diferentes polaridades (hexano, clorofórmio e acetato de etila). Os solventes foram evaporados também em rotaevaporador para a obtenção dos extratos hexânico (EHAO): 62,31g; clorofórmico (ECAO): 33,97g e acetato de etila (EAAO): 15,09g.

Os extratos secos obtidos (EBAO; EHAO; ECAO; EAAO) foram submetidos a técnica de CLAE-DAD para traçar o perfil químico da espécie em estudo e identificar possíveis compostos presentes nos mesmos. Os extratos foram diluídos com a fase móvel orgânica, filtrados em cartucho de extração de fase sólida (SPE) e submetidos a cromatógrafo Varian e detector de arranjo de diodo Varian ProStar. A separação cromatográfica foi realizada por meio de coluna LiChroCART Purospher StaR® RP18-e (250 mm x 4,6 mm i.d.) (5µm) (Merck, Darmstadt, Germany) combinado com pré-coluna apropriada da Merck. O gradiente de eluição utilizado foi solução de ácido acético 0,7% e acetonitrila (MeCN) com solução de ácido acético 0,7% (8:2). As condições cromatográficas incluíram: volume de injeção de 20 µL, faixa de comprimento de onda de 220-400 nm, com aquisição em 280 nm.

Foram utilizados padrões de diferentes fenólicos para a identificação nos extratos analisados. Os padrões foram: rutina, quercetina, luteolina, luteolina-7-glucosilada, catequina, (-)-epicatequina, procianidina B2, miricetina, ácido *p*-cumárico, ácido *trans*-ferúlico, ácido cafeico, kaempferol, kaempferide e ácido *trans*-cinâmico, todos da marca Sigma-Aldrich®, e ácido gálico da Vetec®.

O conteúdo de fenólicos foi baseado no método colorimétrico de Folin Ciocalteu (FC) com modificações (OLIVEIRA, 2009). As análises foram feitas com soluções das amostras dos extratos EBAO, EHAO, ECAO e EAAO em água destilada por espectroscopia na região do visível a 760nm. Foi utilizado padrão de ácido gálico para a construção da curva analítica e os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente (AGE)/ 100 gramas de extrato.

Inicialmente, foram preparadas a solução do reagente FC numa diluição de 1:10 em água destilada e a solução de carbonato de sódio a 7,5% em água destilada. O padrão ácido gálico foi preparado pesando-se 10 mg do ácido gálico e dissolvendo-se em 100 mL de água destilada. Em seguida, distribuiu-se a solução de ácido gálico em concentrações menores, utilizando-se volumes correspondentes a balão volumétrico de 20 mL.

A amostra a ser testada foi obtida, dissolvendo-se 10mg do extrato em 10mL de água destilada e 5mL de MeOH, o que resultou na diluição 1/10. Posteriormente, foi adicionado 0,5mL da amostra e das diferentes concentrações de ácido gálico em tubos de ensaios. O branco foi preparado com somente água destilada. Em cada tubo, incluindo o branco, adicionou-se 2,5mL do reagente FC agitando-se, em seguida, para proporcionar mistura de reagente com amostra. Após 3 minutos, foi adicionado 2mL da solução de carbonato de sódio 7,5% em cada tubo, e em seguida, agitou-os. Os tubos foram submetidos ao aquecimento em banho-maria a 50°C por 5 minutos, e após serem retirados, aguardou-se 15 minutos.

Os tubos foram colocados em banho de gelo por 3 minutos, e posteriormente, submetidos à leitura em espectrofotômetro a  $\lambda=760\text{nm}$ , sendo que as leituras foram realizadas em duplicata.

O teor de fenólicos totais foi determinado por interpolação da absorbância da amostra contra a curva padrão de ácido gálico, a partir da equação da curva padrão do ácido gálico  $Y = aX + b$ , onde Y é a absorbância da amostra, e X a concentração.

Para determinação do conteúdo de flavonoides totais nos extratos foi empregado método espectrofotométrico, utilizando como reagente cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ). Foram preparadas soluções das amostras dos extratos EBAO, EHAO, ECAO e EAAO em metanol. A absorbância foi lida a 415 nm e a partir dos resultados obtidos foi construída a curva padrão com o padrão de quercetina, cuja equação foi utilizada para o cálculo dos teores de flavonoides totais. O conteúdo de flavonoides foi expresso em gramas de quercetina equivalentes (QE)/ 100g do extrato (POTHITIRAT et al, 2009).

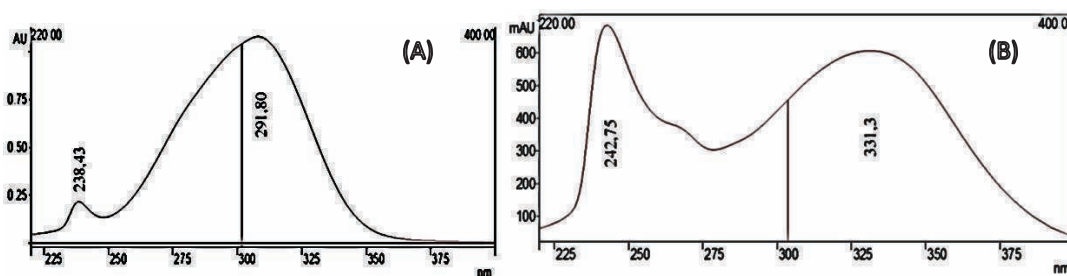
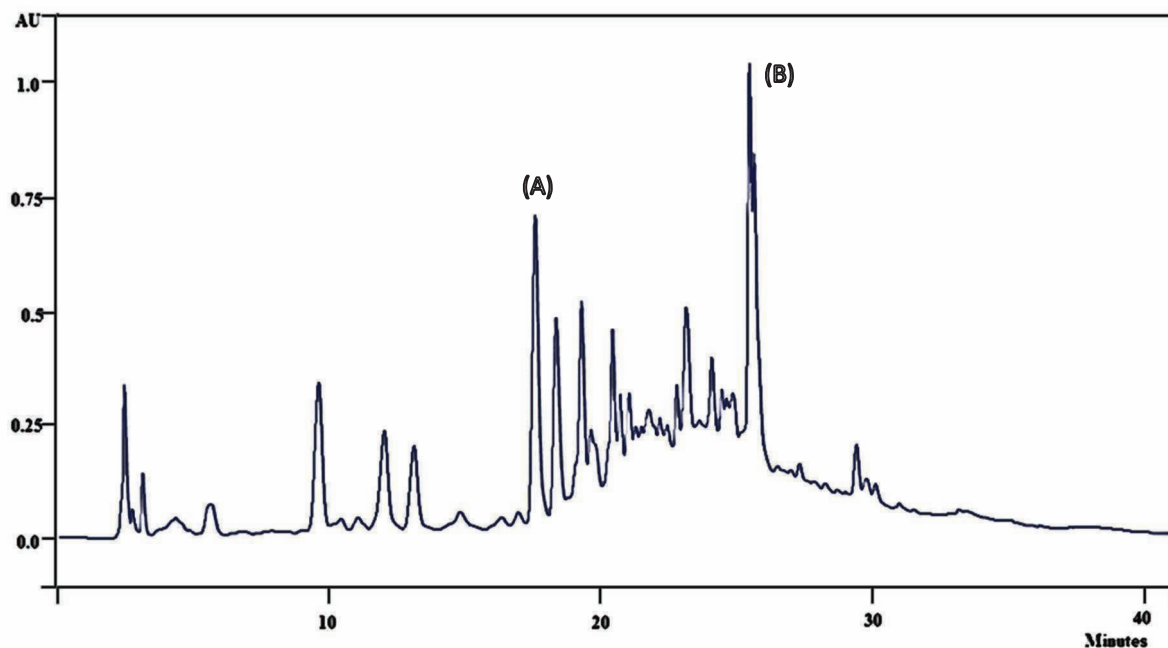
Para a curva-padrão, preparou-se 5 soluções do padrão em diferentes concentrações. Transferiu-se 15 mL de cada solução para balão volumétrico de 50 mL, adicionou-se 1 mL de solução metanólica de  $\text{AlCl}_3$  5% e completou-se o volume com solução metanólica de ácido acético 5%. Decorrido 30 minutos, mediu-se a absorbância da solução, utilizando o branco para ajuste do zero. A partir dos resultados obtidos foi traçada a curva-padrão.

Para o preparo das amostras foram transferidos 15 mL da amostra para balão volumétrico de 50 mL, adicionou-se 1 mL de solução metanólica de  $\text{AlCl}_3$  5% e completou-se o volume com solução metanólica de ácido acético 5%. Decorrido 30 minutos, foi medida a absorbância das soluções, utilizando o branco para ajuste do zero. O branco foi feito com solução metanólica de  $\text{AlCl}_3$  5% e e ácido acético 5%.

## **Resultados e discussão**

A análise cromatográfica mostrou variação no perfil de todos os extratos. Foi possível observar a presença de diversos compostos fenólicos, principalmente ácidos fenólicos e compostos flavonoídicos, além de possíveis cumarinas, nos extratos bruto, clorofórmico e acetato de etila. No extrato hexânico foi detectado possíveis flavonoides metoxilados, porém com baixa concentração (Figuras 1).

**Figura 1** - Cromatograma e espectros no ultravioleta ilustrativos da caracterização química de *A. ovata*



Com a comparação com os padrões de compostos fenólicos analisados pôde-se identificar a presença de cinco substâncias presentes nos extratos: os flavonoides rutina e luteolina-7-glucosilada, e os ácidos fenólicos ácido caféico, ácido *trans*-ferúlico e ácido *p*-cumárico.

No extrato bruto foi encontrado rutina, ácido *p*-cumárico e luteolina-7-glucosilada. No extrato acetato de etila pôde-se identificar ácido caféico, ácido *p*-cumárico e ácido *trans*-ferúlico. Por outro lado, no extrato clorofórmico apenas o ácido *trans*-ferúlico foi identificado. Nenhuma substância foi identificada no extrato hexânico, visto que as substâncias que comumente caracterizam esse extrato possuem identificação limitada pelo método de CLAE-DAD.

Compostos como cumarinas, xantonas, esteroides e flavonoides já foram encontrados em outras espécies da família em estudo (CAMPOS; SANTOS; VAZ, 1997; MEOTTI et al, 2006; LAPA et al, 2006). A presença de salicilatos, em especial salicilato de metila, também é característica dessa família, sendo encontrado em diversas espécies, incluindo *A. ovata*, principalmente em suas raízes (MENDES, 2008, ROCHA, 2012).

O conteúdo de fenólicos totais obtidos pelo método de Folin Ciocalteu, foi de 2,95 g de AGE/100g de EBAO. Já para os extratos ECAO, EHAO e EAAO os valores obtidos foram 5,82 g de AGE/100g, 1,69 g de AGE/100g e 12,37 g de AGE/100g, respectivamente.



O teor de fenólicos totais apresentaram resultados superiores aos encontrados com outras espécies da família. O extrato bruto de *P. sabulosa*, por exemplo, contém, como teor de fenólicos totais, aproximadamente 1,64 mg de ácido gálico/g de extrato seco, enquanto o extrato hexânico e o acetato de etila apresentaram aprox. 1,43 e 1,60 mg de ácido gálico/g de extrato seco, respectivamente (MENDES, 2008). Por outro lado, o extrato bruto de *A. ovata* apresenta teor de fenólicos totais de 29,5 mg de ácido gálico/g de extrato seco, enquanto que os extratos hexânico e de acetato de etila apresentaram 16,9 e 123,4 mg de ácido gálico/g de extrato seco, respectivamente.

Na quantificação de flavonoides totais, o EHAO não apresentou níveis suficientes para serem detectados pela técnica utilizada. Para EBAO, ECAO e EAAO foram obtidos valores de 2,34 g QE/100g, 1,39 g QE/100g e 0,93 g QE/100g, respectivamente.

Quanto a avaliação do teor de flavonoides totais, Mendes (2008) mostrou que os extratos bruto, hexânico e de acetato de etila de *P. sabulosa* apresentaram como resultados, respectivamente, 0,16, 0,11 e 0,14 mg de QE/g de extrato seco aproximadamente. Comparando-se com os resultados observado com *A. ovata*, observa-se maiores concentrações para os extratos bruto e acetato de etila (23,4 e 9,36 mg de QE/g de extrato seco) dessa espécie. Por outro lado, o extrato hexânico não apresentou resultado positivo para flavonoides, diferente do observado com *P. sabulosa*. Porém, pelo perfil químico obtido por CLAE-DAD foi possível observar a presença de possível flavonoide metoxilado. Isso mostra a limitação do método de flavonoides totais, que é baseado na complexação dos íons alumínio, que ocorre em locais específicos em que existem hidroxilas. Então, esse método pode ter resultado subestimado, tendo em vista que é mais propício para flavonoides com padrões de hidroxilação como o da quercetina.

Os resultados obtidos com esse teste corroboram os resultados do perfil fitoquímico obtido com CLAE-DAD, onde foi possível observar a presença de vários compostos fenólicos e flavonoídicos.

## **Conclusões**

Os estudos com plantas medicinais têm sido responsáveis por inúmeras e importantes descobertas. O desenvolvimento desta área de pesquisa deve-se a vários fatores, dos quais se destaca a participação de número cada vez maior de profissionais. Por outro lado, resultados promissores dependem de maior inter-relação entre os diversos profissionais e disciplinas que compõem o estudo das plantas medicinais, pois a continuidade destes estudos de forma isolada perpetuará a falta de resultados, impedindo o desenvolvimento de novos medicamentos.

Espécies do da família Polygalaceae tem sido fonte de interesse tanto para estudos químicos quanto biológicos. Isso se deve tanto aos poucos estudos apresentados por diversas espécies quanto pelo potencial que algumas delas tem apresentado.

Os resultados obtidos nesse estudo mostraram que a espécie *Asemeia ovata* apresenta uma variedade de compostos com destaque para os compostos fenólicos, principalmente ácidos fenólicos e flavonoides. A identificação dos 5 compostos por CLAE-DAD, rutina, luteolina-7-glucosilada, ácido *p*-cumárico, ácido cafeico e ácido *trans*-ferúlico, configuram o presente trabalho como estudo pioneiro de caracterização



química da espécie em questão. Apenas é encontrado estudo de identificação e quantificação de salicilato de metila nessa espécie, realizado pelo mesmo grupo de pesquisa.

Novos estudos estão sendo realizados no intuito de continuar a caracterização química através de isolamento de compostos, bem como da determinação desses compostos isolados.

Os resultados deste trabalho em conjunto com os dados descritos na literatura, mostram nitidamente que as plantas medicinais são fonte de uma variedade de compostos com potencial atividade biológica que poderão dar origem ou servir de protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos e/ou fitoterápicos.

**Palavras-Chave:** Perfil químico. Flavonoides. CLAE-DAD.

### **Agradecimentos**

À CAPES e à FAPESB pelo apoio financeiro.

### **Referências Bibliográficas**

CAMPOS, R.O.P; SANTOS, A.R.S; VAZ, Z.R. Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract and preliminary study of a xanthone isolated from *Polygala cyparissias* (Polygalaceae). **Life Sciences**, v.61, p.1619–1630, 1997.

FERREIRA, M.A. **Perfil cromatográfico das substâncias fenólicas presentes em extratos de mel de assa peixe e avaliação de seu poder antioxidante**. 2010. 77 p. Monografia (Curso de graduação em Química) – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

FURNESS, S H.; STAFFORD, P. J. The Northwest European Pollen Flora, 55 Polygalaceae. **Review of Palaeobotany and Palynology**, 88, p. 61-82, 1995.

JABERIAN, H.; PIRI, K.; NAZARI, J. Phytochemical composition and *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of some medicinal plants. **Food Chemistry**, v.136, p. 237-244, 2013.

LAPA, F. R. **Avaliação da Atividade Antinociceptiva, Antiinflamatória e Protetora Gástrica do Extrato Hidroalcoólico Bruto da *Polygala paniculata* L.** 2006. 119 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

LAPA, F. R. et al. Antinociceptive Properties of the Hydroalcoholic Extract and the Flavonoid Rutin Obtained from *Polygala paniculata* L. in Mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 104, p. 306–315, 2009.

LAPA, F.R.; GADOTTI, V.M.; MISSAU, F.C.; PIZZOLATTI, M.G.; MARQUES, M.C.A; DAFRÉ, A.L.; FARINA, M., RODRIGUES, A.L.S.; SANTOS, A.R.S. Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract and the flavonoid rutin obtained from *Polygala paniculata* L. in mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicolog.** v.104, p. 206-315, 2006.

MARQUES, M. C. M.; PASTORE, J. F. B. Duas espécies novas de *Polygala* L. (Polygalaceae) para o Brasil. **Rodriguésia**, 57, p. 99-102, 2006.

MENDES, B.G. ***Polygala sabulosa* A. W. Bennett: obtenção de estilpironas e cumarinas, preparo de análogos e ensaios de atividades biológicas**. Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, Brasil. (2008).

MEOTTI, F.C.; ARDENGHI, J.V.; PRETTO, J.B.; SOUZA, M.M.; D'AVILA MOURA J; JUNIOR, A.C.; SOLDI, C.; PIZZOLATTI, M.G.; SANTOS, A.R. Antinociceptive properties of coumarins, steroid and dihydrostyryl-2-pyrone from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice. **J Pharm Pharmacol**. v.58, p.107-12, 2006.

OLIVEIRA, T.S. **Avaliação da composição química e atividade antioxidante do fruto e da bebida alcoólica fermentada de Jamelão (*Syzygium cumini* Lamark)**. Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, Brasil. (2009).

PASTORE, J.F.B.; ABBOTT, J.R. Taxonomic notes and new combinations for *Asemeia* (Polygalaceae). **Kew bulletin**. v. 67, p. 801-813, 2012.

POTHITIRAT, W.; CHOMNAWANG, M.T.; SUPABPHOL, R.; GRITSANAPAN, W. Comparison of bioactive compounds content, free radical scavenging and anti-acne inducing bacteria activities of extracts from the mangosteen fruit rind at two stages of maturity. **Fitoterapia**. v. 80, p. 442–447, 2009.

ROCHA, J. L. C. **Validação de Metodologia analítica para quantificação de salicilato de metila por CLAE-DAD em *Polygala decumbens* (Polygalaceae) ocorrente na caatinga**. 2009. 63 f. Monografia (Curso de Ciências Farmacêuticas), Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, 2009.

ROCHA, J.L.C.; PASTORE, J.F.B.; BRANDÃO, H.N.; AZEREDO, A.; DAVID, J.P.; SANTOS, E.O.; DAVID, J.M. Quantificação de salicilato de metila em quatro gêneros de Polygalaceae por CLAE-DAD. **Química Nova**, v.35, n.11, p. 2263-2266, 2012.

VILLA, C. et al. High-Performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of 24 fragrance allergens to study scented products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 44, p. 755-762, 2007.

**DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE (+)-CATEQUINA EM  
EXTRATOS DE *Vitis* SPP. POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDOS  
DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE ARRANJO DE  
DIODOS (CLAE-DAD)**

# DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE (+)-CATEQUINA EM EXTRATOS DE *VITIS* SPP. POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDOS DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS (CLAE-DAD).

Pesquisa institucional desenvolvida na Universidade Estadual de Feira de Santana, pertencente ao grupo de pesquisa "Estudos Químicos e Atividades Biológicas em Produtos Naturais". Projeto de iniciação científica.

**Caroline Issler Rodrigues<sup>1</sup>; José Luiz Carneiro da rocha<sup>2</sup>; Hugo Neves Brandão<sup>3</sup>; Bruna Aparecida Souza Machado<sup>4</sup>; Roseane Santos Oliveira<sup>5</sup>; Carlos Antônio Borges Cohim Silva<sup>6</sup>.**

1. Bolsista FAPESB, Graduanda em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [carolissler\\_182@hotmail.com](mailto:carolissler_182@hotmail.com)
2. Bolsista FAPESB, Doutorando em Recursos Genéticos Vegetais. Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [luz\\_farmaco@hotmail.com](mailto:luz_farmaco@hotmail.com)
3. Professor do departamento de Saúde da universidade Estadual de Feira de Santana. Doutor em Química pela Universidade Federal da Bahia. Orientador, e-mail: [hugo@uefs.br](mailto:hugo@uefs.br)
4. Doutoranda em Biotecnologia. Professor Assistente, Faculdade de Tecnologia SENAI/CIMATEC, e-mail: [brunam@fieb.org.br](mailto:brunam@fieb.org.br)
5. Mestre em Ciências de Alimentos. Bolsista CNPq, Faculdade de Tecnologia SENAI/CIMATEC, e-mail: [roseane.s@fbest.org.br](mailto:roseane.s@fbest.org.br)
6. Director of Research, Consulado do Vale, Petrolina/PE – Brasil, [consuladodovale@gmail.com](mailto:consuladodovale@gmail.com)

## INTRODUÇÃO

Durante longos períodos na história o uso de plantas esteve presente, não só devido ao seu caráter alimentar, mas também às suas propriedades de cura. A utilização da flora com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da espécie humana. (SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010; VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

A procura da humanidade por meios que levem a uma vida mais saudável tem impulsionado pesquisas por novas substâncias capazes de satisfazer tais necessidades (SAUTTER *et al*, 2005). Contudo, grande parte das preparações que utilizam plantas medicinais ainda necessita de estudos científicos mais detalhados, incluindo padronização química. Os dados de segurança e eficácia estão disponíveis para um número ainda menor de vegetais, seus extratos e ingredientes ativos e as preparações que as contenham. (SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010).

A Vitaceae, família de planta amplamente utilizada, é bem conhecida economicamente por originar as uvas, vinho e passas (especialmente *Vitis vinifera* e outras espécies e híbridos de *Vitis*). A família de uva consiste em 14 gêneros e cerca de 900 espécies, sendo que cada espécie possui diferentes variedades denominadas cepas ou castas, distribuídas principalmente em regiões tropicais da Ásia, África, Austrália, região neotropical e as ilhas do Pacífico. (SOEJIMA; WEN, 2006).

A viticultura brasileira desenvolve-se com base em uvas americanas, principalmente da espécie *Vitis labrusca*, representando mais de 80% do volume total produzido no país. (CAMARGO, 2005; PROTAS, 2005). Outra cultivar presente é a *Vitis vinifera*, casta europeia de uvas finas. De acordo com Manfroi (2007), atualmente do total de uva produzido no Rio Grande do Sul, cerca de 20% são provenientes da *Vitis*

*vinifera*.

Além da própria fruta a uva possui diversos produtos de interesse. O bagaço da uva, por exemplo, é um subproduto da vinificação que é desprezado na natureza, porém diversos estudos já comprovam a sua atividade no combate a doenças, principalmente por ter a capacidade de manter compostos fenólicos presentes no seu fruto, como flavonoides e outros (ANGELO; GARMOS; BEZERRA, 2010; SILVA, 2010).

O aproveitamento de diversos subprodutos poderia representar um avanço significativo na manutenção do equilíbrio do meio ambiente da indústria, pois permite a diminuição dos custos da produção e o aumento do aproveitamento total do alimento, além disso, possibilita a redução do impacto que esses subprodutos podem causar ao serem descartados no ambiente (ANGELO; GARMOS; BEZERRA, 2010; ROCKENBACH, 2012).

Assim, alimentos que podem atuar frente a doenças e na sua prevenção são de grande contribuição para garantir uma vida mais saudável à sociedade, fato este que os torna um objetivo de estudo em comum entre a indústria alimentícia e farmacêutica (SILVA, 2010). Sendo a uva um desses alimentos devido a sua riqueza de compostos produzidos no metabolismo secundário da mesma.

O conjunto de reações químicas que continuamente estão ocorrendo em cada célula é denominado metabolismo e os produtos produzidos pelos vegetais através do mesmo podem ser divididos em dois grandes grupos. Os primeiros, essenciais a todos os seres vivos, são os metabólitos primários ou macromoléculas, como lipídeos, protéidos e glicídeos, com funções vitais bem definidas. Já o segundo grupo, metabólitos secundários, diferentes do primeiro, são substâncias características de determinadas espécies, gêneros ou famílias, encontrados em concentrações relativamente baixas e que apresentam estrutura complexa e marcante atividade biológica. (POSER; MENTZ, 2000; SANTOS, 2000).

A grande diversidade desses compostos entre as cultivares resulta em uvas com diferentes características de sabor e de coloração, as quais estão associadas ao conteúdo e ao perfil dos polifenólicos. A presença ou ausência de antocianinas, por exemplo, são os grandes responsáveis pelas diferenças entre uvas ou vinhos tintos e brancos, dessa forma, uvas de coloração escura apresentaram maior conteúdo de compostos fenólicos e capacidade antioxidante, assim quanto mais forte a coloração da uva, mais interessante esta se torna do ponto de vista funcional. Percebe-se então como é importante conhecer os teores de compostos fenólicos das mesmas, por se tratarem da matéria-prima para a produção de vinhos e sucos, podendo influenciar a qualidade dos produtos finais (ABE *et al*, 2007; CABRITA; RICARDO-DASILVA; LAUREANO, 2003).

Os principais compostos fenólicos responsáveis pelo sabor e adstringência de vinhos e sucos de uva são as catequinas e epicatequinas, presentes principalmente em sementes de uvas. Além disso, a Quercetina, caempferol e miricetina, que estão presentes em menor quantidade, possuem importante papel no desenvolvimento da coloração do vinho, atuando como co-pigmentos junto às antocianinas. Um dos principais compostos das uvas brancas, os ácidos fenólicos, também são

usualmente encontrados em baixas concentrações e são responsáveis pelo aroma e gosto dos vinhos. Além dessas características organolépticas, esses compostos contribuem para aumentar as propriedades benéficas das uvas e de seus produtos (ABE *et al*, 2007).

Os fenólicos consistem em produtos do metabolismo secundário das plantas, amplamente distribuídos nas mesmas e é um termo que engloba todas as substâncias de núcleo fenólico, ou seja, compostos que contenham pelo menos um anel aromático, no qual, ao menos, um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila. Aqueles que contem múltiplos anéis fenólicos em sua estrutura são chamados de polifenólicos, como por exemplo, os flavonoides e taninos (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2000; SILVA, 2010). Sendo a catequina um exemplo de flavonoide.

Os fenólicos contribuem para o sabor, odor e coloração de diversos vegetais, sendo muitos desses economicamente importantes para utilização como flavorizantes e corantes de alimentos e bebidas. As propriedades biológicas e reatividade dos fenólicos estão relacionadas com a atividade antioxidante exercida por uma característica estrutural comum a todos eles, sendo a forma mais simples destes compostos, que é a presença de um anel aromático hidroxilado (fenol), de onde deriva o nome dessa classe (CABRITA; RICARDO-DA-SILVA; LAUREANO, 2003; CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2000; DIAS, 2009).

Nas uvas, os fenólicos distribuem-se de modo desigual pelas diversas partes do fruto. Nas grainhas, por exemplo, encontram-se flavanóis e ácido gálico; na polpa, ácidos hidroxicinamil tartáricos; nos vasos fibrovasculares os principais são flavanóis e ácidos fenólicos do tipo benzóico; e na película pode se encontrar todos os anteriores e ainda flavonóis e antocianinas (CABRITA; RICARDO-DA-SILVA; LAUREANO, 2003).

Portanto, quantificar componentes em produtos naturais não é uma tarefa fácil de ser realizada, devido principalmente à diversidade de estruturas químicas presentes na planta. Contudo, o avanço tecnológico de técnicas analíticas, sobretudo das hifenadas, permitiu um avanço importante na elucidação de composições químicas complexas dos produtos de origem vegetal, com níveis de sensibilidade e seletividade impensáveis até poucos anos atrás. Essas técnicas possibilitam o estudo do extrato vegetal bruto, sem a necessidade do exaustivo trabalho de isolamento (RODRIGUES *et al*, 2006).

Os métodos cromatográficos são os procedimentos de separação, isolamento, identificação e análise de misturas e substâncias isoladas mais utilizados no período atual (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2000). Segundo Aquino Neto e Nunes (2003), atualmente, cerca de 70% da química analítica realizada são de diferentes modalidades de cromatografia. O grande desenvolvimento desse método se deve a alta sensibilidade, velocidade, exatidão e simplicidade para separação, identificação e determinação de substâncias do mesmo.

A cromatografia a líquidos de alta eficiência com o detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) possibilita a identificação de compostos conhecidos, através da comparação do tempo de retenção e espectro UV com o padrão analítico. É uma



técnica amplamente utilizada na análise de produtos naturais desde que o analito apresente grupos cromóforos que propiciem a absorção de luz na região de UV-visível (RODRIGUES *et al*, 2006).

Considerando-se a grande variedade de compostos bioativos das uvas, justifica-se o presente trabalho pela importância em quantificar os compostos fenólicos de importância da mesma, como a catequina, contribuindo com a quimiosistemática das espécies e possibilitando o desenvolvimento futuro de novos produtos farmacêuticos derivados da fruta.

Dessa forma, os objetivos da pesquisa desenvolvida são quantificar o composto fenólico (+)-catequina em diferentes castas de uva e seus subprodutos da vinificação por Cromatografia a Líquidos de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD); avaliar comparativamente as amostras analisadas quanto aos teores da (+)-catequina; e contribuir com a quimiosistemática das espécies de uvas analisadas.

## METODOLOGIA

As análises desse estudo foram realizadas no Laboratório de Bioprospecção Vegetal da Universidade Estadual de Feira de Santana e as etapas desenvolvidas nessa fase foram: Extração das uvas e seus subprodutos; Preparo das amostras para HPLC; e Análises cromatográficas;

Os extratos foram obtidos em parceria com o SENAI-CIMATEC de Salvador e realizado a partir de diferentes castas de uva e de resíduos de engajo, cascas e sementes do fruto não utilizados na produção de sucos de uva do Vale do Rio São Francisco. As amostras analisadas consistiram em extrato de: uva Violeta, uva Syrah, uva Isabel (propriedade Fazenda Palmeiron), uva Isabel (propriedade Fazenda Coana), uva Cora, uva Itália, uva Mounvedre, resíduo total das uvas Cora + Isabel, resíduo total da uva Syrah, resíduo apenas da casca das uvas Cora + Isabel e resíduo apenas casca da uva Syrah.

O preparo do extrato foi realizado no SENAI-CIMATEC e para as amostras de uva inicialmente foi feita trituração das cascas com etanol, seguida de agitação em equipamento Shaker. Depois a mistura foi colocada em banho de ultrassom e submetida à filtração em filtro de nylon. Fez-se uma destilação em rotaevaporador e o material concentrado foi levado à estufa até secagem.

Na metodologia para o preparo da amostra, adaptada a partir do trabalho de Dias (2009), foi pesado 50 mg do extrato seco e diluído em 10 ml de água destilada. A mistura foi acidificada com ácido clorídrico para pH 2,0; 5 mL de acetato de etila foram acrescentados, e então agitou-se por 20 minutos em agitador automático (Phoenix AP 56). Em seguida, o sobrenadante foi retirado e evaporado na capela. Mais 5 mL de acetato de etila foram adicionados à amostra para ser agitada por mais 20 minutos em agitador automático. Após as duas extrações, o volume orgânico recuperado foi submetido à secagem em capela. O resíduo desse frasco foi então avolumado com 1 mL de ácido acético 0,7% + acetonitrila (2:8) (representando a fase móvel orgânica) e filtrado com filtro de membrana de ester de celulose 0,45 µm (Micropore®) para então ser injetado no CLAE-DAD. Este procedimento foi realizado para melhor separação do composto de interesse dos demais presentes

no extrato.

As quantificações do composto fenólico envolveram o uso de padrão de (+)-catequina da Sigma-Aldrich® e para as análises em HPLC foram usados solventes de grau cromatográfico de pureza (Merck® e Vetec®) e água purificada em sistema Milli-Q.

As determinações cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo em fase líquida de alta eficiência Varian, consistindo de bomba Varian Polaris, detector de arranjo de diodo (DAD) Varian ProStar e injetor manual. A separação cromatográfica foi realizada por meio de coluna LiChroCART Purospher StaR® RP18-e (250 mm x 4,6 mm i.d.) (5 µm) (Merck, Darmstadt, Germany) combinado com pre-coluna LiChroCART 4-4 LiChrospher 100RP18 (5µm) da Merck®.

As condições de análise foram com gradiente de eluição conduzido com fase móvel de solução de ácido acético 0,7% (fase aquosa) e solução de ácido acético 0,7% com acetonitrila (MeCN) na proporção 8:2 v/v (fase orgânica), em diferentes proporções de acordo com a tabela 1. O volume de injeção foi de 20 µL. O equipamento foi operado à temperatura ambiente (25 ± 2°C) e o método utilizado foi adaptado de Cíková e colaboradores (2008).

Tabela 1 - Método cromatográfico

Tempo (min)	Fluxo (ml/min)	Ácido Acético %	Ácido Acético + MeCN %
0:00	1,0	95	5
1:00	1,0	95	5
5:00	1,0	90	10
12:00	1,0	83	17
19:32	1,0	56,6	43,4
19:55	1,0	55,3	44,7
30:00	1,0	20	80
30:01	1,0	0	100
35:00	1,0	0	100
38:00	1,0	95	5
41:00	1,0	95	5

Fonte: Autora

A leitura do detector de arranjo de diodo foi na faixa de 220 a 400 nm e a aquisição cromatográfica definida em 280 nm. A identificação do composto foi conduzida pela comparação dos tempos de retenção e do gráfico de absorvância no ultravioleta com o padrão, aliado aos dados de literatura.

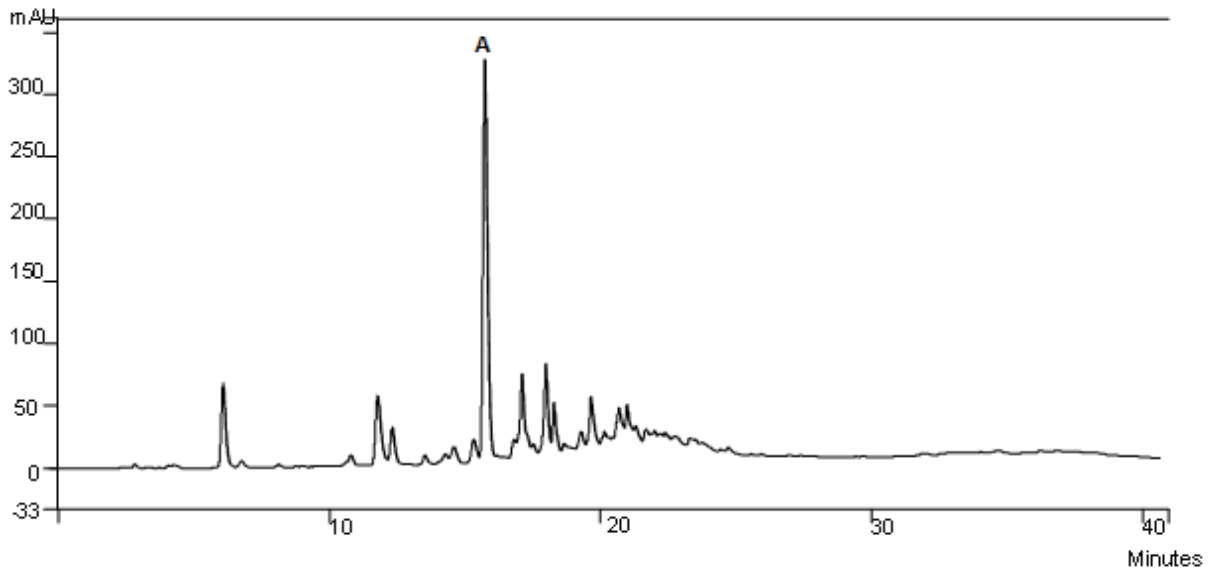
A quantificação do padrão identificado em cada amostra foi feita por correlações das curvas de calibração com o padrão através de injeções triplicatas seguindo os métodos anteriores de análise.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da comparação com os tempos de retenção e dos espectros de Ultravioleta

(UV) do padrão e das amostras realizou-se a análise qualitativa do extrato das uvas e seus subprodutos, identificando a presença da (+)-catequina em seis amostras analisadas, com um tempo de retenção de 16 minutos para o padrão e para as amostras de 15,8 minutos. A Figura 1 apresenta o cromatograma ilustrativo para as amostras.

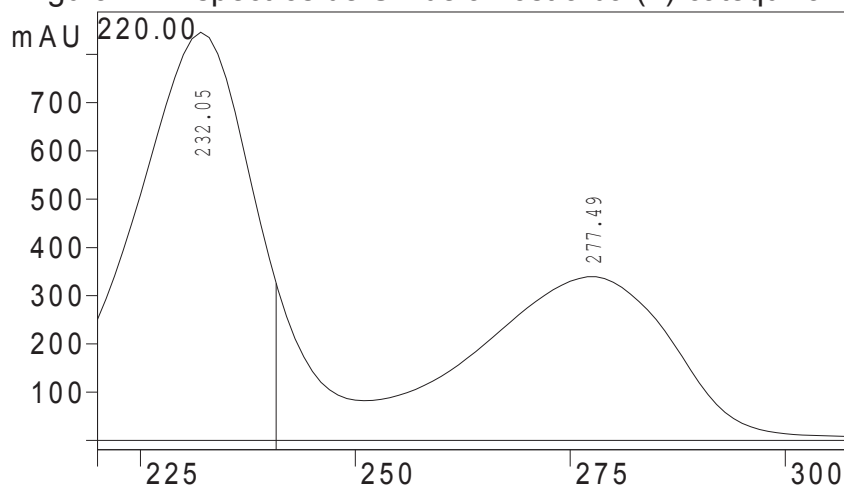
Figura 1 - Cromatograma ilustrativo de amostra a 280 nm em CLAE. (A) (+)-Catequina



Fonte: Autora

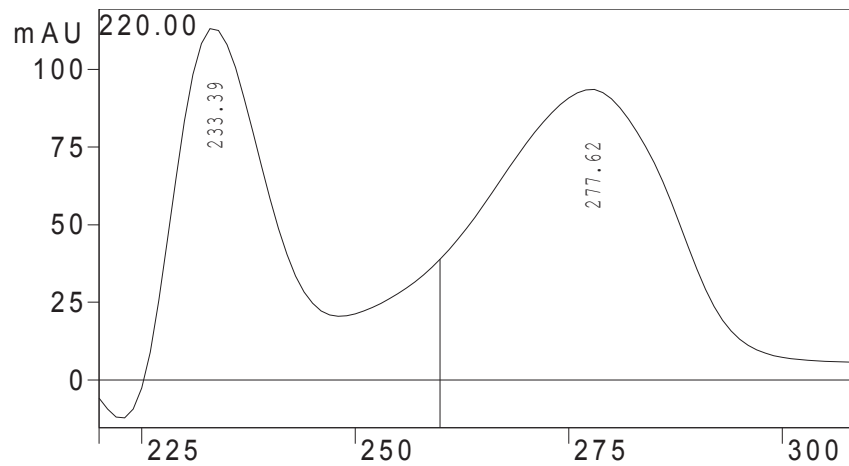
A pequena diferença apresentada no tempo de retenção do pico A da amostra com o padrão de (+)-catequina pode ser explicada pelo efeito matriz que ocorre devido à complexidade das amostras, porém pode-se comprovar que esse pico é correspondente através dos espectros de UV-VIS, comparados na figura 2 e 3, além de fortificação das amostras com o padrão.

Figura 2 – Espectros de UV de amostra da (+)-catequina



Fonte: Autora

Figura 3 – Espectros de UV do padrão da (+)-catequina

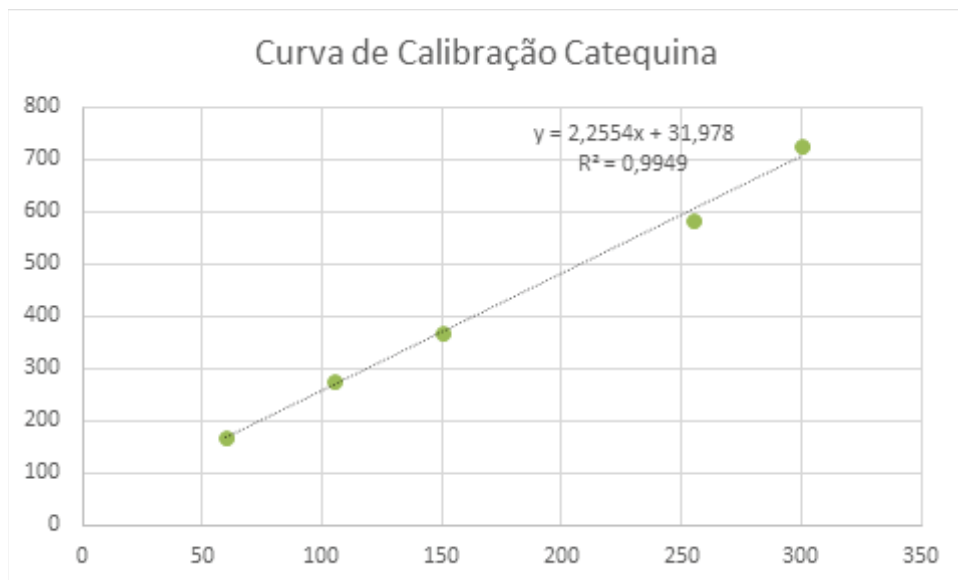


Fonte: Autora

A quantificação do composto fenólico foi obtida através das equações das retas, geradas pela regressão linear das curvas analíticas do padrão, através de soluções com cinco concentrações na faixa de 60 e 300  $\mu\text{g/mL}$  do padrão da (+)-Catequina.

A curva de calibração, que é necessária para que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito, permitindo a quantificação dos compostos, pode ser visualizada na figura 4.

Figura 4 - Curva de calibração da (+)-Catequina.



Fonte: Autora

Assim, a quantificação da (+)-catequina foi determinada pela média ( $n=3$ ) das áreas dos picos das amostras analisadas. O resultado pode observado na tabela 2.

Tabela 2. Quantificação da (+)-catequina nas amostras de uva e seus produtos

Amostras	Catequina ( $\mu\text{g/ml}$ )
Uva Violeta	1594,85
Uva Cora	-
Uva Itália	<
Uva Mounvedre	<
Uva Isabel (propriedade Fazenda Palmeiron)	-
Uva Isabel (propriedade Fazenda Coana)	-
Uva Syrah	-
Resíduo total de uva Cora + Isabel	295,30
Resíduo total de uva Syrah	<
Resíduo da casa da uva Cora + Isabel	-
Resíduo da casa da uva Syrah	75,38

(-) Resultados abaixo do limite de detecção e (<) Resultados abaixo do limite de quantificação e fora da faixa de variação da curva analítica

A partir da quantificação, percebe-se que os teores da (+)-catequina variam entre as cultivares. Sendo a uva violeta a que demonstrou maior teor de (+)-catequina.

Essas quantidades variam também conforme a parte da uva analisada. No estudo feito por Silva (2010), por exemplo, verificou-se que o teor de polifenóis encontrado no bagaço total da uva (casca, semente e engaço) foi de aproximadamente 95 vezes maior do que o encontrado apenas na casca da mesma uva. Isso pode ser justificado pelo fato de que tanto sementes como engaço possuem altos teores de polifenólicos, incrementando assim o teor do bagaço total.

Essa relação pode ser verificada no presente trabalho na quantidade de (+)-catequina encontrada no resíduo total das uvas Cora + Isabel (295,31  $\mu\text{g/ml}$ ) enquanto que a quantidade encontrada apenas na casca da mesma uva estava abaixo do limite de detecção. Já nos resíduos da uva Syrah o resultado foi o inverso.

Esses resultados corroboram com o alto potencial de uso dos subprodutos da vinificação como alimentos funcionais. Outro trabalho que demonstra isso é um estudo realizado por Ishimoto (2008) de determinação do efeito hipolipemiante e antioxidante de subprodutos da uva em hamsters, no qual dentre os seus resultados conclui que os subprodutos das uvas analisadas são eficazes na redução de lipídeos no plasma de hamsters.

Das uvas analisadas, a única que foi possível detectar e quantificar a (+)-catequina foi a uva Violeta. Não foram encontrados trabalhos quantitativos e/ou qualitativos na literatura pesquisada que descrevam o composto nessa uva. Um dos possíveis motivos para a falta de caracterização dessa casta é que a mesma é relativamente nova, foi obtida a partir de cruzamento 'BRS Rúbea' x 'IAC 1398-21', realizado na Embrapa Uva e Vinho, em Bento Gonçalves, RS, em 1999 (CAMARGO; MAIA; NACHTIGAL, 2005), sendo por isso ainda pouco cultivada e, conseqüentemente, estudada no país.

## CONCLUSÕES

O trabalho realizado é inovador na área, pois durante a pesquisa bibliográfica não foram encontrados trabalhos com quantificação de compostos fenólicos em muitas das castas pesquisadas. Das onze amostras analisadas é possível detectar a presença da (+)-catequina em seis amostras. Sendo três amostras de uva e três dos seus subprodutos da vinificação. Essa quantificação contribui com a quimio sistemática da planta e permite que novos estudos possam ser desenvolvidos em torno dessas espécies. Além disso, demonstra que a técnica de CLAE-DAD é útil para detectar e quantificar a (+)-catequina de forma rápida e eficaz.

## PALAVRAS-CHAVE

Quantificação; (+)-catequina; *Vitis* spp.; CLAE-DAD.

## AGRADECIMENTOS

À FAPESB pelo apoio financeiro. E ao SENAI-CIMATEC pela parceria.

## REFERÊNCIAS

- ABE, L. T.; *et al.* Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, p. 394-400, 2007.
- ANGELO, M. A.; GARMOS, T. T.; BEZERRA, J. R. M. V. Elaboração de biscoitos com adição de farinha de resíduo agroindustrial da produção de vinho. In: ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 19., 2010, Guarapuava. **Anais...** Guarapuava: UNICENTRO, 2010.
- AQUINO NETO, F. R.; NUNES, D. S. S. **Cromatografia**: princípios básicos e técnicas afins. Rio de Janeiro: Interciência, 2003.
- BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, p. 229-239, 2010.
- CABRITA, M. J.; RICARDO-DA-SILVA, J.; LAUREANO, O. Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE VITIVINICULTURA, 1., Lisboa, 2003. **Anais...** Lisboa: Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, 2003. p. 61.
- CAMARGO, U. A. Suco de uva: matéria-prima para produtos de qualidade e competitividade. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 10., 2005, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e vinho, 2005. p. 195.
- CAMARGO, U. A.; MAIA, J. D. O.; NACHTIGAL, J. C. **BRS Violeta** - Nova cultivar de uva para suco e vinho de mesa. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2005. p. 7 (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico, 63).
- CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 2. ed. rev Porto Alegre: Florianópolis: Ed. da UFRGS Ed. da UFSC, 2000. cap. 20.
- CÍCHOVÁ, M., *et al.* Influence of Tannin Addition on the Content and Composition of Polyphenolic compounds in Wines. *Czech Journal Food Sciences*, Praga, v. 26, p. S33–S38, 2008.
- DIAS, J. F. Determinação dos conteúdos de resveratrol em vinhos tintos de duas regiões brasileiras. 2009. 100 f. **Dissertação** (mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.



FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução a análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 2. ed. rev Porto Alegre: Florianópolis: Ed. da UFRGS; Ed. da UFSC, 2000. cap. 10.

ISHIMOTO, E. Y. Efeito hipolipemiante e antioxidante de subprodutos da uva em hamsters. 2008. 195 f. **Tese** (Doutorado em Saúde Pública) - Universidade de São Paulo, São Paulo. 2008.

MANFROI, V. Taninos enológicos e goma arábica na composição e qualidade sensorial do vinho cabernet sauvignon. 2007. 133 f. **Tese** (Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2007.

POSER, G. L. V.; MENTZ, L. A. Diversidade biológica e sistemas de classificação. In: SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 2. ed. rev Porto Alegre: Florianópolis: Ed. da UFRGS Ed. da UFSC, 2000. cap. 4.

PROTAS, J. F. da S. Aspectos atuais e perspectivas da vitivinicultura brasileira. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 10., 2005, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e vinho, 2005. p. 105.

ROCKENBACH, I. I. Caracterização fenólica e antioxidante de subprodutos da vinificação. 2012. 112 f. **Tese** (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

RODRIGUES, M. V. N. *et al.* O emprego de técnicas hífenadas no estudo de plantas medicinais. **Multiciência**, Campinas, v. 7, p. 98-111, 2006.

SANTOS, R. I. dos. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 2. ed. rev Porto Alegre: Florianópolis: Ed. da UFRGS Ed. da UFSC, 2000. cap. 16.

SAUTTER, C. K. *et al.* Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, p. 437-442, 2005.

SILVA, A. D. F. da. Análise de compostos fenólicos e potencial antioxidante de amostras comerciais de sucos de uva e produtos derivados de uvas vinícolas. 2010. 103 f. **Dissertação** (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

SOEJIMA, A.; WEN, J. Phylogenetic analysis of the grape family (vitaceae) based on three chloroplast markers. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 93, p. 278–287, 2006.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 20, p. 435-440, 2010.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, São Paulo, v. 28, p. 519-528, 2005.

**EFEITO DO OSMOCONDICIONAMENTO NAS SEMENTES E DO PERÍODO DE COLHEITA DE *Physalis angulata* L. NO TEOR DE FISALINAS EM EXTRATO ETANÓLICO DAS PARTES AÉREAS**

EFEITO DO OSMOCONDICIONAMENTO NAS SEMENTES E DO PERÍODO DE COLHEITA DE *Physalis angulata* L. NO TEOR DE FISALINAS EM EXTRATO ETANÓLICO DAS PARTES AÉREAS<sup>1</sup>

Cíntia Luiza Mascarenhas de Souza<sup>2</sup>; Manuela Oliveira de Souza<sup>3</sup>; Claudinéia Regina Pelacani<sup>4</sup>; Marcio Soares<sup>5</sup>; José Luiz Mazzei<sup>6</sup>; Conceição Pereira Rodrigues<sup>5</sup>; Deise Cristina Drummond Xavier Paes Lopes<sup>5</sup>; Therezinha Coelho Barbosa Tomassini<sup>6</sup>.

---

<sup>1</sup> Pesquisa Institucional desenvolvida na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Bahia e no Laboratório de Química de Produtos Naturais de Manguinhos. Fiocruz, Rio de Janeiro.

<sup>2</sup> Doutora em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) BR 116, km 03, CEP 4403-460, Feira de Santana, BA. [timluiza@gmail.com](mailto:timluiza@gmail.com)

<sup>3</sup> Professora da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. (UFRB), Rua Rui Barbosa, 710, Centro, CEP: 44380-000 Cruz das Almas, BA. [manuelasouza@ufrb.edu.br](mailto:manuelasouza@ufrb.edu.br)

<sup>4</sup> Professora do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). BR 116, km 03, CEP 4403-460, Feira de Santana, BA. [claudineiapelacani@gmail.com](mailto:claudineiapelacani@gmail.com)

<sup>5</sup> Técnicos do Laboratório de Química de Produtos Naturais, PMA e PN2, Farmanguinhos/Fiocruz, Sizenando Nabuco 100, CEP 21041-250. Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ. [msoares@far.fiocruz.br](mailto:msoares@far.fiocruz.br); [compero@far.fiocruz.br](mailto:compero@far.fiocruz.br); [deise\\_xa@far.fiocruz.br](mailto:deise_xa@far.fiocruz.br).

<sup>6</sup> Pesquisadores do Laboratório de Química de Produtos Naturais, PMA e PN2, Farmanguinhos-Fiocruz, Sizenando Nabuco 100, CEP 21041-250. Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ. [mazzei@pq.cnpq.br](mailto:mazzei@pq.cnpq.br); [tomassini@far.fiocruz.br](mailto:tomassini@far.fiocruz.br).

## Resumo

Os seco-esteróides (fisalinas D, F, G e B) extraídos de *Physalis angulata* L. apresentam atividades biológicas já descritas na literatura. O presente trabalho avaliou através de cromatografia líquida de alta resolução os extratos etanólicos das partes aéreas das plantas provenientes de sementes submetidas ao osmocondicionamento em solução de polietilenoglicol (PEG 6000) e coletadas nas suas fenofases distintas (vegetativas e reprodutiva). Os resultados obtidos demonstraram o aumento de até três vezes nos teores das fisalinas D, F e B na fase reprodutiva. Em sistemas de cultivo, os dados obtidos nesse estudo poderão auxiliar na tomada de decisões futuras, quanto à fase de desenvolvimento para a colheita desta planta com finalidades farmacológicas ou de aproveitamento dos princípios ativos.

Palavras-Chave: cultivo, fenofases, seco-esteróides, Solanaceae.

## Introdução

*Physalis angulata* L. (Solanaceae) é uma espécie herbácea, perene, conhecida popularmente como camapú e encontrada mundialmente em zonas tropicais e subtropicais (Figura 1). É uma planta com grande potencial biotecnológico não apenas pelas atividades biológicas comprovadas (SOARES *et al.*, 2006; DAMU *et al.*, 2007; GUIMARÃES *et al.*, 2009), como pela sua tolerância a alguns estresses abióticos (Souza *et al.* 2011; Souza *et al.* 2013).

Seus extratos apresentam atividades farmacológicas, sendo as de imunomodulação, moluscicida (TOMASSINI *et al.*, 2003), antimalárica (SÁ, 2011) e leishmanicida (NOGUEIRA *et al.*, 2013) associadas a um grupo de substâncias derivadas do ergostano, denominadas fisalinas, mais particularmente às fisalinas F, B, D e G (Figura 2).

O aumento do teor de seco-esteróides (fisalinas) no caule e nas folhas de *P. angulata*, induzido pelo cultivo sob estresse salino e restrição hídrica, foi levemente incrementado quando as sementes originárias foram previamente submetidas ao osmocondicionamento em solução de polietilenoglicol 6000 (PEG6000) (SOUZA *et al.*, 2013).

O osmocondicionamento é um tratamento pré-germinativo que vêm sendo utilizado para melhoria da qualidade de sementes e estabelecimento de plântulas de espécies cultivadas, referindo-se ao termo *priming*, envigoramento ou condicionamento fisiológico (HEYDECKER & COOLBEAR, 1977; ROBERTS & ELLIS, 1989; MARCOS FILHO, 2005). Esta técnica tem proporcionado sincronizadas e superiores taxas de germinação de sementes (HEYDECKER *et al.*, 1973; IQBAL & ASHRAF, 2007; VARIER *et al.*, 2010), além de aumentar taxas de emergência de plântulas (BRADFORD, 1986; FLORS *et al.*, 2007).

Não há até o momento, relatos na literatura quanto aos possíveis efeitos do osmocondicionamento das sementes nas fases posteriores de desenvolvimento das plântulas em *P. angulata*. Sobre a produção das fisalinas entre as fenofases da espécie ainda é necessário prosseguir-se com os trabalhos de investigações e pesquisas. Desse modo, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do osmocondicionamento de sementes e do período de colheita de *P. angulata* no que

se refere a composição de fisalinas, buscando aumentar em sistemas de cultivos, a produção daqueles princípios ativos.



Figura 1: *Physalis angulata* na fase reprodutiva (A) e detalhe da flor (B), 40 dias após a semeadura em campo. Local: Feira de Santana, Bahia, 2009.

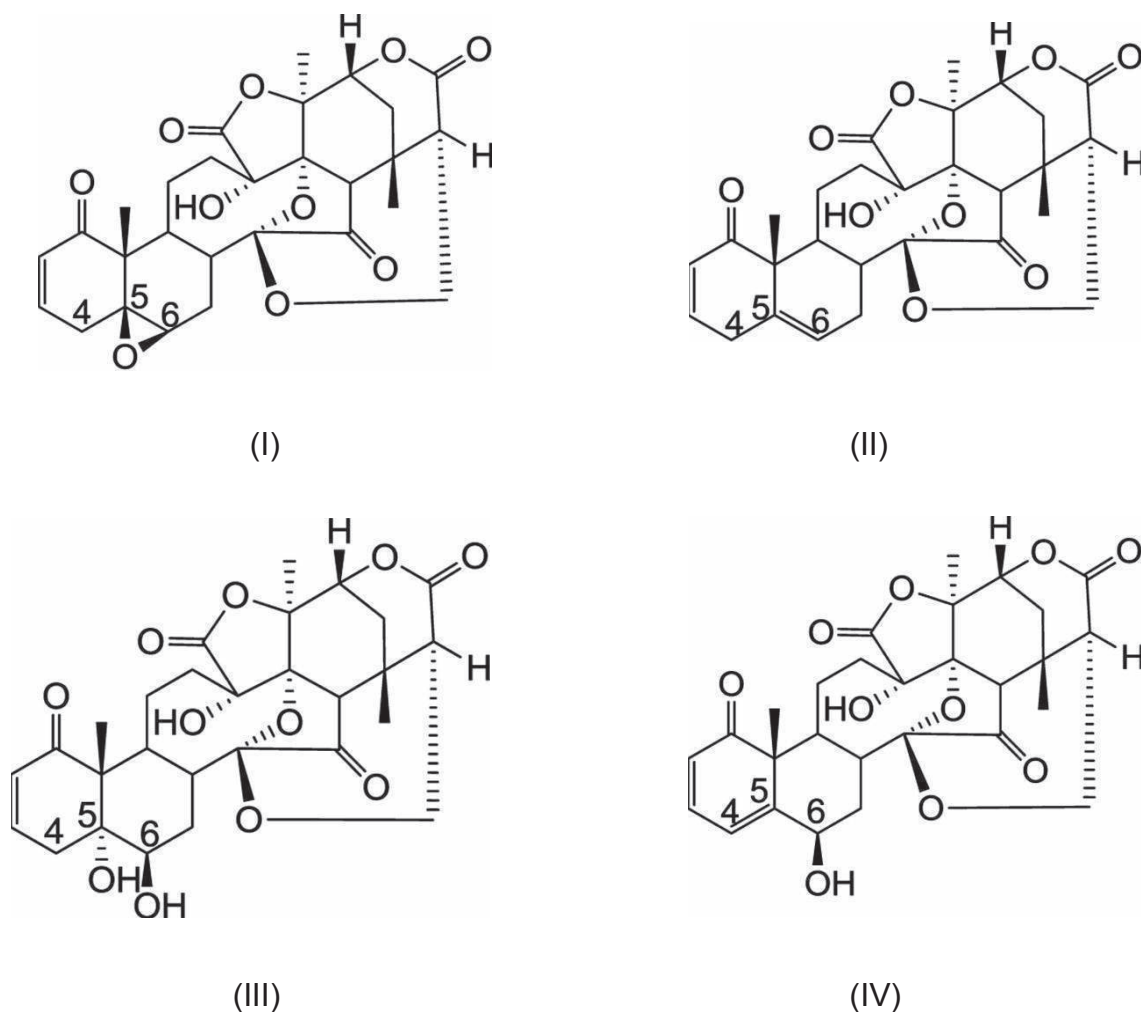


Figura 2: Fisalinas bioativas isoladas de *Physalis angulata*: (I) F = 5 $\beta$ , 6 $\beta$ -epoxi; (II) B =  $\Delta^{4,5}$ ; (III) D = 5 $\alpha$ -OH, 6 $\beta$ -OH e (IV) G =  $\Delta^{4,5}$ , 6 $\beta$ -OH (SOARES et al., 2003).

## Material e Métodos

As sementes de *P. angulata* foram condicionadas em solução aerada de polietilenoglicol (PEG 6000; VILELA *et al.*, 1991) apresentando potencial osmótico de -1,2 MPa, previamente estabelecido como potencial de *priming* da espécie (SOUZA, 2009). As amostras de sementes foram colocadas em tubo de ensaio, contendo 25 ml de solução osmótica, conectado a um sistema de aeração artificial (bomba de aquário) e mantidas por 10 dias, em câmara de germinação (Eletrolab) a 35°C, ajustada para um fotoperíodo de 12 horas (SOUZA, 2009).

Após esse período as sementes foram semeadas em tubetes de polietileno com 500 g de substrato (3:1 plantmax/terra vegetal humificada), mantendo-as em estufa agrícola Van de Hoeven (40% de luminosidade) no Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana. Após emergência das plântulas, o desbaste foi realizado levando a uma plântula por vaso, separando em dois grupos



pelo condicionamento prévio (ou não) das sementes (Os e NOs, respectivamente). Irrigações diárias foram mantidas bem como a retirada de plantas invasoras. Para cada tratamento foram separados dois subgrupos, que foram colhidos após 30 (fase vegetativa, subgrupos Os 30 e Nos 30) e 40 dias (fase reprodutiva, Os 40 e Nos 40).

As partes aéreas foram secas por 8 dias, à 40°C e 50g foram extraídos com 200 mL de etanol em Soxhlet (6 horas cada etapa) por três vezes. Os extratos foram filtrados e secos em evaporador rotatório. A etapa de extração foi repetida com outra alíquota do material vegetal seco afim de observar a reprodutibilidade dos resultados. Os seco-esteróides foram determinados, em triplicata, a 225 nm tendo fisalina D como material de referência após resuspensão em metanol (33 mg/mL) aplicando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção de Arranjo de Diodos. Coluna Hibar LiChrospher 100 RP18 5 µm 250 x 4 mm, eluição gradiente a 1 mL/min e 30°C, de acetonitrila e solução aquosa 0,05% de ácido trifluoroacético (SOUZA *et al.*, 2013).

## Resultados e Discussão

Na Tabela 1 verificou-se o aumento ( $P < 0,05$ ), até cerca de três vezes, dos teores das fisalinas D, F e B entre a fase vegetativa (30 dias) e a reprodutiva (40 dias), demonstrando a acentuada influência desta última fenofase na biossíntese das fisalinas em *P. angulata*. No entanto, não ocorreu alteração do teor de fisalina G ( $P > 0,05$ ) na composição. A alta associação entre os teores das principais fisalinas excetuando a fisalina G em *P. angulata* adulta foi constatada anteriormente em caules e folhas sob condições de estresse salino e de restrição hídrica (SOUZA *et al.*, 2013).

Na Tabela 1 também observou-se a diminuição do teor de fisalina D na parte aérea de plantas em sua fase reprodutiva, quando estas foram originadas de sementes osmocondicionadas. O efeito do osmocondicionamento das sementes sobre a diminuição desta fisalina já havia sido observada nos caules das plantas adultas (SOUZA *et al.*, 2013). No entanto, verifica-se na Tabela 1 que este efeito só é detectado na fase reprodutiva, alcançando cerca de 25% de decréscimo ( $P < 0,05$ ). Os efeitos significativos observados na Tabela 1 foram comprovados nas duplicatas de extração.

Tabela 1: Teores (mg/g) em extrato etanólico de parte aérea de *P. angulata* colhidas em diferentes fases de desenvolvimento (vegetativa e reprodutiva) e originadas de sementes osmocondicionadas (Os) ou não condicionadas (NOs).

Seco-esteróides	Fases do desenvolvimento (cultivo)			
	Os		NOs	
	Vegetativa 30 dias	Reprodutiva 40 dias	Vegetativa 30 dias	Reprodutiva 40 dias
Fisalina D	9,5 ± 0,4	20,8 ± 0,5 <sup>a,b</sup>	8,9 ± 1,0	27,1 ± 1,3 <sup>a</sup>
Fisalina G	6,7 ± 0,3	5,9 ± 0,3	6,2 ± 0,7	7,7 ± 0,5
Fisalina F	7,2 ± 0,1	15,6 ± 0,6 <sup>a</sup>	6,0 ± 0,7	18,7 ± 2,0 <sup>a</sup>
Fisalina B	11,3 ± 0,3	37,4 ± 2,8 <sup>a</sup>	9,1 ± 0,9	35,5 ± 1,1 <sup>a</sup>

Diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) relativo <sup>a</sup> às plantas coletadas na fase vegetativa de desenvolvimento ou <sup>b</sup> nas plantas originadas de sementes não osmocondicionadas.

Ao comparar os sinais nos cromatogramas dos diferentes extratos (Figura 3), não se observou diferença significativa entre os de plantas originadas de sementes osmocondicionadas daquelas não condicionadas. No entanto, na fase reprodutiva (40 dias) percebe-se: (i) aumento de intensidade do sinal de tempo de retenção ( $t_R$ ) de 23,5 min, de substância não caracterizada; (ii) menor número e maior resolução de interferentes com  $t_R$  entre as fisalinas; e (iii) diminuição de intensidade de substâncias menos hidrofílicas, com sinais de  $t_R \geq 68$  min. Efeitos menores não foram considerados visto não serem comprovados nos extratos de outras alíquotas de material vegetal. A diminuição de interferentes menos hidrofílicos e o aumento de sinais bem resolvidos são indicativos da seletividade da biossíntese na fase reprodutiva, resultando em extratos menos complexos, com menor número de componentes principais e consequente aumento da pureza em fisalinas no extrato.

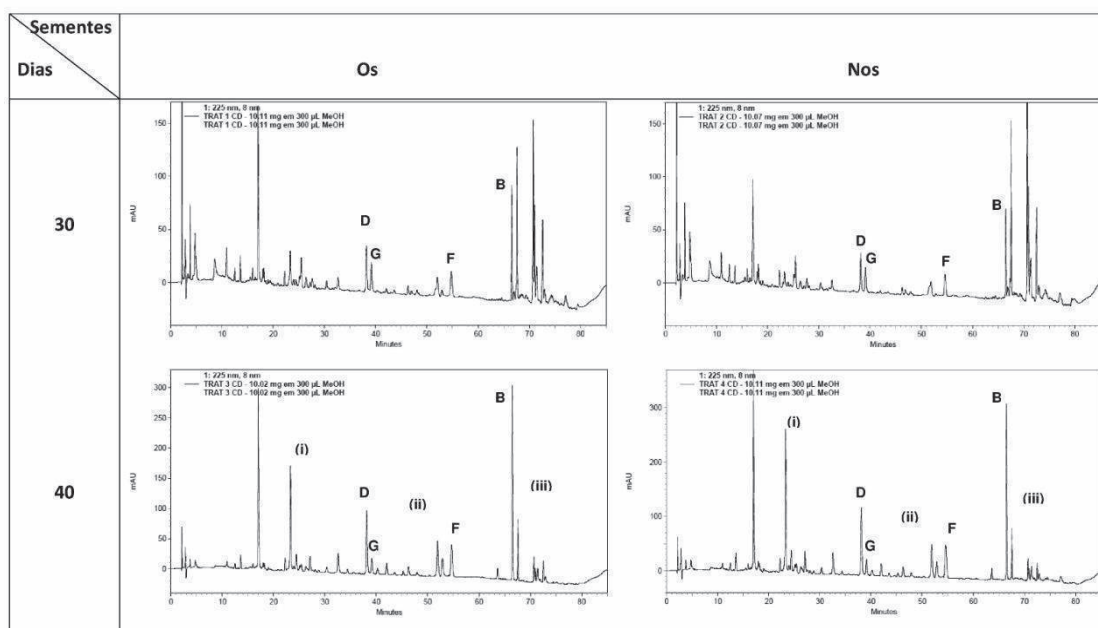


Figura 3: Cromatogramas dos extratos de partes aéreas de *P. angulata* colhidas em diferentes fases de desenvolvimento e provenientes de sementes osmocondicionadas (Os) e não osmocondicionadas (Nos).

Apesar da ampla quantidade de referências que revelam importantes propriedades terapêuticas de *P. angulata*, nenhum relato foi encontrado até então a respeito da quantificação das fisalinas nas diferentes fenofases da espécie. Além disso, estudos avaliando o efeito do osmocondicionamento na síntese de metabólitos secundários são escassos, ou raros. Nesse contexto este trabalho ganha um caráter exploratório, permitindo avaliar como a produção das fisalinas está relacionada com a fase reprodutiva de *P. angulata*, indicando então a melhor época de cultivo para a obtenção de tais substâncias.

## Conclusões

O efeito do osmocondicionamento das sementes sobre o decréscimo do teor de fisalina D em extrato etanólico de partes aéreas de *P. angulata* foi detectado apenas na fase reprodutiva, mas ficou evidenciada a elevada biossíntese (triplicando o teor) das fisalinas D, F e B nesta fase de desenvolvimento comparativamente à fase vegetativa. Estes dados vêm contribuir na tomada de decisão quanto a fase de desenvolvimento para a colheita desta planta com finalidades farmacológicas ou de aproveitamento dos princípios ativos.

## Agradecimentos

Ao CT-Biotecnologia/CT-Saúde/MCT/CNPq/MS/SCTIE/DECIT – BIOINOVA nº 20/2007 (CNPq) pela concessão da Bolsa DTI/CNPq à primeira autora. RPT-PDTIS-FIOCRUZ, RMB-PDTIS-FIOCRUZ pelo apoio nas análises fitoquímicas.

## Referências Bibliográficas

BRADFORD, K.J. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. **HortScience**, v. 21, n. 5, p.1105-1112, 1986.

GUIMARÃES, E.T.; LIMA, M.S.; SANTOS, L.A.; RIBEIRO, I.M.; TOMASSINI, T.B.; Dos SANTOS, R.R.; Dos SANTOS, W.L.; SOARES, M.B. Activity of physalins purified from *Physalis angulata* in vitro and in vivo models of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 64, p. 84–87. 2009.

DAMU, A.G., KUO, P.C., SU, C.R., KUO, T.H., CHEN, T.H., BASTOW, K.F., LEE, K.H., WU, T.S. Isolation, structures, and structure cytotoxic activity relationships of withanolides and physalins from *Physalis angulata*. **Journal of Natural Products**, 70, p. 1146–1152. 2007.

FLORS, V.; PARADÍS, M.; GARCÍA-ANDRADE, J.; CEREZO, M.; BOSCH, G.C.; PILAR, G.A.P. A tolerant behavior in salt-sensitive tomato plants can be mimicked by chemical stimuli. **Plant Signaling and Behavior** v. 2, n. 1, p. 50-57. 2007.

HEYDEKKER, W.; HIGGINS, J.; GULLIVER, R.L. Accelerated germination by osmotic seed treatment. **Nature**, 246, p. 42-44. 1973.

IQBAL, M. & ASHRAF, M. Seed treatment with auxins modulates growth and ion partitioning in salt-stressed wheat plants. **Journal of Integrative Plant Biology**, 49, p. 1003-1015. 2007.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p.

ROBERTS, E.H.; ELLIS, R.H. Water and seed survival. **Annals of Botany**, v. 63, p. 39-52. 1989.

SÁ, M. S. Avaliação da Atividade Antimalárica de Substâncias Obtidas de Espécies Vegetais Nativas ou Endêmicas do Semi-Árido Brasileiro e Derivados Sintéticos. (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa). Fundação Oswaldo Cruz Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador/BA. 39-55, 2011.

SOARES, M.B.P., BELLINTANI, M.C., RIBEIRO, I.M., TOMASSINI, T.C.B., DOS SANTOS, R.R. Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccharide-induced death by seco-steroids purified from *Physalis angulata* L. **European Journal of Pharmacology** 459, 107–111, 2003.

SOARES, M.B.P.; BRUSTOLIM, D.; SANTOS, L.A.; BELLINTANI, M.C.; PAIVA, F.P.; RIBEIRO I.M.; TOMASSINI T.C.B; SANTOS, R.R. Physalins B, F e G, seco-steroids purified from *Physalis angulata* L., inhybity lymphocyte function and allogeneic transplant rejection. **Internationl Immunopharmacology**, 6, p. 408-414, 2006.

SOUZA, C. L. M. Germinabilidade de Sementes de *Physalis angulata* L. (Solanaceae) sob Condições de Estresses Abióticos. 2009. 69 f. Dissertação

(Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais). Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana/BA. 2009.

SOUZA, M. O.; SOUZA, C. L. M.; PELACANI, C.R. Germination of Osmoprimed and Non-Osmoprimed Seeds and Initial Growth of *Physalis angulata* (Solanaceae) in Saline Environments. **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, 105–112, 2011.

SOUZA, M. O.; SOUZA, C. L. M.; PELACANI, C.R.; SOARES, M.; MAZZEI, J. L.; RIBEIRO, I. M.; RODRIGUES, C. P.; TOMASSINI, T. C. B. Osmotic Priming Effects on Emergence of *Physalis angulata* and the Influence of Abiotic Stresses on Physalin Content. **South African Journal of Botany**, v. 88, 191-197, 2013.

NOGUEIRA, R. C.; ROCHA, V. P. C.; NONATO, F. R.; TOMASSINI, T. C. B.; RIBEIRO, I. M.; SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P. Genotoxicity and Antileishmanial Activity Evaluation of *Physalis angulata* Concentrated Ethanolic Extract. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 36, 1304-1311, 2013.

TOMASSINI, T. C. B.; SANTOS, J. A. A.; TEIXEIRA, V. L.; LOPES, D. X.; RIBEIRO, I. M. Verification of the Molluscicide Activity of *Physalis angulata* Extracts on *Biomphalaria tenagophila* under Laboratory Conditions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, 425-428, 2003.

VARIER, A.; VARI, A. K.; DADLANI, M. The subcellular basis of seed priming. *Current Science*, v.99, n. 4, p. 450-456. 2010.

VILLELA, F.A.; DONI FILHO, L.D; SEQUEIRA, E.L. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietilenoglicol 6.000 e da temperatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, n.11/12, p.1957-1968.1991.

**ESTUDO FITOQUÍMICO E TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS EM  
ACESSOS DE ABACAXIZEIROS SILVESTRES**



## **ESTUDO FITOQUÍMICO E TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS EM ACESSOS DE ABACAXIZEIROS SILVESTRES**

Pesquisa Institucional desenvolvida na Universidade Estadual de Feira de Santana, pertencente ao Grupo de Pesquisa: Estudos Químicos e Atividades Biológicas em produtos Naturais; Projeto de Mestrado.

Juliana Azevedo da Paixão<sup>1</sup>, José Fernando de Araújo Neto<sup>2</sup>, Fernanda Vidigal Duarte Souza<sup>3</sup>, Everton Hilo de Souza<sup>4</sup>, Juceni Pereira de Lima David<sup>5</sup>, Hugo Neves Brandão<sup>6</sup>

1 - Mestranda em Recursos Genéticos Vegetais, bolsista FAPES - Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Feira de Santana. juli.azevedo87@gmail.com

2 - Mestrando em Química - Instituto de Química, UFBA. jfernandoaraujo@hotmail.com

3 - Pesquisadora da Embrapa Mandioca e Fruticultura. fernanda.souza@embrapa.br

4 - Pós-doutorando da Embrapa Mandioca e Fruticultura. hilosouza@gmail.com

5 - Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. da Faculdade de Farmácia, UFBA. jucenidavid@gmail.com

6 - Prof. Orientador, Dr. do Departamento de Saúde, UEFS. hugo@uefs.br

### **INTRODUÇÃO:**

Os produtos naturais são compostos orgânicos derivados de diversas fontes, tais como plantas, animais e microrganismos terrestres e marinhos. Estes produtos têm importante papel na medicina tradicional, devido aos seus componentes poderem ser utilizados para prevenção e tratamento de diversas enfermidades ao redor do mundo, além da possibilidade de uso nas diversas outras áreas, como agronomia, insumos para a indústria de alimentos, entre outros (SOUZA, 2008).

O estudo fitoquímico, desperta ao longo da história o interesse de diversos profissionais, sejam farmacêuticos, químicos, médicos, agrônomos, entre outros (SOUZA, 2008). Um aspecto a ser considerado é a imensa quantidade de fontes de produtos naturais, principalmente plantas, sendo que a maioria é desconhecida sob o ponto de vista científico. Devido ao aparecimento de novas doenças e reaparecimento de outras, há necessidade de desenvolvimento de fármacos mais potentes e próximos do fármaco ideal. Assim, a cada ano têm surgido grupos de pesquisadores, cujos objetivos são o isolamento, a caracterização ou mesmo a síntese de produtos naturais possuindo algum tipo de ação farmacológica (ABELSON, 1990 apud LUCHESE *et al.*, 2006). Substâncias de origem natural podem dar origem a outros componentes, permitindo o desenho e planejamento racional de novas drogas.

De acordo com Guerra; Nodari (2007) Os componentes da biodiversidade podem fornecer uma gama de produtos de importância econômica. Dentre eles destacam-se os fitoterápicos e os fitofármacos, originados dos recursos genéticos vegetais. Segundo Hostettmann (2003); Schenkel (2005) é estimado que, aproximadamente 44% dos medicamentos disponíveis, foram desenvolvidos, de alguma forma, a partir de fontes naturais, como plantas, microrganismos ou animais. Além disso, sabe-se que das 252 substâncias que são consideradas básicas pela OMS, 11% são originadas de plantas. Em Butler, (2008) mostra que a maior parte dos medicamentos antitumorais e anti-infecciosos são obtidos de origem natural. A grande maioria destas drogas não é sintetizada de maneira econômica e são obtidas de plantas selvagens ou cultivadas. Infelizmente, o

contínuo processo de desmatamento atingindo os diferentes tipos de habitat pode resultar na extinção de um grande número de espécies vegetais.

Os produtos naturais ou metabólitos secundários são substâncias químicas de estrutura relativamente complexa, que apresentam algumas funções específicas, temos como exemplo: proteção contra as pragas, pigmentação de folhas e flores para favorecer a polinização, etc. As principais classes de metabólitos secundários são: alcaloides, glicosídeos cardíacos, cumarinas, flavonoides, taninos, triterpenos, derivados antracênicos livres (SIMÕES, 2001). Uma análise fitoquímica é um método usual e de grande relevância para a detecção preliminar dos diferentes constituintes químicos nas plantas, desta forma, orienta nas estas seguintes do estudo fitoquímico.

A família Bromeliaceae possuem aproximadamente 58 gêneros e cerca de 3.352 espécies, que são divididas em oito subfamílias: Brocchinioideae, Bromelioideae, Hechtioideae, Lindmanioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae e Tillandsioideae (LUTTER, 2012). O Brasil é o centro de origem e dispersão e abriga aproximadamente 40% do total destas espécies, sendo 40 gêneros registrados no território nacional (FORZZA, 2005; SOUZA *et al.*, 2007).

As bromeliáceas são predominantemente neotropicais e sua maior diversidade é encontrada na Mata Atlântica brasileira. Está presente desde o Chile e Argentina, na América do Sul, Caribe e América Central, chegando a alcançar o México e o sudeste Norte-Americano. Apenas a *Pitcarnia feliciana* é encontrada fora do continente americano (BENZING, *et al.*, 2000). Atualmente as espécies de Bromeliaceae são consideradas a segunda maior família de monocotiledôneas epífitas (BANZINE 1980; MADISON 1977). Apresentam uma longa história de uso que está associada aos povos americanos nativos, no qual eram utilizadas como fonte de fibras, alimentos, forragens e medicamentos, ornamental e místico. Várias bromeliáceas apresentam potencial ornamental, o que vem causando o declínio das populações naturais de algumas de suas espécies.

A mais conhecida das bromélias é o abacaxi, que de acordo com Manetti; Delaporte; Laverde Junior, (2009) o abacaxi tornou-se popular principalmente pelo seu sabor e aroma marcantes. Seus frutos contêm a bromelina, uma enzima que protege da predação por larvas de insetos e apresenta grande valor comercial, cujo uso encontra-se em ascensão na indústria farmacêutica, devido as atividades antihelmíntica, antiinflamatória, antidiarreico e anticancerígena e na indústria alimentícia, como amaciante de carnes vermelhas, hidrolizante de complexos proteína-taninos na produção de cerveja, pães, leite de soja e ovos desidratados (BITANGE *et al.*, 2008).

Além da bromelina, muitas outras enzimas, como as proteases de cisteína estão presentes no abacaxizeiro e muitas já foram isoladas e identificadas em diferentes bromélias, no qual também apresentam grande potencialidade de ser empregada nos segmentos industriais. Outras variedades botânicas de *Ananas* também apresentam potencial ornamental, sendo o nordeste brasileiro um grande exportador de abacaxi ornamental (KETNAWA; RAWDKUEN; CHAIWUT, 2010).

Segundo Manetti; Delaporte; Laverde Junior, (2009) dentre o grande número de espécies da família Bromeliaceae, poucas delas foram estudadas quimicamente até o momento. Porém, existe um grande número de compostos identificados, os quais pertencem principalmente às classes dos triterpenoides e flavonoides. Outras classes de compostos

como esteróis, diterpenos, ácidos cinâmicos, gliceróis substituídos, ligninas, alcaloides, entre outros, também foram identificados nesta família, embora em pequeno número.

O Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura (BAG Abacaxi) é o maior do mundo e foi estabelecido através da realização de coleta e intercâmbio de germoplasma em nível nacional e internacional e possui atualmente 627 acessos (SOUZA et al, 2012).

De acordo Leal; Coppens D'eeckenbrugge, (1996), a erosão genética em *A. comosus* e outras espécies de interesse para os programas de melhoramento genético, tem ocorrido devido à produção comercial baseada apenas em poucas cultivares. Dessa maneira, o desenvolvimento de atividades voltadas para a conservação dos recursos genéticos são consideradas de grande importância para a sustentabilidade da cultura do abacaxi. Segundo Souza, (2012), o BAG Abacaxi possui os seguintes acessos: *Ananas comosus* var. *bracteatus*, *Ananas comosus* var. *ananassoides*, *Ananas comosus* var. *erectifolius* e *Ananas comosus* var. *parguazensis*, *Ananas macrodentes*, além de outras espécies dos gêneros *Ananas*, *Bromelia*, *Dickia*, *Tillandsia* e *Bilbergia*.

Ainda segundo Souza, (2012) diversos estudos tem sido realizados, voltados para identificação e seleção de genótipos com valor ornamental. Além disso, esses trabalhos geraram subsídios para a realização de cruzamentos controlados, visando à geração de novos genótipos ornamentais, com características diferenciadas e resistentes às principais pragas (SOUZA et al., 2009; 2012; 2014). A caracterização desses acessos é um passo fundamental para identificar o potencial não apenas ornamental, bem como para servir como protótipos para desenvolvimento de alternativas terapêuticas medicamentosas a diversas patologias. Desta maneira, este estudo mostra-se relevante para a comunidade científica, tendo em vista que o conhecimento sobre plantas medicinais representa um importante recurso terapêutico.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a presença de metabólitos secundários nos acessos de abacaxizeiros do BAG Abacaxi, bem como realizar uma comparação entre os acessos pertencentes em uma mesma espécie/ variedade botânica.

## **MÉTODOS:**

Foram coletadas folhas de 21 acessos de diferentes variedades botânicas de abacaxizeiros do Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas (Tabela 1).

Após a coleta as folhas dos espécimes vegetais foram submetidos à secagem em estufa de circulação de ar com temperatura de 40 °C até manterem um peso constante. Em seguida submetidas a secagem e iniciadas as moagens das folhas, foram colocados para maceração 20 g do material vegetal moído em 250 mL de metanol e posteriormente rota- evaporadas, foram realizadas duas repetições para cada.

Para a realização do *Screening* fitoquímico foi utilizado o extrato metanólico das folhas. Foram realizadas reações de caracterização adaptadas daquelas descritas por Alice et. al., (1985), para alcaloides (Mayer- M, Dragendorf-D), cardiônicos, cumarinas, flavonoides, taninos e fenóis, saponinas, triterpenos e esteroides, e antraquinonas.

Alcaloides – foi evaporado até secura, em banho maria, aproximadamente 30 mL de extrato metanólico da planta, adicionou-se 5 mL de ácido clorídrico a 10 % e aqueceu-se por 10 min. Após resfriamento e filtração, o filtrado foi dividido em dois tubos de ensaio. Ao primeiro tubo foi adicionado algumas gotas do reativo de Mayer e ao outro Dragendorf.

**Tabela 1.** Acessos de abacaxizeiros utilizados nas análises fitoquímicas.

Nome do Acesso	Espécie/ Variedade botânica
1 – BGA-820	<i>A. comosus</i> var. <i>erectifolius</i>
2 – BGA-739	<i>A. comosus</i> var. <i>erectifolius</i>
3 – BGA-804	<i>A. comosus</i> var. <i>erectifolius</i>
4 – BGA-197	<i>Ananas</i> sp.
5 – Híbrido F	<i>A. comosus</i> var. <i>erectifolius</i> X <i>A. comosus</i> var. <i>bracteatus</i>
6 – BGA-81	<i>A. macrodontes</i>
7 – BGA-82	<i>A. macrodontes</i>
8 – BGA-83	<i>A. macrodontes</i>
9 – BGA-25	<i>A. comosus</i> var. <i>ananassoides</i>
10 – BGA-385	<i>A. comosus</i> var. <i>ananassoides</i>
11 – BGA-324	<i>A. comosus</i> var. <i>ananassoides</i>
12 – Híbrido G	<i>A. comosus</i> var. <i>ananassoides</i> X <i>A. comosus</i> var. <i>erectifolius</i>
13 – BGA-737	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>
14 – BGA-01	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>
15 – BGA-16	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>
16 – Híbrido E	<i>A. comosus</i> var. <i>erectifolius</i> X <i>A. comosus</i> var. <i>bracteatus</i>
17 – BGA-45	<i>A. comosus</i> var. <i>bracteatus</i>
18 – BGA-17	<i>A. comosus</i> var. <i>bracteatus</i>
19 – BGA-126	<i>A. comosus</i> var. <i>bracteatus</i>
20 – BGA-419	<i>A. comosus</i> var. <i>parguazensis</i>
21 – BGA-376	<i>A. comosus</i> var. <i>parguazensis</i>

Cardiotônicos - Adicionou-se 5 mL de solução de acetato neutro de chumbo a 10 % e 4 mL de água destilada a 10 mL do extrato metanólico da planta, levando a mistura ao banho-maria fervente, durante 10 min. Foi filtrado, ao filtrado foi adicionado com 20 mL de clorofórmio em ampola de separação e deixado em repouso. A fase clorofórmica foi distribuída em tubos e evaporado em banhomaria, até a obtenção de resíduo seco. Aos tubos foram adicionados os seguintes reagentes, reativo de Baljet; reativo de Kedde.

Cumarinas voláteis - Num tubo de ensaio, adicionou-se 2 mL de extrato metanólico da planta, com papel filtro embebido em solução diluída de hidróxido de sódio tampou-se o tubo que foi levado ao banho-maria fervente, por alguns minutos. O papel de filtro removido foi examinado à luz UV, sendo a fluorescência amarela indicativa da presença de cumarinas.

Flavonoides - Num tubo de ensaio, colocou-se 2 mL de extrato metanólico da planta, alguns fragmentos de magnésio e verter, pelas paredes do tubo, gotas de ácido clorídrico diluído. Foi observado as coloração, que varia para as diferentes estruturas dos flavonoides.

Taninos e fenois - Evaporou-se 5 mL de extrato metanolico da planta e dissolveu-se o resíduo em 10 mL de água destilada. Em 3 mL do extrato aquoso foi adicionado 1 a 2

gotas de solução de cloreto férrico a 10 %. A coloração azul indicou a provável presença de taninos hidrolisáveis e, a verde, de taninos condensados.

Saponinas - 5 mL do extrato metanólico da planta foi evaporado e retomado com água fervente. Após resfriamento, foi realizada agitação vigorosa, deixando em separado por 15 a 20 minutos. A presença de saponinas foi classificada pela altura da espuma, 1 cm = +; 2 cm = ++ ; 3 cm = +++ . Triterpenos e/ou esteróis - O resíduo de 10 mL de extrato metanólico da planta, foi tratado com 10 mL de clorofórmio anidro e filtrado, dividido em duas porções, sendo testado pelas reações de Liebermann-Burchard e Salkowski.

Antraquinonas - em um tubo de ensaio foi colocado 0,20 g de pó da planta e adicionado 5 mL de clorofórmio, após agitação foi deixado durante 15 minutos em repouso, posteriormente foi recolhida a fração clorofórmica no qual foi adicionado 1 mL de solução de hidróxido de amônio diluído e agitado. A fase aquosa colore-se de vermelho em presença de antraquinonas livres.

Todas as reações foram classificadas em: Fortemente Positivas (++) ; Positivas (+) ; Fracamente Positivas (+-) ; Negativas (-).

Para comparação do *screening* fitoquímico foi avaliada a concentração de flavonoides totais. Neste teste a concentração de flavonoides totais é determinada pela complexação dos flavonoides com o cátion alumínio, formando complexos estáveis entre o cátion alumínio com os flavonoides em meio metanólico. A formação deste complexo entre o alumínio e flavonoide em metanol promove um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção na análise espectrofotométrica. Dessa maneira, é possível determinar a quantidade de flavonoides, evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos, que invariavelmente acompanham os flavonoides nos tecidos vegetais (PELLISSARI, 2008).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi observada a presença de flavonoides e cardiotônicos em nenhum dos 21 acessos estudados. A presença de saponinas foi verificada em 11 acessos, taninos em 14 acessos, triterpenos e esteroides em 11 acessos, 17 acessos apresentaram reação positiva para pelo menos um dos testes para alcaloides, 13 acessos apresentaram reação positiva para a presença de antraquinonas, 7 acessos apresentaram reação positiva para cumarinas (Tabela 2).

Dentre os acessos estudados foi possível notar que divergências entre a presença e ausência de determinado metabólito secundário são encontradas em acessos pertencentes a mesma variedade. Os acessos BAG-Igor, BAG-739, BAG-804 pertencem ao *Ananas comosus* var. *erectifolius*, apresentaram saponinas, taninos, triterpenos e esteroides, alcaloides, e antraquinonas, no entanto o acesso BAG-804 foi o único que apresentou antraquinonas e não apresentou taninos.

A espécie *A. macrodentes*, apresentou saponinas, taninos, triterpenos e esteroides, alcaloides e cumarinas. No entanto o acesso BAG-82, apresentou um maior número de divergências, tendo em vista que foi o único que apresentou alcaloides entre os três e não apresentou triterpenos, esteroide e cumarinas, já o acesso BAG-81 não apresentou a presença de taninos.



**Tabela 2.** Testes fitoquímicos nos diferentes acessos de abacaxizeiros.

Acessos	SAP	TAN	FLA	TRI	ALC	ANT	CUM	CAR
1 – BGA-820	+	+	-	++	M(+)- D(+)-	-	-	-
2 – BGA-739	+	+	-	+/-	M(+) D(+)	-	-	-
3 – BGA-804	++	-	-	+	M(+) D(++)	+/-	-	-
4 – BGA-197	-	-	-	+	M(+) D(+)	+/-	+/-	-
5 – Híbrido F	++	-	-	-	M(+) D(+)	++	+/-	-
6 – BGA-81	++	-	-	+	M(-) D(-)	-	+/-	-
7 – BGA-82	+	+/-	-	-	M(+)- D(+)-	-	-	-
8 – BGA-83	++	+/-	-	+	M(-) D(-)	-	+/-	-
9 – BGA-25	-	-	-	-	M(+) D(+)	+/-	-	-
10 – BGA-385	+	+	-	-	M(+) D(+)-	+	+/-	-
11 – BGA-324	++	+	-	-	M(+) D(+)	+	+/-	-
12 – Híbrido G	++	+	-	+	M(+) D(+)	+/-	-	-
13 – BGA-737	-	+/-	-	+/-	M(+)- D(+)-	+/-	-	-
14 – BGA-01	-	+	-	-	M(+) D(+)	+/-	-	-
15 – BGA-16	-	+	-	-	M(-) D(+)-	+	-	-
16 – Híbrido E	+	+	-	-	M(+) D(+)	-	-	-
17 – BGA-45	-	+	-	+	M(-) D(-)	-	-	-
18 – BGA-17	-	+/-	-	-	M(-) D(+)-	-	+	-
19 – BGA-126	-	+/-	-	-	M(+) D(+)	++	-	-
20 – BGA-419	-	-	-	+	M(+)- D(+)	+/-	-	-
21 – BGA-376	-	+/-	-	+	M(+)- D(+)-	+/-	-	-
<b>Padrão</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>

SAP: saponinas; TAN: taninos e fenóis; FLA: flavonoides; TRI: triterpenos e esteroides; ALC: alcaloides; ANT: antraquinonas; CUM: cumarinas; CAR: cardiotônicos.

As reações foram classificadas como: fortemente positivas (++), positivas (+), fracamente positivas (+/-) e negativas (-).

A variedade botânica *A. comosus* var. *ananassoides* apresentou saponinas, taninos, alcaloides, antraquinonas e cumarinas. No entanto o acesso BAG-25 diferiu dos demais pela ausência dos seguintes metabólitos secundários: saponinas, triterpenos, e cumarinas.

Entre os acessos de *A. comosus* var. *comosus*, foram observados à presença de taninos, triterpenos e esteroides, alcaloides e antraquinonas, sendo que os triterpenos e esteroides foram observados apenas no acesso BAG-737.

A variedade *A. comosus* var. *bracteatus* apresentou os seguintes metabólitos secundários: taninos, triterpenos e esteroides, alcaloides, antraquinonas e cumarinas.

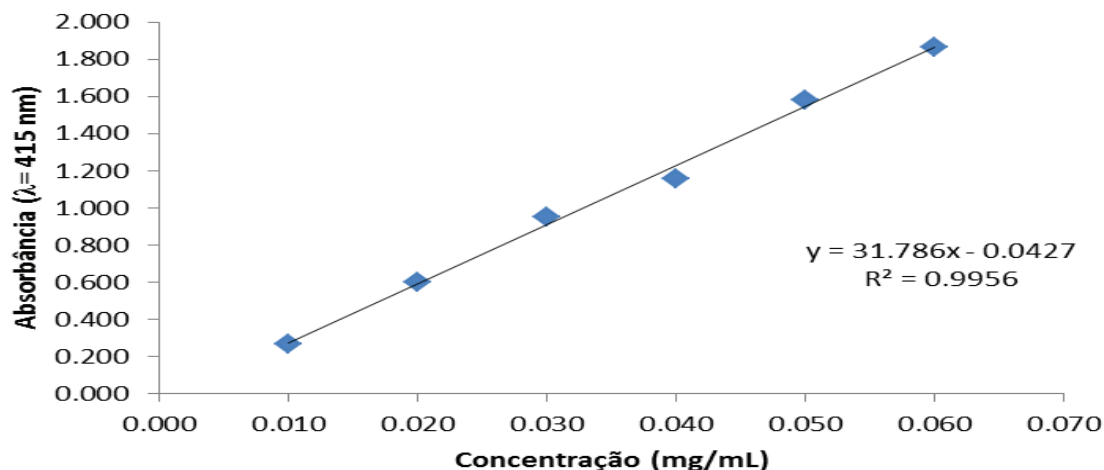


Porém o acesso BAG-45 apresentou várias diferenças entre os outros dois acessos, pois foi o único que apresentou triterpenos, esteroides e cumarinas e não apresentou alcaloides e antraquinonas. Já os acessos de *A. comosus* var. *paraguayensis* apresentou triterpenos e esteroides, alcaloides e antraquinonas. Os taninos foram observados apenas no acesso BAG-376.

Estas diferenças na presença dos metabolitos secundários em diferentes acessos da mesma espécie e/ ou variedade botânica, podem ser explicadas devido a vários fatores, uma vez que seu acúmulo é uma resposta comum das plantas a estresses bióticos e abióticos (SMETANSKA, 2008). Sendo sua biossíntese fortemente influenciada por fatores ambientais. De acordo Gobbo; Lopes (2007), os principais fatores que podem coordenar ou alterar a taxa de produção de metabolitos secundários são: sazonalidade, ritmo circadiano e desenvolvimento; temperatura; disponibilidade hídrica; radiação ultravioleta; nutrientes; altitude; poluição atmosférica; indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos.

Segundo Rezaeieh; Uyanık (2012) apud Ravishankar; Ramachandra; Rao, (2000) foi demonstrado que a biossíntese da atividade das células cultivadas pode ser melhorada com a regulação dos fatores ambientais, além da possível seleção artificial ou a indução de cultivares que possuam a produção dos metabolitos desejados. Dessa maneira, é possível verificar que muitos fatores podem ter influenciado as divergências encontradas na triagem fitoquímica realizada, tendo em vista que as espécies cultivadas são variações da mesma espécie que foram coletados originalmente por todo o Brasil. Apesar dos acessos de abacaxizeiros serem cultivados no mesmo local após clonagem, os metabolitos secundários são fundamentalmente produzido pelo processamento genético, dessa maneira, a variabilidade genética pode estar influenciando a produção dos metabolitos. De acordo com os estudos realizados por Durval *et al.* (2001) e Souza *et al.*, (2012) os acessos de abacaxizeiros apresentam grande variabilidade genética.

Como pode ser verificado na tabela 2, não foi detectado a presença de flavonoides na avaliação fitoquímica qualitativa. Como a ausência de flavonoides em testes fitoquímicos não é comum, foi realizada uma quantificação de flavonoides totais nos 21 acessos em comparação com o padrão quercetina. Utilizando uma curva do padrão quercetina com reta  $y = 31.786x - 0.0427$ , expressa na figura 1, temos as concentrações dos flavonoides totais nos extratos em  $QE\ 100g^{-1}$  (Tabela 3).



**Figura 1.** Curva padrão da quercetina.

**Tabela 3.** Concentração de flavonoides totais nos 21 acessos de abacaxizeiros.

Acessos	QE/100g	Acessos	QE/100g	Acessos	QE/100g
1 – BGA-820	1,66	8 – BGA-83	2,10	15 – BGA-16	2,20
2 – BGA-739	1,64	9 – BGA-25	1,60	16 – Híbrido E	1,00
3 – BGA-804	1,48	10 – BGA-385	2,56	17 – BGA-45	1,00
4 – BGA-197	1,45	11 – BGA-324	1,40	18 – BGA-17	1,00
5 – Híbrido F	1,15	12 – Híbrido G	1,24	19 – BGA-126	1,10
6 – BGA-81	1,13	13 – BGA-737	1,30	20 – BGA-419	1,54
7 – BGA-82	1,30	14 – BGA-01	1,23	21 – BGA-376	2,65

Resultado expresso em gramas de quercetina QE/100g

De acordo com os dados obtidos de concentração de flavonoides nos acessos estudados, foi possível verificar a presença deste metabolito secundário em todos eles, o que não corroboram com o *screening* fitoquímico. No entanto, as concentrações encontradas nos acessos em QE 100g<sup>-1</sup>, são muito baixas, comparado com estudos realizados por Chakraborty, Mishra, Rao, (2015) utilizando o purê do fruto de *Ananas comosus* L. Esses autores encontraram um teor de flavonoides totais igual a 8,67 QE/100g. Já em estudo realizado por Hossain, Rahman (2011) com três extratos do fruto de abacaxi, os teores de flavonoides variaram 39,4 - 55,2 mg quercetina / g de peso. A variação encontrada nos diferentes estudos pode ser justificada devido às condições ambientais, o que pode modificar os constituintes da planta. Dessa maneira, esse baixo teor de flavonoides pode ter dificultado sua detecção pelo teste qualitativo.

Apesar das reações de caracterização serem baseadas nas propriedades químicas das substancias presentes na droga vegetal, algumas são consideradas específicas, porém pouco eficazes como único método de identificação.

## CONCLUSÕES

Análises fitoquímicas fornecem informações importantes sobre a presença de metabólitos secundários nas plantas, para que seja possível chegar ao isolamento de princípios ativos importantes na produção de novos medicamentos ou outros produtos de interesse econômico. Os dados obtidos com os acessos estudados corroboram com dados da literatura, tendo em vista a presença de metabólitos secundários já encontrados como: triterpenos e esteroides, flavonoides, alcaloides, entre outros. Além disso, foi possível verificar a variabilidade entre os acessos que ocorre pela presença ou ausência de determinado metabólito. São necessários mais estudos fitoquímicos, a fim de verificar os constituintes químicos e o potencial farmacológico desses acessos.

**Palavras-chave:** Bromeliaceae. *Ananas*. *Screening*. Metabólitos secundários. Variabilidade.

**Agência Financiadora:** Fundação de Amparo a Pesquisa da Bahia (FAPESB)

## REFERENCIAS

- ALICE C. B, SILVA G. A. A. B, SIQUEIRA N. C. S, MENTZ L. A. Levantamento fitoquímico de alguns vegetais utilizados na medicina popular do Rio Grande do Sul (Parte I). **Cadernos de Farmácia**. 1: 83-94, 1985.
- BENZING, D. H. **The Biology of Bromeliads**. Mad River Press: Eureka, California, 1980.
- BENZING, D. H.. et al. **Bromeliaceae: profile of na adaptative radiation**. New York: Cambridge University, 2000.
- BITANGE, N. T. *et al.* Therapeutic application of pineapple protease (Bromelain). **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 7, p. 513–520, 2008.
- CABRAL, J. R. S.; FERREIRA, F. R.; MATOS, A. P.; SANCHES, N. F. **Banco ativo de germoplasma de abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura**. Cruz das Almas. Embrapa – CNPMF, 2004.
- CARVALHO, H. L.; LEMOS, João Batista Pereira. **Banco ativo de germoplasma de abacaxi**. Magistra, Cruz das Almas-BA, v. 25, I RGVNE, nov. 2013.
- CHAKRABORTY S. MISHRA R. , RAO P. S.,. Effect of combined high pressure–temperature treatments on color and nutritional quality attributes of pineapple (*Ananas comosus* L.) puree. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. v. 28, 2015.
- DUVAL, M. F.; COPPENS D'EECKENBRUGGE, G.; FONTAINE, A.; HERRY, J. P. Ornamental pineapple: perspective from clonal and hybrid breeding. **Pineapple News**, Hawaii, n. 8, p. 13-14, 2001.
- FORZZA, R. C. Revisão taxonômica de *Encholirium* Mart. Ex Schult. E Shult. F. (*Pitcairnioideae*- *Bromeliaceae*). **Boletim de Botânica da Universidade São Paulo**. v. 23, p. 1 – 49, 2005.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, p. 374-381, 2007.
- GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS. 2007.
- HOSSAIN, M. A.; RAHMAN, M. S. Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple. **Food Research International**. v.44. Bangladesh, 2011.
- KETWANA, S; RAWDKUEN, S; CHAIWUT, P. Two phase partitioning and collagen hydrolysis of bromelain from pineapple peel Nang Lae cultivar. **Biochemical Engineering Journal**, v. 52, p. 205-2011, 2010.
- LEAL, F., COPPENS D'EECKENBRUGGE, G.; HOLST, B. K. Taxonomy of the genera *Ananas* and *Pseudananas* - A historical review. **Selbyana**, California, v. 19, n. 2, p. 227-235. 1998.
- LUCCHESI, A. M.; *et al.* Plantas da caatinga: perfil botânico, fitoquímica e atividade biológica. Recife: Associação das Plantas do Nordeste, **IMSEAR** (Instituto do Milênio do Semi-árido), 2006.
- LUTHER H.E. An Alphabetical List of Bromeliad Binomials. 13 ed Sarasota: Sarasota Bromeliad Society and Marie Selby Botanical Gardens. 2012.
- MACHADO, C. F.; SOUZA, F. V. D. CABRA, J. R. S.; SOUZA, E. H. Estado da arte do Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 5., 2009, Guarapari. **O melhoramento e os novos cenários da agricultura**. Guarapari: SBMP, 2009.
- MADISON, M. Vascular epiphytes: their systematic occurrence and salient features. **Selbiana**. v. 2, p. 1-13, 1977.

MANETTI, L. M.; DELAPORTE, R. H. ; LAVERDE JUNIOR, A. Metabólitos secundários da família Bromeliaceae. **Química Nova**, v. 32, p. 1885-1897, 2009.

PELISSARI, G. P. **Estudo Farmacognóstico e avaliação das atividades antibacteriana e imunomoduladora de *Melampodium divaricatum* (RICH. IN PERS.) DC. (ASTERACEAE)**, 2008, 176 f. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

REZAEIEH K. A. P. , UYANIK B. G. Biotic and abiotic stresses mediated changes in secondary metabolites induction of medicinal plants. **Tıbbı ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu**. Eylül. 2012.

SCHENKEL, E.P.; SIMOES, C.M.O.; MENGUE, S.S.; MENTZ, L.A.; IRGANG, B.E.; STRHMANN, J.R. O espaço das plantas medicinais e suas formas derivadas na medicina científica. **J. Bras. Fitomed.**, São Paulo, v.3, n.4, p.139-141, 2005.

SIMÕES, C. M. O. et. al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre: Ed. da UFSC, 2001.

SOUZA, E. H. ; COSTA, M. A. P. C. ; SANTOS-SEREJO, J. A. ; SOUZA, F. V. D. Selection and use recommendation in hybrids of ornamental pineapple. **Revista Ciência Agronômica** (UFC. Online), v. 45, p. 409-416, 2014.

SOUZA, E. H. ; SOUZA, F. V. D. ; CARVALHO C., M. A. P. ; COSTA, D. S. ; DOS SANTOS-SEREJO, J. A.; AMORIM, E. P. ; SILVA LEDO, C. A. . Genetic variation of the *Ananas* genus with ornamental potential. **Genetic Resources and Crop Evolution**. v. 59, p. 1357-1376, 2012.

SOUZA, F. V. D.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, E. H.; FERREIRA, F. R.; NEPOMUCENO, O. S.; SILVA, M. J. Evaluation of F1 hybrids between *Ananas comosus* var. *ananassoides* and *Ananas comosus* var. *erectifolius*. **Acta Horticulturae**, João Pessoa, v. 822, p. 79-84, 2009.

SOUZA, F. V. D. ; MACHADO, C. de F. ; JUNGHANS ,D. T. ; SOUZA, E. H. de; SMETANSKA, I.,. Production of secondary metabolites using plant cell cultures. **Advance in Biochemistry and Engineering Biotechnology**, p. 187–228. 2008.

SOUZA, F. V. D.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, E. H.; SANTOS, O. N.; SANTOSSEREJO, SOUZA, P. R. T. de, **Terpenos isolados de *Trichilia casaretti* e *Trichilia silvatica* (Meliaceae)**. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Dissertação de Mestrado, 2008.

SOUZA, F. V. D.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, E. H. de; SANTOS, O. S. N.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos; FERREIRA, F. R.; SILVA, M. de J. da. Abacaxi ornamental: uma riqueza a ser explorada. **Abacaxi em Foco**. Cruz das Almas: Embrapa/Mandioca e Fruticultura Tropical, dez. 2007.

VASCONCELOS, A. L. *Tillandsia recurvata* L. (Bromeliaceae): aspectos farmacognósticos. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.** V. 34, p. 151-159 2013.

**IDENTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES COM POTENCIAL  
INIBIDOR PARA A ENOIL-ACP-REDUTASE DE *Plasmodium  
falciparum* POR TRIAGEM VIRTUAL**

# IDENTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES COM POTENCIAL INIBIDOR PARA A ENOIL-ACP-REDUTASE DE *Plasmodium falciparum* POR TRIAGEM VIRTUAL

Pesquisa Institucional desenvolvida no Laboratório de Modelagem Molecular da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), pertencente ao Grupo de Pesquisa Fármacos e Medicamentos; Projeto de Mestrado.

Dayse Alessandra Almeida Silva<sup>1</sup>; David Bacelar Costa Júnior<sup>2</sup>; Hugo Neves Brandão<sup>3</sup>; Manoelito Coelho dos Santos Junior<sup>4</sup>.

1. Aluna do Curso de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, UEFS, bolsista CAPES, dayse.aasilva@hotmail.com;
2. Aluno do Curso de Graduação em Farmácia, UEFS, bolsista Fapesb, davidbacelar-kgb@hotmail.com;
3. Professor Doutor do Departamento de Saúde, UEFS, hugo@uefs.br;
4. Professor Doutor do Departamento de Saúde, UEFS, Orientador, manoelito@uefs.br.

## Introdução

As doenças parasitárias são consideradas Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) e afetam principalmente, mas não exclusivamente, populações pobres nas regiões mais vulneráveis e miseráveis do planeta (DIAS et al., 2013; FRANÇA et al., 2008). A malária é uma das infecções parasitárias que causa maior preocupação e pode ser considerada como um dos mais sérios problemas mundiais de saúde pública, visto que, provoca inúmeros casos de morbidade e mortalidade. Estima-se que 3,2 bilhões de pessoas correm o risco de estarem infectadas com o parasita da malária. Em 2013, foram relatados mundialmente, 198 milhões de casos de malária e 584 mil casos de óbitos ocasionados pela doença (WHO, 2014).

Os mosquitos do gênero *Anopheles* infectados por protozoários do gênero *Plasmodium* são responsáveis pela transmissão da malária em seres humanos. Apenas cinco espécies, *Plasmodium vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. knowlesi* e *P. falciparum*, promovem essa infecção. Sendo, o *P. falciparum* o mais perigoso por causar a malária cerebral, forma mais grave que na maioria dos casos leva à morte (WHITE et al., 2014).

Embora os fármacos antimaláricos desempenhem um papel central no controle e eliminação da doença, a sua atividade contra o *Plasmodium sp.* mostrou eficácia reduzida, devido a resistência que os parasitas vem desenvolvendo. O *Plasmodium falciparum*, é um dos agentes causadores da malária que apresenta alta capacidade de adaptação por mutação, ocasionando resistência aos antimaláricos. Isto faz com que o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos antimaláricos seja um assunto de grande interesse para a saúde pública (SÁ, 2011; TASDEMIR et al., 2006).

A síntese de ácido graxo tipo II (FAS II) pelo *Plasmodium falciparum* é de grande relevância para a pesquisa de antimaláricos, isso porque as enzimas envolvidas nessa biossíntese estão ausentes nos seres humanos, e por esse motivo são alvos potenciais para o desenvolvimento de novos fármacos. A enoil-ACP redutase (ENR),



pertencente a uma etapa limitante desta via é de particular interesse, uma vez que foi constatado que é inibida por concentrações submicromolares do agente antimicrobiano triclosan (MUENCH et al, 2003).

As plantas medicinais são uma fonte potencial de novos fármacos contra a malária, tendo em vista, a presença de uma variedade de metabólitos com diversidade estrutural e atividades farmacológicas. Preparações tradicionais provenientes das plantas têm sido a principal fonte de tratamento da malária na África e em outros continentes, onde a doença é endêmica. O resultado promissor na utilização de materiais vegetais no tratamento de malária na Medicina Tradicional Africana (ATM) despertou para a busca de produtos naturais como fonte de moléculas com potencial bioativo ou de inspiração para o desenvolvimento de novos antimaláricos (NTIE-KANG et al, 2014).

Estudos relatam que flavonoides bioativos, extraídos de plantas medicinais que crescem na África, mostraram potencial atividade antimalárica. Contudo, o mecanismo de ação da atividade antimalárica dos flavonoides ainda não está completamente elucidado, porém, acredita-se que esses metabólitos atuem inibindo a biossíntese do ácido graxo tipo II (FAS II) uma via do *P. falciparum*. Esse alvo é uma promissora e recente descoberta para a pesquisa e desenvolvimento de fármacos antimaláricos (NTIE-KANG et al, 2014). Tasdemir e colaboradores (2006) identificaram um glicosídeo flavonoide comum, luteolina-7-O-glicosídeo, como o primeiro produto natural antimalárico inibidor da enzima de *P. falciparum* em FAS-II.

Os métodos para a descoberta de fármacos atualmente, são realizados por abordagens mais diretas feitas a partir do entendimento dos processos moleculares envolvidos na doença. Nesta perspectiva, o ponto de partida é o alvo molecular, tais como o receptor, a enzima e o DNA (COHEN, 1996; WALTERS; STAHL; MURCKO, 1998). Atualmente, existe uma variedade de alvos biológicos atrativos sendo explorados no planejamento de fármacos. Esse grande arsenal requer o emprego de métodos rápidos e relativamente precisos, que sejam capazes de identificar protótipos, também conhecidos como compostos de partida. Uma das principais técnicas utilizadas na busca e descoberta de compostos de partida é a triagem virtual (RODRIGUES et al., 2012).

A triagem virtual (TV) é um método *in silico* empregado para selecionar substâncias, provenientes de bancos de dados, que apresentem potencial de interagirem com proteínas alvo. Através da TV é possível selecionar com maior critério as moléculas que serão submetidas aos testes *in vitro*. Contudo, tão importante quanto selecionar as moléculas ativas é excluir as inativas (FERREIRA, OLIVA, ANDRICOPULO, 2011; MYSINGER, et. al., 2012).

Dessa forma, o presente estudo justifica-se pela necessidade na busca de moléculas para o tratamento da malária, bem como pelo potencial antimalárico apresentado por alguns flavonoides ao inibir o promissor alvo, Enoil-ACP Redutase, presente na etapa limitante da biossíntese do ácido graxo do tipo II (FAS II) do *Plasmodium falciparum*. Sendo assim, tem-se como objetivo central identificar flavonoides isolados de plantas como potenciais inibidores para Enoil-ACP-Redutase em *P. falciparum* por Triagem Virtual.

## Metodologia

O presente estudo foi realizado utilizando métodos computacionais de triagem virtual hierárquica baseada em métodos híbridos, ou seja, baseado tanto na estrutura do ligante, quanto do receptor (acoplamento molecular). A busca por complexos cristalográficos da enzima PfENR (EC 1.3.1.9) foi realizado no banco de dados de proteínas (PDB). A seleção dos complexos disponíveis no PDB foi feita com base em sua resolução, na presença de um ligante inibidor e do cofator NAD<sup>+</sup>. O complexo cristalográfico selecionado foi preparado, retirando-se as moléculas de águas e adicionando as cargas de Gasteiger com o campo de força ff12SB, juntamente com os hidrogênios polares, utilizando o programa UCSF Chimera 1.9.

A etapa subsequente do trabalho envolveu a busca de inibidores já reportados para PfENR utilizando o banco de moléculas, ChEMBL (<https://www.ebi.ac.uk/chembl>) (BENTO et al., 2014) além de artigos da literatura. Esses inibidores foram classificados e selecionados com base em informações de atividade, possuindo o IC50 < 1 μM.

A seleção de moléculas a serem submetidas à triagem virtual baseada no ligante foi realizada com moléculas de flavonoides isolados de plantas, obtidas no banco de dados do Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) (VALLI et al., 2013). Os SMILES dessas moléculas, juntamente com os dos inibidores de PfENR previamente selecionados, foram submetidos ao programa de Sistema de Posicionamento Químico Global – Produtos Naturais (*ChemGPS-NP*) (LARSON et al., 2007; ROSEN et al., 2009), para gerar coordenadas de cada Componente Principal (PC) que localizasse no espaço químico as moléculas de acordo com a similaridade química. Essas coordenadas foram plotadas no pacote estatístico Sigma Plot 12.0, gerando um mapa que possibilitou visualizar e mensurar a similaridade química entre os inibidores selecionados e o banco de flavonoides através do cálculo da Distância Euclidiana (DE) (Equação 1). Os inibidores que estavam a 2 Å foram agrupados em clusters, assim, os flavonoides foram selecionados de acordo com a distância que estavam de cada um dos clusters de inibidores, desta forma foi adotado como distância máxima aceitável o valor de 5 Å para cada um dos clusters de inibidores.

### Equação 1 – Cálculo da Distância Euclidiana

$$DE_{x,y} = \sqrt{(p_1 - q_1)^2 + (p_2 - q_2)^2 + (p_3 - q_3)^2}$$

**Fonte:** (ROSÉN, 2009) adaptado.

Em seguida, foi realizada uma triagem desses compostos com base no modelo farmacofórico de inibidores da enzima PfENR, construído por Costa Júnior. *et al.*, (2014), este ensaio virtual foi realizado através do módulo UNITY implementado na plataforma Sybyl-X 1.2. (SYBYL-x 2.0, 2012). As moléculas que foram selecionadas na Triagem virtual baseada no ligante foram submetidas ao acoplamento molecular, utilizando o programa com melhor função de pontuação para o sistema em estudo, possibilitando, assim, o maior grau de precisão para o acoplamento molecular. Para o acoplamento molecular foram utilizados os programas DOCK 6.5 (LANG *et al.*, 2015), que aplica o método sistêmico, e o AutoDock Vina 1.1.2 (TROTT; OLSON, 2010) que aplica o método estocástico.

No DOCK 6.5 foi realizado o cálculo da superfície molecular de acesso ao solvente do receptor, sem átomos de hidrogênios, utilizando o programa DMS (*Display Midas System*) (RICHARDS, 1977). A imagem negativa da superfície molecular foi gerada como um conjunto de esferas sobrepostas usando o programa SPHGEN (KUNTZ *et al.*, 1982). Um subconjunto de esferas próximo ao ligante cristalográfico (8,0Å) foi então selecionado com o programa *sphere\_selector* (LANG *et al.*, 2009). A preparação da caixa de acoplamento foi realizada seguindo-se o procedimento de dois passos. Em primeiro lugar, a caixa foi construída com o auxílio do programa acessório SHOWBOX (Figura 8) (MENG *et al.*, 1992), utilizando-se o método automático de construção e permitindo a inclusão das esferas selecionadas pelo *sphere\_selector* (LANG *et al.*, 2009). Em um segundo momento, foi utilizado o programa GRID (MENG *et al.*, 1992) para gerar a grade de pontuação e a grade de relevo, foram utilizados os seguintes parâmetros: escores de contato e energia que foram calculados utilizando distância atrativa de energia de 6,0Å e distância repulsiva de van der Waals de 9,0Å, tamanho mínimo de âncora de 20, energia interna de repulsão de 9,0Å e choque de sobreposição de 0,75Å, orientações máximas de 10000, os parâmetros restantes foram mantidos nas recomendações padrões do programa (BROZELL *et al.*, 2012). Para avaliar a qualidade do acoplamento molecular pelo DOCK foram aplicadas diferentes funções de pontuação: Grid Score, Grid Score + Hawkings GB/AS e Energy Score.

O programa AutoDock Vina 1.1.2 utiliza o algoritmo *Iterated Local Search Global Optimizer* (TROTT; OLSON, 2010). A caixa de acoplamento foi a mesma utilizada nos estudos de Costa Jr. *et al.*, (2014) sendo um cubo com centro geométrico na região central do sítio ativo da enzima PfENR, possuindo dimensões de 14 x 14 x 14 Å, espaçamento de pontos de 1Å e coordenadas X, Y e Z de 51.133, 92.304 e 34.039, respectivamente.

A curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) foi uma métrica utilizada para avaliar a taxa de recuperação e exatidão global das funções de pontuação utilizadas nesse estudo de acoplamento molecular, através da diferenciação entre os ligantes (verdadeiros positivos) e os decoys (falsos positivos). Dessa forma, o eixo y da Curva ROC (Sensibilidade) representa a taxa acertos ou verdadeiros positivos recuperados, enquanto que o eixo x (Especificidade), expressa à taxa de falsos positivos. As análises foram realizadas a partir do cálculo da área sob a curva (AUC) que determina a exatidão do método (FAWCETT, 2006; BROZELL *et al.*, 2012). Sendo assim, é possível selecionar a função de pontuação com maior grau de precisão para o sistema em questão. Os decoys foram gerados pelo servidor DUD-E (<http://dude.docking.org>) a partir dos SMILES dos inibidores selecionados, os decoys obtidos no DUD-E são moléculas com similaridades físico-químicas ao ligante, mas, topologicamente diferentes (similaridade 2D), para cada ligante submetido ao DUD-E foram gerados 50 decoys (MYSINGER, *et al.*, 2012).

Os resultados de energia de ligação obtidos foram ranqueados e os 10 melhores foram submetidos a uma análise mais precisa das interações intermoleculares entre essas moléculas e a proteína estudada. A análise das interações intermoleculares, foi realizada no programa Discovery Studio 3.5 Visualizer para a construção dos mapas de interações em 2D e 3D.

## Resultados e discussão

A busca dos complexos cristalográficos de PfENR foi realizada no PDB, sendo possível identificar 22 estruturas cristalográficas complexadas com o ligante Triclosan, inibidor já conhecido para Enoil-ACP Redutase, e seus análogos, bem como, com o cofator NAD<sup>+</sup>. A escolha do complexo se deu com base na resolução, sendo escolhido o complexo cristalográfico de código 3LT0 que apresentou a melhor resolução, 1,96Å.

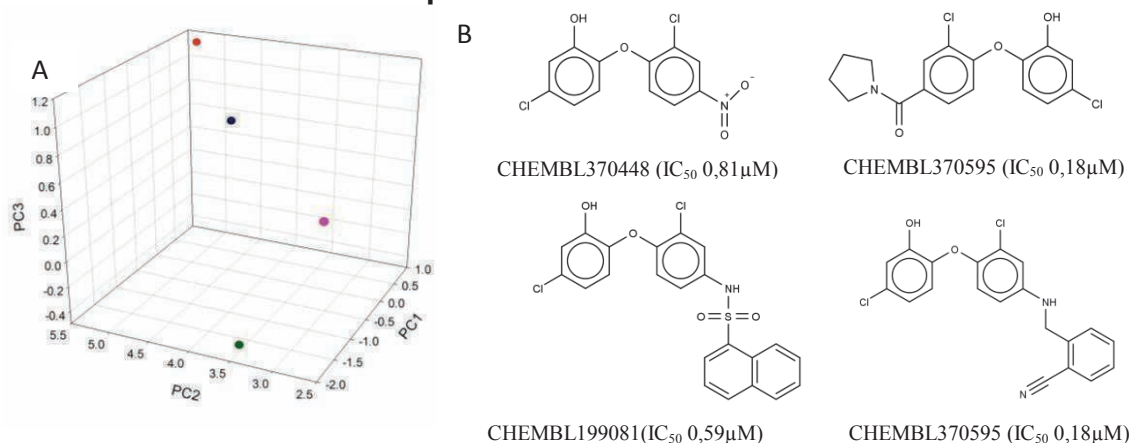
Foram selecionados 32 inibidores de Enoil-ACP Redutase, no ChEMBL e em artigos da literatura, com IC<sub>50</sub><1µM. Esses dados de atividade foram obtidos nos artigos de referência, com base em testes *in vitro*, com a enzima PfENR purificada.

Esses inibidores foram submetidos ao servidor *ChemGPS-NP* e posteriormente agrupados em clusters de até 2Å, com o intuito de garantir a diversidade química no filtro de similaridade com base na distância euclidiana. Dessa forma, foi possível selecionar 4 inibidores (CHEMBL370595, CHEMBL370448, CHEMBL200492, CHEMBL199081- Figura 2) com quimiotipos diferentes.

Os quatro clusters formados foram comparados com o banco de dados composto por 84 moléculas de flavonoides obtidos no NuBBE. Os resultados apontaram que 64 moléculas estavam a no máximo 5Å de distância de pelo menos um dos quatro clusters. Essas seleções permitem garantir que as moléculas escolhidas apresentam similaridade físico-química com os inibidores conhecidos para PfENR.

Compostos com propriedades químicas semelhantes apresentam grande probabilidade de possuírem atividade biológica semelhante. Sendo assim, quando se posiciona uma biblioteca de compostos no ChemGPS-NP é possível localizar os que se encontram mais próximo dos compostos ativos, excluindo aqueles que se encontram fora da “área ativa”. Essa análise de similaridade pode ser auxiliada utilizando medidas de distância simples como a Distância Euclidiana (ROSEN *et al.*, 2009a).

**Figura 2 – Mapeamento da localização espacial baseada nos componentes principais gerados pela plataforma *on line ChemGPS-NP* dos inibidores de PfENR. A-Localização espacial dos 4 inibidores selecionados com quimiotipos diferentes. B- Estrutura química dos 4 inibidores de PfENR.**

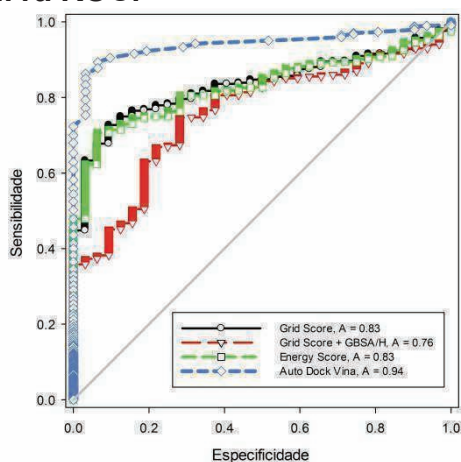


O mapa obtido no SigmaPlot 12.0 possibilitou analisar as três primeiras dimensões: PC1 representa o tamanho, forma e polarizabilidade, PC2 corresponde à aromaticidade e propriedades de conjugação afins e PC3 descreve lipofilicidade, polaridade e capacidade de ligação de Hidrogênio (ROSEN *et al.*, 2009b).

O modelo farmacofórico gerado por Costa Jr. *et al.*, (2014) apresenta três características essenciais para inibição da enzima PfENR: duas regiõesceptoras de hidrogênio e uma região hidrofóbica. Sendo assim, as 64 moléculas selecionadas a partir da similaridade química foram submetidas a esse modelo farmacofórico. Todas as moléculas que alinharam com o modelo farmacofórico foram consideradas para a realização do acoplamento molecular. Esse filtro possibilitou a retirada de moléculas que não possuem requisitos necessários para o reconhecimento molecular frente ao receptor, assim, após essa etapa, o banco de flavonoides foi reduzido para 37 moléculas.

Todas as funções de pontuação utilizadas neste estudo foram analisadas através da curva ROC (Figura 4). A AUC foi utilizada como métrica de avaliação, dessa forma, quanto maior a AUC melhor o desempenho da função de pontuação em diferenciar os compostos ativos dos inativos e, conseqüentemente, possibilitará maior exatidão na triagem virtual. Sendo assim, com base nos valores aceitáveis de AUC entre 0,5 e 1, foi proposta por Matsubara (2008) uma classificação para facilitar a interpretação dos valores de AUC: Excelente: 0,9 - 1; Bom: 0,8 - 0,9; Razoável: 0,7 - 0,8; Ruim: 0,6 - 0,7; Insignificante: 0,5 - 0,6.

**Figura 17 – Avaliação das funções de pontuação quanto à capacidade de recuperar os ligantes (verdadeiros positivos) frente aos decoys (falsos positivos), através da curva ROC.**



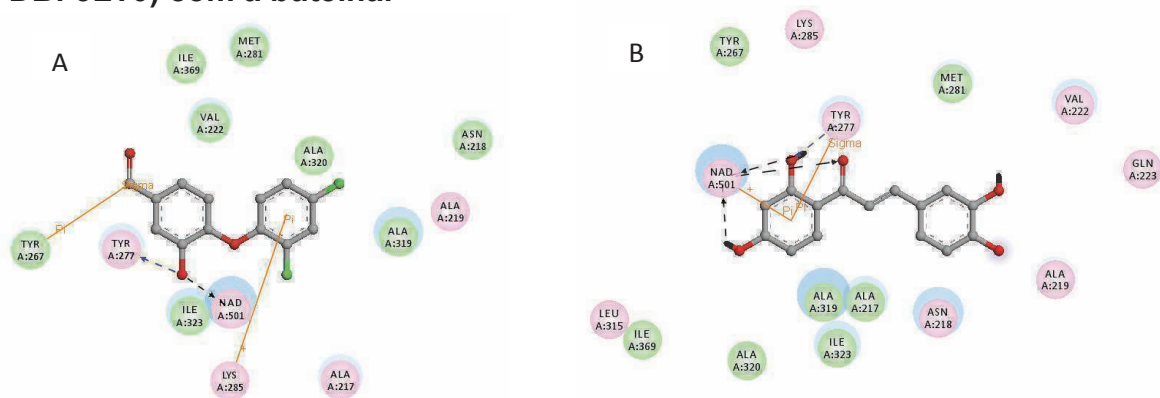
As moléculas selecionadas na triagem virtual baseada no ligante foram submetidas ao acoplamento molecular, utilizando o programa AutoDock Vina 1.2 que apresentou a melhor exatidão. Os resultados com as moléculas que apresentaram as melhores energias de ligação foram ranqueadas nas 10 melhores do banco de dados NuBBE.

A energia de afinidade do inibidor cristalográfico com o sítio ativo da enzima PfENR, calculada pelo AutoDock Vina foi de -8,4 Kcal/mol. Na comparação com as 10 moléculas do banco NuBBE de flavonoides isolados de plantas, observa-se que apenas as duas primeiras colocadas no rank, buteína (-9,0 Kcal/mol) e Apigenina (-8,6 Kcal/mol), apresentam melhores valores de energia que o inibidor cristalográfico, e o 3º colocado no rank, 7,4'-Dihidroxiavona (-8,4 Kcal/mol), possui uma afinidade equivalente. Os demais flavonoides mostram afinidade inferior ao inibidor, contudo, não se pode descartá-los, visto que, não foi utilizado nenhum parâmetro estatístico para comparação dessas energias. Dessa forma, essa inferência serve para mostrar que as moléculas selecionadas são potenciais inibidores frente à PfENR, sendo,



portanto, excelentes candidatos aos testes *in vitro*. Contudo, é de grande relevância analisar também outros fatores, como a facilidade de obtenção dessas moléculas.

**Figura 4 – Mapa das interações intermoleculares em duas dimensões (2D). A- Enzima PfENR (PDB: 3LT0) com o inibidor cristalográfico; B- Enzima PfENR (PDB: 3LT0) com a buteína.**



## Conclusões

A triagem virtual permitiu reduzir a quantidade de moléculas a serem submetidas a testes *in vitro*, promovendo consequentemente uma redução nos custos dessas análises. Sendo assim, finalizou-se a triagem com 37 moléculas de flavonoides isolados de plantas, oriundas do banco de dados NuBBE, sendo que, todas essas moléculas apresentam potencial inibitório frente PfENR. As 37 moléculas de flavonoides que tiverem disponibilidade da planta para identificação e isolamento, serão submetidas a testes *in vitro*.

Vale ressaltar, que os valores de energia servem para nortear a escolha das moléculas potenciais, contudo não devem ser utilizados como única determinação na seleção de compostos.

**Palavras-Chave:** PfENR. Malária. Flavonoides.

## Agradecimentos

À CAPES, ao CNPq e à FAPESB pelo apoio financeiro.

## Referências Bibliográficas

BENTO, A.P.; GAULTON, A.; HERSEY, A.; BELLIS, L.J.; CHAMBERS, J.; DAVIES, M.; KRUGER, F.A.; LIGHT, Y.; MAK, L.; MCGLINCHEY, S.; NOWOTKA, M.; PAPADATOS, G.; SANTOS, R.; OVERINGTON, J.P. The ChEMBL bioactivity database: an update. **Nucleic Acids Research**, v.42, p.1083-1090,2014.

BROZELL, S.R.; MUKHERJEE, S.; BALIUS, T.E.; ROE, D.R.; CASE, DA; RIZZO, RC. Evaluation of DOCK 6 as a pose generation and database enrichment tool. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 26, p.749–773, 2012.



COHEN, N.C. The Molecular Modeling Perspective in Drug Design. **Guidebook on Molecular Modeling in Drug Design**. v.1, p. 1-17, 1996.

COSTA JÚNIOR, D.B.; ARAÚJO, J.S.C.; OLIVEIRA, L.M.; LEITE, F.H.A. Pharmacophore studies for Plasmodium falciparum enoyl-ACP reductase (PfENR) inhibitors. In: THE 7<sup>TH</sup> BRASILIAN SYMPOSIUM ON MEDICINAL CHEMISTRY (BrazMedChem), CAB-069, 2014, Campos do Jordão. **Anais**. 2014.

DIAS, C.L.; DESSOY, M.A.; GUIDO, G. O.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Doenças tropicais negligenciadas: uma nova era de desafios e oportunidades. **Química Nova**, v.36, p. 1552-1556, 2013.

FAWCETT, T. An introduction to ROC analysis. **Pattern Recognition Letters**, v.27, p.861–874, 2006.

FERREIRA, R.S.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A.D. Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: oportunidades e desafios em p&d de fármacos. **Química Nova**, v. 34, p.1770-1778, 2011

FRANÇA, T.C.C.; DOS SANTOS, M.G.; FIGUEROA-VILLAR, J.D. Malária: Aspectos Históricos e Quimioterapia. **Química Nova**, v.31, p. 1271-1278, 2008.

KUNTZ, I.D.; BLANEY, J.M.; OATLEY, S.J.; LANGRIDGE, R.; FERRIN, T.E. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. **Journal Molecular Biological**, v.161, p. 269-288, 1982.

LANG, P.T.; BROZELL, S.R.; MUKHERJEE, S.; PETTERSEN, E.T.; MENG, C.E.; THOMAS, V.; RIZZO, R.C.; CASE, D.A.; JAMES, T.L.; KUNTZ, I.D. DOCK 6: Combining techniques to model RNA–small molecule complexes. **RNA**, v.15, p.1219-1230, 2009.

LANG, P.T.; MOUSTAKAS, D.; BROZELL, S.; CARRASCAL, N.; MUKHERJEE, S.; BALIUS, T.; ALLEN, W.J.; HOLDEN, P.; PEGG, S.; RAHA, K.; SHIVAKUMAR, D.; RIZZO, R.; CASE, D.; SHOICHET, B.; KUNTZ, I. DOCK 6.7 Users Manual. **Regents of the University of California**, 2015.

LARSSON, J.; GOTTFRIES, J.; MURESAN, S.; BACKLUND, A.J. ChemGPS-NP: tuned for navigation in biologically relevant chemical space. **Journal of Natural Products**. v.70, p.789-794, 2007.

MATSUBARA, E.T. **Relações entre Ranking, Análise ROC e Calibração em Aprendizado de Máquina**. 2008. 149f. Tese (Doutorado em ciências de computação e matemática computacional). Instituto de Ciências Matemáticas e de computação. USP. São Carlos.

MENG, E.C.; SHOICHET, B.K.; KUNTZ, I.D. Automated docking with grid-based energy evaluation. **Journal of Computational Chemistry**, v.13; p.505-524, 1992.

MUENCH, S.P.; RAFFERTY, J.B.; MCLEOD, R.; RICE, D.W.; PRIGGE, S.T. Expression, purification and crystallization of the *Plasmodium falciparum* enoyl reductase. **Acta Crystallographica**, v.59, p.1246-1248, 2003.

MYSINGER, M. M.; CARCHIA, M.; IRWIN, J.J.; SHOICHET, B.K. Directory of Useful Decoys, Enhanced (DUD-E): Better Ligands and Decoys for Better Benchmarking. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 55, p.6582–6594, 2012.

NTIE- KANG, F.; ONGUÉNE, P.A.; LIFONGO, L.L.; NDOM, J.C.; SIPPL, W.; MBAZE, L.M. The potencial of anti-malarial compounds derived from African medicinal plants, part II: a pharmacological evaluation of non-alkaloids and non-terpenoids. **Malaria Journal**, v.13, 2014.

RICHARDS, F. M. Areas, volumes, packing, and protein structure. **Annual Reviews Biophysics And Bioengineering**. v. 6, p. 151-176, 1977.

RODRIGUES, R.P.; MANTOANI, S.P.; DE ALMEIDA, J.R.; PINSETTA, F.R.; SEMIGHINI, E.P.; DA SILVA, V.B.; DA SILVA, C.H.P. Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos. **Revista Virtual Química**, v. 4, p. 739-776, 2012.

ROSÉN, J. **CHEMGPS-NP and the Exploration of Biologically Relevant Chemical Space**. 2009a. 72f. Dissertations (Doctor of Philosophy) Acta Universitatis. Faculty of Pharmacy. Uppsala University, Uppsala, Sweden.

ROSÉN, J.; LÖVGREN, A.; KOGEJ, T.; MURESAN, S.; GOTTFRIES, J.; BACKLUND, A. ChemGPS-NPWeb: chemical space navigation online. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 23, p. 253-259, 2009.

ROSÉN, J.; LÖVGREN, A.; KOGEJ, T.; MURESAN, S.; GOTTFRIES, J.; BACKLUND, A. ChemGPS-NPWeb: chemical space navigation online. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 23, p. 253-259, 2009b.

SÁ, M.S. **Avaliação da atividade antimalárica de substâncias obtidas de espécies vegetais nativas ou endêmicas do semi-árido brasileiro e derivados sintéticos**, 2011. 128p. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Centro de pesquisas Gonçalo Muniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador-Bahia.

SYBYL-x 2.0. **Discovery Software for Computational Chemistry and Molecular Modelling**, Tripos Inc, St. Louis, MO, USA, 2012.

TASDEMIR, D.; LACK, G.; BRUN, R.; RUEDI, P.; SCAPOZZA, L.; PEROZZO, R. Inhibition of *Plasmodium falciparum* Fatty Acid Biosynthesis: Evaluation of Fab G, Fab Z, and Fab I as Drug Targets for Flavonoids. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 3345-3353, 2006.

TROTT, O.; OLSON, A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computacional Chemistry**, v.31, p.455-461, 2010.

VALLI, M.; DOS SANTOS, R.N.; FIGUEIRA, L.D.; NAKAJIMA, C.H.; CASTRO-GAMBOA, I.; ANDRICOPOULO, A.D.; BOLZANI, V.S. Development of a Natural

Products Database from the Biodiversity of Brazil. **Journal of Natural Products**. v.76, p. 439-444, 2013.

WALTERS, W.P.; STAHL, M.T.; MURCKO, M.A. Virtual Screening An overview. **Drug Discovery Today**, v. 3, p. 160-178. 1998.

WHITE, N.J.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; HIEN, T.T.; FAIZ, M.A.; MOKUOLU, O.A.; DONDORP, A.M. Malaria. **Seminar**, v.383, p.723-735, 2014.

WHO - World Health Organization. Emergence and spread of artemisinin resistance calls for intensified efforts to withdraw oral artemisinin-based monotherapies from the market. **Global Malaria Programme**, 2014.

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro* DE EXTRATOS DE  
*Schinopsis brasiliensis* CONTRA MICRORGANISMOS  
FITOPATOGÊNICOS DE INTERESSE NA AGRICULTURA**

## **ATIVIDADE ANTIMICROBIANA IN VITRO DE EXTRATOS DE *Schinopsis brasiliensis* CONTRA MICRORGANISMOS FITOPATOGÊNICOS DE INTERESSE NA AGRICULTURA**

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

Poliana Gonçalves Guimarães<sup>1</sup>; Ronan Batista<sup>2</sup>; Quelmo Silva de Novaes<sup>3</sup>; Pedro Costa Campos Filho<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Professora da Universidade do Estado da Bahia, UNEB; Bióloga; Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, UESB, [pgguimaraes@uneb.br](mailto:pgguimaraes@uneb.br)

<sup>2</sup> Professor do Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, UFBA, orientador, [ronbatis@ufba.br](mailto:ronbatis@ufba.br)

<sup>3</sup> Professor do Departamento de Fitotecnia e Zootecnia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, UESB, co-orientador, [gsnovaes@uesb.edu.br](mailto:gsnovaes@uesb.edu.br)

<sup>4</sup> Professor do Departamento de Estudos Básicos e Instrumentais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, UESB, [pedrobiomedico@yahoo.com.br](mailto:pedrobiomedico@yahoo.com.br)

### **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).

Amaral e Bara (2005) ressaltam a intensa procura por novos agentes antimicrobianos a partir de plantas, devido à crescente resistência dos microrganismos patogênicos frente aos produtos sintéticos. Buscando diminuir estes prejuízos causados pelos pesticidas, alternativas vem sendo pesquisadas para o controle de fitopatógenos. Uma dessas alternativas segundo Di Piero et al. (2010) é a exploração da atividade biológica de metabólitos secundários presentes em extratos vegetais brutos e óleos essenciais de plantas medicinais da flora nativa. 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).

*Schinopsis brasiliensis* Engl. (baraúna) é uma espécie vegetal com potencial uso no controle de fitopatógenos. Ela 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. 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).

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, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de *Schinopsis brasiliensis* 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.

## **Material e Métodos**

### **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.

### **Coleta do material vegetal e preparação dos extratos**

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. As exsiccatas foram depositadas no herbário da UESB, campus de Vitória da Conquista, sob registro de n.º HUESBVC 4124.

As partes coletadas foram submetidas à secagem em estufa com circulação forçada de ar a 50°C durante 48h.

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).



## Ensaio contra fungo

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.

Foram utilizados 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.

Após a solidificação dos meios de cultura nas placas de Petri com as diferentes concentrações citadas acima, 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.

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), 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.

## Ensaio contra bactérias

Para a avaliação 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.

## 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  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. Em seguida, as microplacas foram incubadas a 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.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada após a incubação das microplacas por 24 horas em temperatura ambiente. 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.

### **Teste bactericida/bacteriostático**

Para identificar se os extratos ativos são bactericidas ou bacteriostáticos, foi preparado ágar Mueller Hinton em placas de Petri para um subcultivo de 10 µL de cada micropoço onde 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 protéica, 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).

### **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

ja é amplamente utilizado como marcador para poluição ambiental (BARAHONA e SACHEZ-FORTUM, 1999; 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 ja preparada anteriormente, obtendo concentrações de 125, 250 e 500 µg/mL dos extratos de folha, caule e raiz de baraúna, 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.

## Resultados e Discussão

A análise de variância dos dados do experimento com os extratos de *S. brasiliensis* contra o *F. solani*, demosntrou 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 1).

Analisando as médias dos diâmetros de *F. solani* na análise da interação entre os extratos de *S. brasiliensis* e suas concentrações (Tabela 1), 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>).

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.

**Tabela 1** - 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.

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 2. 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*. Desta forma, segundo os critérios de Tegos *et al.* (2002), nenhum desses extratos se mostrou 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. *citrulli* (Aac1.12), e de 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 2** - 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

Pode ser observado também o melhor desempenho do extrato da folha de *S. brasiliensis*, sendo o mesmo capaz de inibir o crescimento do microrganismo *A. avenae* subsp. *citruilli* (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 baraúna à elevada concentração de compostos fenólicos, tais como taninos e flavonoides.

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).

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*.

## Conclusões

Os extratos etanólicos do caule e das folhas de *Schinopsis brasiliensis* (baraúna) mostraram-se inativos frente ao fungo *Fusarium solani*, enquanto que o extrato das raízes foi modestamente ativo, sugerindo que esta planta não é indicada para o controle de doenças causadas por esse fitopatógeno. Por outro lado, os extratos etanólicos das folhas, caule e raiz da baraúna apresentaram atividade antibacteriana *in vitro* contra os fitopatógenos *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*,



*Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* e *Ralstonia solanacearum* (Raças 1 e 2), sendo que o extrato das folhas apresentou a atividade mais potente. Diante do ensaio de toxicidade realizado em *Artemia salina*, tais extratos foram não-tóxicos a este microcrustáceo, sugerindo que eles também sejam não-tóxicos ao meio ambiente. Este conjunto de resultados aponta a baráúna como um potencial agente alternativo no controle de doenças causadas pelas bactérias fitopatogênicas ensaiadas neste trabalho, oferecendo um menor risco à biodiversidade, à saúde dos consumidores e dos produtores agrícolas.

**Palavras-chave:** Extratos vegetais, Fitopatógenos, Baráúna, controle.

### **Agradecimentos**

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

### **Referências**

- 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.
- 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.
- 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.
- BROPHY
- 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.
- 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.
- 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.
- GRANT, D. F.; MATSUMURA, F. Glutathione S-transferase-1 in *Aedes aegypti* larvae: purification and properties. **Insect Biochemistry**, v.18, p.615–622, 1988.
- KIMATI, H.; GIMENEZ FERNANDES, N.; SOAVE, J.; KUROSZAWA, 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.
- 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.

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.

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 Toxicology**, v. 59, p. 445–454, 1997.

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.

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.

**POTENCIAL DE *Martianthus leucocephalus* (MART. EX BENTH.)  
J.F.B. PARA A FITORREMEDIAÇÃO DE COBRE E DE ZINCO**

# POTENCIAL DE *MARTIANTHUS LEUCOCEPHALUS* (MART. EX BENTH.) J.F.B. PARA A FITORREMEDIAÇÃO DE COBRE E DE ZINCO

Daniel da Silva de Jesus<sup>1</sup>; André Dias de Azevedo Neto<sup>2</sup>; Angélica Maria Lucchese<sup>3</sup> e Lenaldo Muniz de Oliveira<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Estudante do Curso de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, bolsista dasilva\_jesus@yahoo.com.br; <sup>2</sup>Professor Associado, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, UFRB, andre@ufrb.edu.br; <sup>3</sup>Professora Doutora em Química Orgânica, UEFS, angelica.lucchese@gmail.com; <sup>4</sup>Professor Doutor em Fisiologia Vegetal, Departamento de Ciências Biológicas, UEFS, lenaldo@uefs.br CAPES.

## Introdução

Ações antrópicas, como a mineração, a deposição inadequada de resíduos industriais bem como o uso de fertilizantes e agrotóxicos podem provocar considerável incremento na concentração destes dos metais nos solos (Tran et al 2013; Ovečka e Takáč, 2014).

Para diversas espécies vegetais, a biodisponibilidade destes elementos representa um risco potencial. Este tipo de estresse causa diversas alterações fisiológicas as quais prejudicam o crescimento e o desenvolvimento das plantas (Gill, 2014; Ovečka e Takáč, 2014).

Entretanto, algumas plantas podem extrair e concentrar grandes quantidades destes elementos nos seus tecidos. O termo fitorremediação normalmente é utilizado para denominar a utilização de vegetais como auxílio à remoção de poluentes em ambientes contaminados (Moosavi e Seghatoleslami, 2013). Este processo tem sido bastante investigado por ser considerado uma técnica eficiente e de baixo custo, quando comparado aos meios usuais de remediação (Vamerali et al., 2010).

A família Lamiaceae figura entre aquelas que englobam espécies vegetais potencialmente reconhecidas como fitorremediadoras (Prasad e Freitas, 2003; Zheljzakov et al., 2008). *Marthianthus leucocephalus* é uma espécie citada como uma espécie de elevado potencial fitoquímico e econômico. Estudos prévios demonstraram que esta espécie pode crescer e manter a produtividade de compostos voláteis mesmo quando expostas a níveis elevados de metais. Por outro lado, o potencial desta planta para a fitorremediação ainda não foi avaliado.

Desta maneira este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do excesso de Cd, Cu e Zn sobre o crescimento e o potencial fitorremediador de *M. leucocephalus* em ambientes contaminados com estes elementos.

## Metodologia

Estacas apicais de *M. leucocephalus*, com aproximadamente 15 cm de foram transferidas para bandejas plásticas contendo seis litros da solução nutritiva completa de Hoagland e Arnon (1950) e mantidas em estufa agrícola. Dez dias após a instalação das plantas no sistema hidropônico foram iniciados os tratamentos:

controle (0,0  $\mu\text{M}$  de metal)  $\text{CuSO}_4$  (15  $\mu\text{M}$ ) e  $\text{ZnSO}_4$  (75  $\mu\text{M}$ ). As plantas permaneceram nestas condições durante 30 dias.

As plantas foram coletadas 30 dias após a aplicação dos tratamentos com metais e separadas em folhas, caules e raízes. Em seguida, o material vegetal foi acondicionado em sacos de papel e transferido para estufa com circulação forçada de ar (60 °C) até peso constante, para determinação das massas secas da parte aérea (MSPA), raízes (MSR) e total (MST).

A extração dos compostos voláteis, em folhas secas, foi realizada em aparelho de destilação tipo Clevenger. O tempo de destilação foi de 3 h e o teor dos compostos voláteis foi quantificado pela massa de óleo em balança analítica e expresso em massa/massa (mg de óleo por 100g de matéria seca da folha).

As determinações das concentrações de Cu e de Zn foram realizadas por meio de ICP-OES (Varian Vista PRO). O fator de bioconcentração na parte aérea (FB) e na raiz (FB') foram calculados a partir da razão: concentração do metal (Cu ou Zn) nos tecidos (parte aérea ou raiz) / concentração do metal na solução nutritiva. O fator de translocação (FT) foi calculado a partir da razão: concentração dos metais na parte aérea / concentração dos metais nas raízes (Marchiol et al., 2004).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo cada repetição constituída de uma bandeja contendo quatro plantas. Os resultados foram analisados por meio de suas respectivas médias e desvios padrão.

## **Resultados e discussão**

Dentre os diversos estresses abióticos aquele causado por metais pesados é considerado um dos mais importantes, afetando seriamente o metabolismo e o crescimento vegetal. Em concordância, o excesso dos metais na solução nutritiva provocou efeito no crescimento das plantas de *M. leucocephalus* (Fig. 1). Os resultados mostraram que as plantas expostas ao excesso de Cu e Zn apresentaram uma redução na produção de MST (21%) (Fig. 1).

Adicionalmente, o estresse provocado por estes metais reduziu a massa seca de todas as partes das plantas. Comparando o efeito do estresse imposto por cada elemento em cada parte, foram verificadas diferenças. Nos espécimes submetidos ao estresse por de Cu, a MSR (28%) foi mais afetada do que a MSPA (21%) (Fig. 1). Por outro lado, nas plantas de *M. leucocephalus* expostas ao Zn os danos no crescimento de ambas as partes foi semelhante (21%) (Fig. 1). Desde que este efeito foi acompanhado de acúmulo dos níveis de Cu e de Zn (Fig. 2), pode-se sugerir que o acúmulo destes metais nos tecidos das plantas explica, ao menos em parte, os danos no crescimento desta espécie.

Com relação ao teor dos compostos voláteis de *M. leucocephalus*, os resultados não demonstraram qualquer alteração pela aplicação dos metais em níveis elevados (Fig. 1).

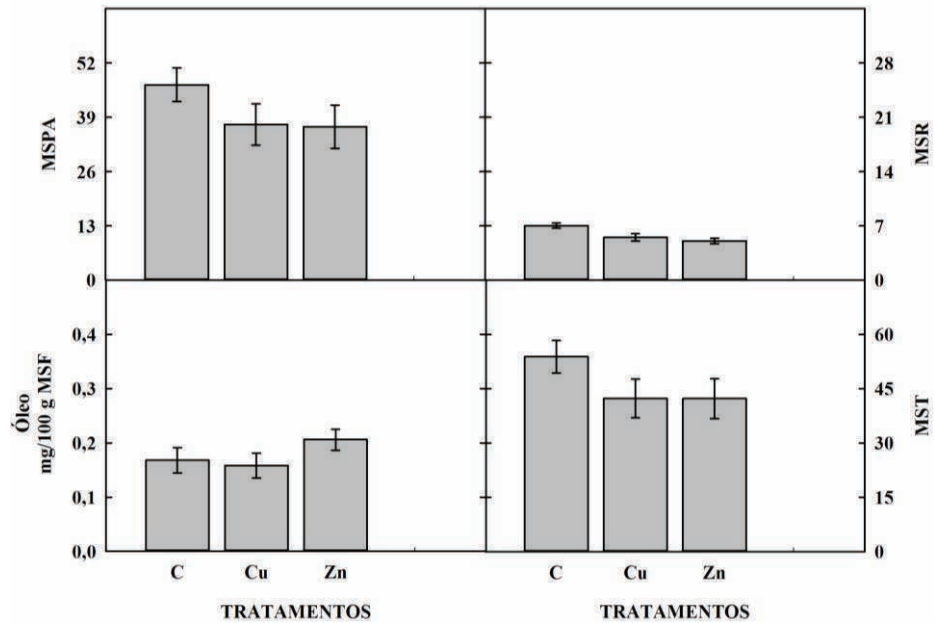


Figura 1 - Crescimento e teor de compostos voláteis em *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore submetida ao estresse por metais. MSPA (Massa Seca da Parte Aérea), MSR (Massa Seca da Raiz) e MST (Massa Seca Total). Tratamentos: C = Controle, Cu = Cobre, Zn = Zinco.

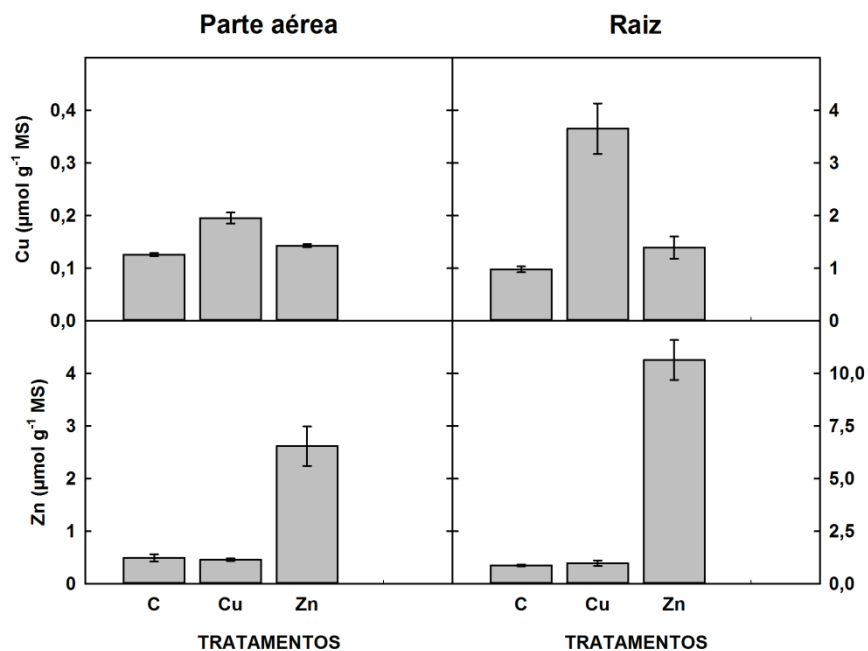


Figura 1 – Concentrações de Cu e de Zn em *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore submetida ao estresse por estes metais. Tratamentos: C = Controle, Cu = Cobre, Zn = Zinco.

Conforme demonstrado na tabela 1, os índices de bioacumulação dos metais variaram conforme a parte da planta e o metal aplicado em *M. leucocephalus*. Nas raízes estes índices foram 18 (Cu) e 3,1 (Zn) vezes maiores que aqueles estimados



nas partes aéreas. Os valores encontrados para os de bioconcentração de Cu e de Zn, especialmente nas raízes (BF'), foram consideravelmente elevados. Estes resultados sugerem que esta espécie apresenta potencial para a imobilização destes elementos (fitoestabilização) (Cui et al., 2007). Por outro lado, índices de translocação estimados abaixo de 1, como verificado nesta espécie (Tab. 1) indicam maior retenção dos metais nas raízes do que nas partes aéreas. Desta maneira, de acordo com Fitz and Wenzel (2002) *M. leucocephalus* apresenta-se como uma espécie limitada para o processo de fitoextração.

Tabela 1 - Fatores de translocação e de bioacumulação de Cu e de Zn em *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore submetida ao estresse por metais. FB (Fator de Bioconcentração Parte aérea), FB' (Fator de Bioconcentração na raiz) e FT (Fator de Translocação).

Metal aplicado	FB	FB'	FT
Cu (15 mmol.L <sup>-1</sup> )	13,025 ± 0,69	243,44 ± 31,95	0,054 ± 0,009
Zn (75 mmol.L <sup>-1</sup> )	34,87 ± 4,99	141,92 ± 12,55	0,248 ± 0,049

## Conclusão

Os resultados sugerem que *M. leucocephalus* pode ser útil como espécie fitoestabilizadora de metais em ambientes contaminados com Cu e Zn.

**Palavras - Chave:** Lamiaceae, Compostos voláteis, Fitoestabilização

**Agradecimentos:** À CAPES, FAPESB e UEFS pelo apoio financeiro e estrutural ao desenvolvimento desta pesquisa.

## Referencias bibliográficas

Cui, S.; Zhou, Q.; Chao, L. Potential hyperaccumulation of Pb, Zn, Cu and Cd in enduring plants distributed in an old smeltery, northeast China. *Environmental Geology*, v. 51, n. 6, pp. 1043-1048, 2007.

Fitz, W. J., Wenzel, W. W. Arsenic transformations in the soil-rhizosphereplant system: Fundamentals and potential application to phytoremediation. *Journal of Biotechnology*, v. 99, 259-278, 2002.

Gill, M. Heavy metal stress in plants: a review. *International Journal of Advanced Research*. v. 2, n. 6, pp. 1043-1055, 2014.

Hoagland, D.R.; Arnon, D.I. The water culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular*, v. 347, p. 1-32, 1950.

Marchiol, L.; Sacco, P.; Assolari, S.; Zerbi G. Reclamation of polluted soil: phytoremediation potential of crop-related Brassica species. *Water Air Soil Pollut.*, v. 158, pp. 345-356, 2004.

Moosavi, S. G.; Seghatoleslami, M. J. Phytoremediation: A review. *Advance in Agriculture and Biology*, v. 1, n. 1, pp. 5-11, 2013.

Ovečka, M.; Takáč, T. Managing heavy metal toxicity stress in plants: Biological and biotechnological tools *Biotechnology Advances*. v. 32, n. 1, pp. 73-86, 2014.

Prasad, M. N. V.; Freitas, H. M. de O. Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 6, n. 3, 2003.

Tran, T. A.; Vassileva, V.; Petrov, P.; Popova, L. P. Cadmium-induced structural disturbances in *Pisum sativum* leaves are alleviated by nitric oxide. *Turkish Journal of Botany*. v. 37, n. 4, pp. 698-707, 2013.

Vamerali, T.; Bandiera, M.; Mosca, G. Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land. A review. *Environmental Chemistry Letters*, v. 8, n. 1, pp. 1-17, 2010.

Zheljazkov, V. D.; Jeliaskova, E. A.; Kovacheva, N.; Anatoli Dzhurmanski Metal uptake by medicinal plant species grown in soils contaminated by a smelter. *Environmental and Experimental Botany*, v. 64, n. 3, pp. 207-216, 2008.

**VARIABILIDAD GENÉTICA DE LAS POBLACIONES  
CANTÁBRICAS DE *Gentiana lutea* L. VAR. *Aurantiaca* (M.  
LAINZ) M. LAINZ. UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES  
ISSR**

# VARIABILIDAD GENÉTICA DE LAS POBLACIONES CANTÁBRICAS DE *GENTIANA LUTEA* L. VAR. *AURANTIACA* (M. LAINZ) M. LAINZ. UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES ISSR

Oscar González-López<sup>1</sup>, Carlos Polanco<sup>2</sup>, Zsuzsanna György<sup>3</sup>, Iman Mirmazloum, Sara Mayo<sup>1</sup>, Alvaro Rodríguez<sup>1</sup>, Paulo H. da Silva<sup>1</sup>, Andrzej Pedryc<sup>3</sup> and Pedro A. Casquero<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Recursos Naturales, Departamento de Ingeniería y Ciencias Agrarias Universidad de León, Av. Portugal 41, 24071 León

<sup>2</sup> Área de Genética, Fac. Ciencias Biológicas y Ambientales, Univ. de León, 24071 León

<sup>3</sup> Department of Genetics and Plant Breeding, Corvinus University of Budapest, Budapest

## 1. INTRODUCCIÓN

*Gentiana lutea* L. se encuentra en los pastizales y laderas de las montañas en los pisos altimontano y subalpino del centro y sur de Europa y de Asia Menor. En España se encuentra en el Pirineo, desde Cataluña hasta el País Vasco, en la Cordillera Cantábrica hasta Galicia y en las montañas del Sistema Central. La raíz de genciana se utiliza en medicina tradicional, forma parte de los ingredientes en la elaboración de bebidas alcohólicas “bitters” y vermouths, bebidas no alcohólicas y, en la elaboración de postres e infusiones. En veterinaria se ha usado tradicionalmente como cicatrizante, antiparasitario y para estimular la ingesta, utilizándolo como aditivo en piensos. Estos usos han llevado a una sobreexplotación de las poblaciones silvestres. Debido al lento crecimiento de esta especie y a ser explotada por sus sistema radicular ha hecho que se haya prohibido su recolección, o este controlada, en diferentes países de toda Europa.

El conocimiento de la diversidad y la estructura genética de las poblaciones es especialmente importante en especies de plantas amenazadas, ya que permite adoptar prácticas de conservación efectivas y eficientes, además de orientar en la toma de decisiones en cuanto a su manejo genético. Aunque existen diferentes estudios botánicos (Ho e Liu, 2001) y fitoquímicos (Carnat *et al.*, 2005) sobre *Gentiana lutea* L., la variabilidad genética a nivel de poblaciones continúa siendo desconocida hasta la fecha.

Con el siguiente trabajo se estudia por primera vez para *Gentiana lutea* L. var. *aurantiaca*, el grado de diversidad genética dentro y entre poblaciones silvestres la Cordillera Cantábrica, así como las relaciones y las variaciones genéticas entre las poblaciones de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* respecto de otras poblaciones de *Gentiana lutea* L. subsp. *lutea* y *Gentiana lutea* L. subsp. *vardjanii* recolectadas en los Pirineos y Alpes Dolomitas.

El conocimiento detallado de la diversidad y variación genética dentro y entre estas poblaciones, no sólo incrementa nuestro conocimiento de la dinámica de poblaciones, su adaptación y evolución, sino que además proporcionará una importante información para la conservación biológica de la especie amenazada *G. lutea* L.

## 2. MATERIAL y MÉTODOS

### 2.1. MATERIAL VEGETAL

Se han recogido muestras de raíz de 123 individuos de *G. lutea*, correspondiendo a tres regiones (Tabla 1): ocho individuos de cada una de las diez poblaciones de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*, provenientes de la Cordillera Cantábrica (noroeste de la Península Ibérica), una muestra de cada una de las 15 poblaciones que fueron muestreadas a lo largo de los Pirineos (*G. lutea* L. subsp. *lutea*), y 5 individuos de cada una de las cuatro poblaciones de *G. lutea* L. subsp. *vardjanii* recolectadas en los Alpes Dolomitas (Italia). Además, se han analizado ocho muestras de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* procedentes de una parcela de cultivo regular establecida en 2009 en la Cordillera Cantábrica (Puerto de la Magdalena, Murias de Paredes (León)).

Las poblaciones muestreadas están situadas entre los 1170 y los 1904 metros de altitud. Estas poblaciones se encuentran registradas en el Herbario Jaime Andrés Rodríguez, de la Universidad de León, donde se otorgó un código (LEB-GERM (LG)) a cada una de las poblaciones (Tabla 1). Las muestras de raíz se secaron en una estufa a 38°C durante 72 horas para evitar la degradación del material genético por elevadas temperaturas. Las raíces secas se almacenaron dentro de envases de vidrio con sílica gel para evitar su rehidratación, ya que la genciana es muy higroscópica.

Tabla 1: Poblaciones de *G. lutea* L. muestreadas.

Localización	Código de pob población	Latitud (N)	Longitud	Altitud	Nº
Matalavilla	LG16	42°52'13"	06°23'06"W	1794	8
Lumajo	LG17	42°59'14"	06°15'33"W	1396	8
Torre de Babia	LG18	43°00'47"	06°05'59"W	1801	8
Senra	LG19	42°50'07"	06°11'25"W	1724	8
Leitariegos	LG20	42°59'18"	06°25'26"W	1880	8
Pontón	LG21	43°06'02"	05°00'29"W	1278	8
Valdeteja	LG22	42°56'28"	05°27'34"W	1419	8
Tonín	LG23	43°00'15"	05°41'00"W	1294	8
Treinca	LG24	42°09'30"	06°44'29"W	1727	8
Telero	LG25	42°21'20"	06°25'22"W	1867	8
Campo de cultivo	CT1	42°52'09"	06°12'49"W	1439	8
Collada de Tosas 1	LG1	42°20'53"	01°59'08"E	1738	1
Collada de Tosas 2	LG2	42°20'29"	02°01'49"E	1654	1
La Molina	LG3	42°17'13"	02°02'07"E	1578	1
La Bonaigua	LG4	42°40'10"	00°58'11"E	1813	1
Salardu	LG5	42°40'20"	00°54'58"E	1516	1
Montgarri	LG6	42°45'27"	01°01'58"E	1602	1
Montgarri 2	LG7	42°45'33"	01°01'14"E	1588	1
Baqueira	LG8	42°43'31"	00°55'59"E	1764	1
Sant Maurici	LG9	42°39'28"	00°55'24"E	1516	1
Artiga de Lin	LG10	42°40'50"	00°42'24"E	1458	1
Senet	LG11	42°36'23"	00°46'01"E	1487	1
Cerler 1	LG12	42°33'55"	00°34'01"E	1902	1
Cerler 2	LG13	42°33'43"	00°34'03"E	1892	1
Garaioa	LG14	42°53'23"	01°13'51"W	1170	1
Formigal	LG15	42°47'45"	00°24'11"W	1701	1
Bondone	LG27	46°00'34"	11°02'50"E	1557	5
Peller	LG28	46°19'04"	10°57'34"E	1904	5
Tremalzo	LG29	45°50'15"	10°41'23"E	1694	5
Brentónico	LG30	45°47'16"	10°54'04"E	1482	5

LG: referencia LEB-GERM otorgada a las muestras depositadas en el Herbario Jaime Andrés Rodríguez, de la Universidad de León; CT: cultivo. Nº: Número de muestras

### 2.2. EXTRACCIÓN DE DNA

El DNA genómico de cada individuo se extrajo a partir de 0,2 g de raíz seca molida mediante un micromolino de martillos provisto de un tamiz de 1 mm de diámetro.

El protocolo de extracción utilizado está basado en el método CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) (Pirttilä *et al.*, 2001). La concentración y calidad del ADN fue comprobada mediante un espectrofotómetro NanoDrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) y en geles de agarosa al 1%.

### 2.3. AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES ISSR

Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron en un volumen de 15 µl, conteniendo éste: 1,5 µl de DNA genómico (100 ng/µl), 1,5 µl de 10X DreamTaq Green Buffer (Thermo Scientific, USA), 0,5 µl de MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, 0,3 µl de dNTP mix 0,02 mM, 2 µl del cebador ISSR correspondiente (5 µmol/µl), 0,05 µl de DreamTaq Green DNA Polymerase 5U/µl (Thermo Scientific, USA) y 9,15 µl de agua destilada estéril.

Se seleccionaron dieciséis cebadores ISSR del set N°.9 del UBC (Biotechnology Laboratory, University of British Columbia, Canadá) a partir de estudios previos publicados en otras gentianáceas (Ge *et al.*, 2005; Zhang, Yuan e Ge, 2007; Zheng, Zhang e Wang, 2011; Gómez-Gómez *et al.*, 2012). Estos dieciséis cebadores se probaron con muestras de DNA de *G. lutea* L. Nueve de ellos (UBC 807, 809, 810, 812, 817, 825, 827, 842, y 857) (Tabla 2) proporcionaron patrones de bandas claros y reproducibles. Para la amplificación de las bandas de ISSR se utilizó el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C durante 1 min, seguida de 45 ciclos: 94 °C durante 30 s, 50 °C durante 30 s, 72 °C durante 2 min. Síntesis final: 10 min a 72°C.

**Tabla 2:** Secuencias de los cebadores ISSR de UBC (University of British Columbia) utilizados.

ISSR	Secuencia 5' - 3'
807	AGA GAG AGA GAG AGA GT
809	AGA GAG AGA GAG AGA GG
810	GAG AGA GAG AGA GAG AT
812	GAG AGA GAG AGA GAG AA
817	CAC ACA CAC ACA CAC AA
825	ACA CAC ACA CAC ACA CT
827	<b>ACA CAC ACA CAC ACA CG</b>
842	GAG AGA GAG AGA GAG AYG
857	ACA CAC ACA CAC ACA CYG

Los productos de la PCR se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% (p/v), teñidos con bromuro de etidio (0,5 µl/100ml tampón). Como tampón de la electroforesis se ha utilizado TBE (Tris-borato-EDTA 1X; Tris 0,9 M pH 8,0; ácido bórico 0,9 M, EDTA 20 mM). Estos productos de la PCR fueron separados entre dos y tres horas (dependiendo del marcador ISSR utilizado) a 100 V.

### 2.4. ANÁLISIS DE DATOS

Las fotografías de la separación de los fragmentos ISSR amplificados se analizaron con la ayuda del software Total Lab 1.2 (TotalLab Ltd<sup>®</sup>, United Kingdom). Cada banda se trató como un elemento binario, considerando como presente (1) o ausente (0), y suponiendo que cada banda corresponde al fenotipo en un solo locus bialélico. Se utilizó el software Popgene versión 1.32 para calcular los parámetros: porcentaje de loci polimórficos (PPL), número de alelos observados (Na), número efectivo de alelos (Ne) (Nei, 1973), diversidad genética (He), e índice de Shannon (I) (Lewontin, 1972).

La estructura de las poblaciones se estudió mediante diferentes métodos. Primero, se obtuvo un cladograma no enraizado mediante el método de *neighbor-joining* (Saitou e Nei, 1987), basado en la matriz de distancias genéticas entre poblaciones (Nei, 1972).



Para ello se utilizó el módulo NEIGHBOR del software PHYLIP. A partir del cálculo de la matriz de diversidad genética entre poblaciones  $Q_{xy}$  (Nei e Kumar, 2000), se realizó un segundo cladograma utilizando las distancias genéticas (estimadas como  $1 - Q_{xy}$ ). El árbol consenso se obtuvo utilizando el módulo CONSENSE del software PHYLIP.

El agrupamiento de las poblaciones se realizó también mediante un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA), basado en la matriz de distancias genéticas de Jaccard entre los individuos. Para este análisis se utilizó el software multiplataforma *Genetic Analysis in Excel* (GenAEx) versión 6.5.

Por último, se utilizó el software *Structure* versión 2.3.4, que identifica grupos de individuos relacionados a partir de genotipos multilocus. Cada individuo fue asignado (probabilísticamente) a un grupo, o conjuntamente a dos o más grupos si su haplotipo indica que es mezcla. Para elegir el número ideal de grupos genéticos (K), se probaron múltiples valores. Los resultados se analizaron con la herramienta Structure Harvester que implementa el método de Evanno, Regnaut & Gaudet (2005) para detectar el verdadero número de grupos (K) en un conjunto no homogéneo de muestras.

Para comprobar la correlación entre las distancias genéticas y geográficas entre las poblaciones analizadas, se realizó el test de Mantel calculando 999 permutaciones mediante el uso del software GenAEx (versión 6.5).

### 3. RESULTADOS

La amplificación de los fragmentos ISSR en los 123 individuos analizados, utilizando nueve marcadores, produjo 106 bandas reproducibles e inequívocas. Se encontraron entre 5 y 17 bandas por cada uno de los marcadores utilizados (11,7 bandas de media por marcador). De todas ellas, 95 bandas (89,6%) resultaron ser polimórficas (Tabla 3); 46 (43,4%) fueron encontradas en individuos de las tres zonas geográficas estudiadas, mientras que 21 (19,8%), 3 (2,8%), y 12 (11,3%) de las bandas fueron detectadas únicamente en las poblaciones de la Cordillera Cantábrica (*G. lutea* L. var. *aurantiaca*), Pirineos (*G. lutea* L. subsp. *lutea*) y Alpes Dolomitas (*G. lutea* L. subsp. *vardjanii*), respectivamente. Respecto de la variedad *aurantiaca*, las poblaciones silvestres LG16, LG22 y LG25, así como las muestras provenientes de la parcela de cultivo (CT3), mostraron uno, dos, uno y tres loci exclusivos para ellas respectivamente.

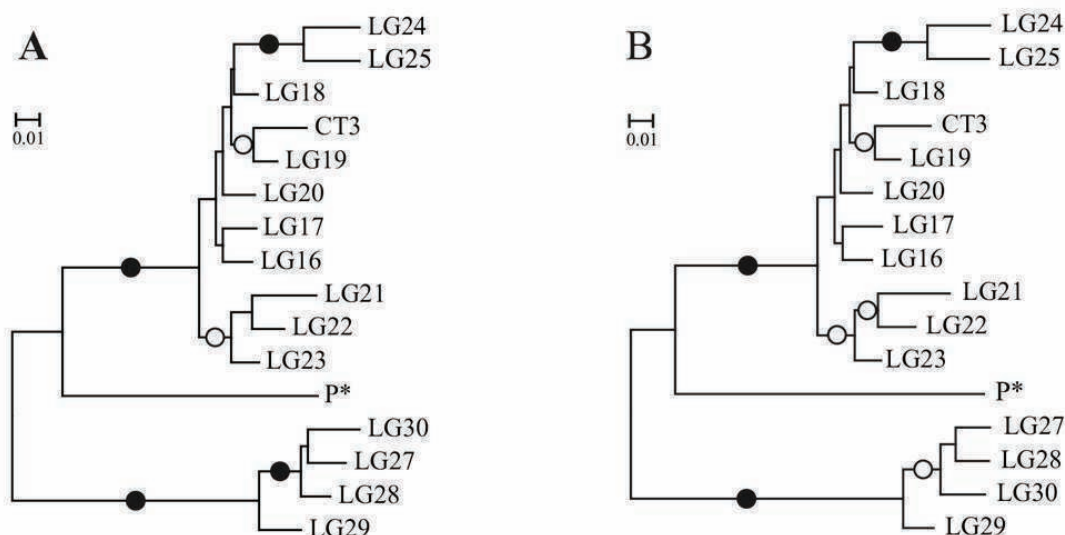
Para estudiar la variabilidad genética inter e intrapoblacional (Tabla 3), las 15 muestras obtenidas en los Pirineos fueron consideradas como una única población. Los porcentajes de loci polimórficos para una única población varían entre el 14,2% (LG30) y el 38,7% (LG22), con un valor medio del 25,4%. Los valores medios más elevados correspondieron a las poblaciones de los Pirineos (28,3%) y Cordillera Cantábrica (27,8%), mientras que para las provenientes de los Dolomitas el valor únicamente fue de un 18,2%. La diferencia en estos valores puede ser debida al distinto número de muestras analizadas para cada una de las poblaciones. La diversidad genética promedio estimada a nivel de población fue del 0,09, mientras que a nivel de especie fue de 0,2168. La población LG22 mostró mayor el valor de diversidad genética (0,1329) mientras que el inferior fue para la población LG30 (0,0546). El valor promedio del índice de Shannon fue 0,1342 a nivel de población y de 0,3415 a nivel de especie.

**Tabla 3:** Variación genética detectada en las poblaciones de *G. lutea* L. mediante marcadores ISSR

Región geográfica	Código población	N	n	PPL	Na	Ne	I	He
CORDILLERA CANTÁBRICA	LG16	8	33	31,13	13,113	11,743	0,1579	0,1042
	LG17	8	26	24,53	12,453	11,297	0,1192	0,0780
	LG18	8	32	30,19	13,019	11,800	0,1568	0,1046
	LG19	8	27	25,47	12,547	11,361	0,1218	0,0801
	LG20	8	29	27,36	12,736	11,530	0,1398	0,0922
	LG21	8	35	33,02	13,302	12,033	0,1716	0,1152
	LG22	8	41	38,68	13,868	12,266	0,1993	0,1329
	LG23	8	32	30,19	13,019	11,878	0,1608	0,1081
	LG24	8	21	19,81	11,981	11,264	0,1066	0,0719
	LG25	8	20	18,87	11,887	11,290	0,1082	0,0736
	CT3	8	28	26,42	12,642	11,583	0,1363	0,0911
	<b>Valores medios</b>		29,4 <sup>1</sup>	27,79	12,779	11,640	0,1435	0,0956
	<b>Grupo</b>	88	70	66,04	16,604	12,346	0,2361	0,148
PIRINEOS	<b>Grupo</b>	15	30	28,3	1,283	11,883	0,1581	0,1074
ALPES DOLOMITA	LG27	5	18	16,98	11,698	11,138	0,0964	0,0654
	LG28	5	24	22,64	12,264	11,502	0,1263	0,0856
	LG29	5	20	18,87	11,887	11,304	0,1078	0,0735
	LG30	5	15	14,15	11,415	10,978	0,0800	0,0546
	<b>Valores medios</b>		19,2 <sup>1</sup>	18,16	11,816	11,231	0,1026	0,0698
	<b>Grupo</b>	20	31	29,20	12,925	11,735	0,1499	0,1002
GLOBAL	<b>Medias globales</b>		26,9 <sup>1</sup>	25,40	12,541	11,553	0,1342	0,0900
	<b>Total</b>	123	95	89,60	18,962	13,446	0,3415	0,2168

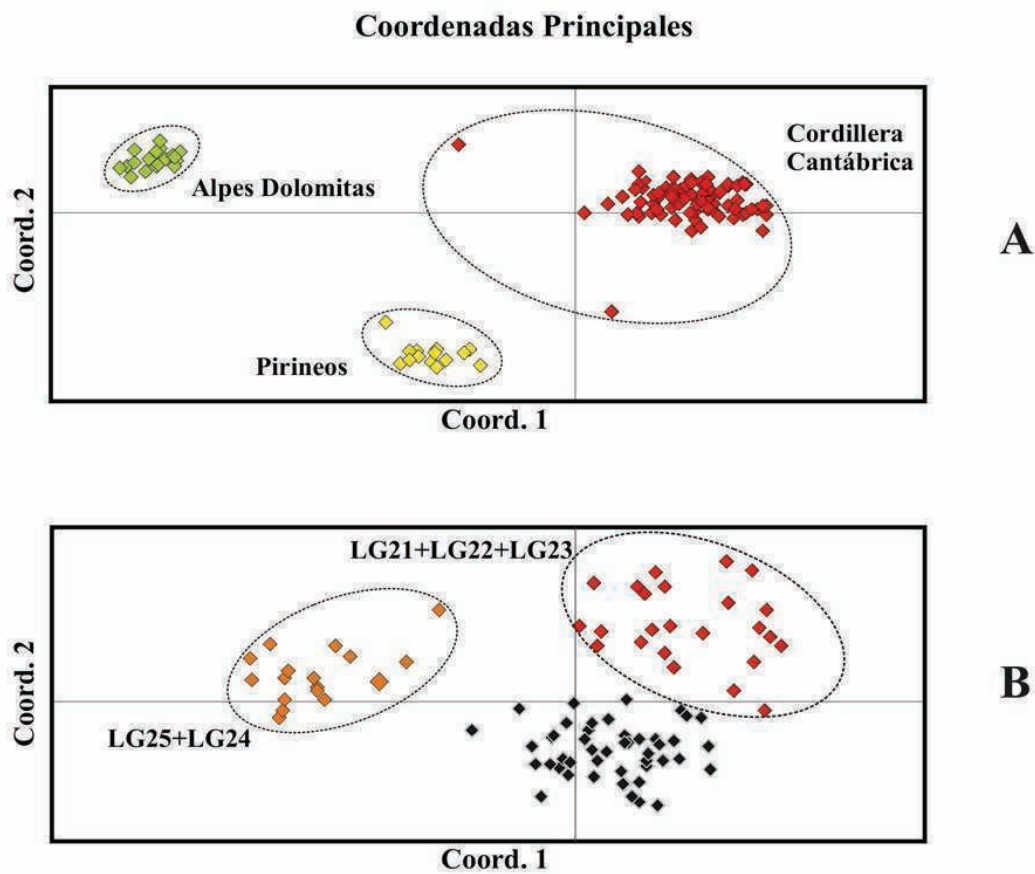
N, nº de muestras; n, nº de loci polimórficos; PPL, porcentaje de loci polimórficos; Na, nº medio de alel observado por locus; Ne, media efectiva de alelos por locus; I, índice de Shannon; He, diversidad genética de N LG: referencia LEB-GERM Herbario Jaime Andrés Rodríguez, de la Universidad de León; CT: cultivo

El análisis de la distancia genética por parejas de Nei, varió entre el 0,0261 (entre LG18 y LG20) y el 0,3998 (entre LG24 y LG27), con un valor promedio del 0,1734. El cladograma obtenido mediante el método de *neighbor-joining*, basado en las distancias genéticas de Nei, agrupó las poblaciones según las tres regiones geográficas de origen (Figura 2A), de forma casi idéntica a cuando las distancias genéticas se obtuvieron basándose en el índice de diversidad genética para marcadores dominantes  $Q_{xy}$  (Figura 2B). Para la variedad *aurantiaca*, se diferenciaron dos grupos en ambos cladogramas con elevados valores de significación en los remuestros: el grupo formado por LG24 y LG25, y el grupo formado por LG21, LG22, y LG23.



**Figura 1:** Cladogramas obtenidos mediante el método de neighbour-joining para las poblaciones de *G. lutea* L. a partir de la distancia genética de Nei (A) y la distancia  $1 - Q_{xy}$  (B). P\*: Las muestras de los Pirineos están agrupadas como una única población. Los círculos negros en los nodos indican que éstos estaban presentes entre el 90% y el 100% de los árboles generados en los remuestros, mientras que los círculos vacíos indican que el nodo estaba presente entre el 70% y el 89% de esos árboles.

En los PCoA, utilizando la matriz de distancias genéticas de Jaccard para las 123 muestras, las dos primeras coordenadas, las cuales explican respectivamente, el 40,33% y el 24,95% del total de la variabilidad genética, claramente discriminan los tres grupos geográficos representados por los individuos (Figura 2A). Además, el análisis PCoA fue realizado utilizando únicamente las 88 muestras de la variedad *aurantiaca* (Cordillera Cantábrica), mostrando un grupo claramente separado formado por los individuos de las poblaciones LG24 y LG25 (Figura 2B). En este último caso, las coordenadas representadas explican el 29,21% y 22,69% de la variación genética respectivamente. El resto de los individuos representados, provenientes de las poblaciones situadas más al este del área estudiada (poblaciones LG21, LG22 y LG23), muestran de igual manera un agrupamiento, pero, en este caso no se aprecia un límite claro que los separe de los individuos de las poblaciones restantes.

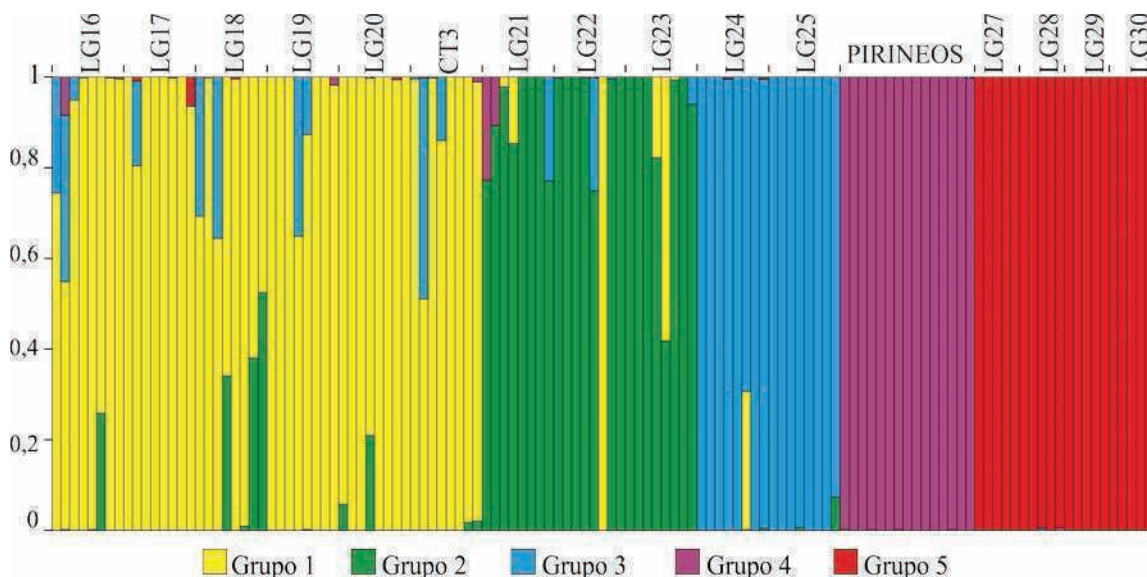


**Figura 2:** Representación gráfica del análisis de coordenadas principales (PCoA) para las dos coordenadas principales de los 123 individuos de *G. lutea* L. (A) y de los 88 individuos de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* de la Cordillera Cantábrica (B) utilizando las distancias genéticas de Jaccard entre las muestras observadas.

El análisis de los genotipos multilocus a nivel individual de cada una de las 123 muestras, utilizando el algoritmo del software Structure, mostró la mejor respuesta de agrupamiento para  $K = 5$ , con un valor de  $\Delta K = 8,15$  (siendo  $K$  el número de grupos). La Figura 4 muestra los resultados obtenidos después de realizar el análisis Bayesiano para  $K = 5$ . Todos los individuos provenientes de los Pirineos y de los Alpes Dolomitas están separados en dos grupos independientes. Los 88 individuos restantes (Cordillera Cantábrica) se asignaron a los tres grupos restantes: (i) individuos provenientes de LG24 y LG25 (poblaciones del suroeste); (ii) individuos de las poblaciones LG21, LG22

(excepto un individuo), y LG23 (poblaciones del este); (iii) individuos de las poblaciones LG16, LG17, LG18, LG19, CT3 y LG20 (poblaciones del noroeste).

El test de Mantel detectó correlaciones significativas ( $r = 0,945$ ;  $P = 0,001$ ) entre la distancia de Nei y la distancia geográfica para las 16 poblaciones (las muestras de los Pirineos fueron agrupadas como una única población con coordenadas geográficas de la población LG8). Esta correlación también resultó ser significativa cuando se analizaron las 11 poblaciones de la Cordillera Cantábrica ( $r = 0,844$ ;  $P = 0,001$ ) de manera independiente. No se observaron correlaciones significativas cuando se analizaron únicamente las cuatro poblaciones provenientes de los Dolomitas, al igual que para las muestras de los Pirineos.



**Figura 3:** Probabilidad de asignación a cada uno de los cinco grupos obtenidos mediante aproximación Bayesiana (*Structure*, versión 2. 3.4) para cada uno de los 123 individuos de *G. lutea* L. analizados. PIR: Poblaciones de los Pirineos.

#### 4. DISCUSIÓN

En este estudio se han aplicado, por primera vez, marcadores genéticos ISSR en poblaciones de *G. lutea* L. con el fin de analizar su variación genética. Además, es el primer trabajo en el que se incluyen muestras de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*.

En los análisis estadísticos realizados se han observado claras diferencias genéticas entre las muestras recogidas en los Alpes Dolomitas (*G. lutea* L. subsp. *vardjani*) y las de la Península Ibérica (*G. lutea* L. subsp. *lutea* y *G. lutea* L. var. *aurantiaca*), como era esperado debido a su clasificación taxonómica. Asimismo, los resultados de los análisis mostraron que los individuos de los Pirineos y de la Cordillera Cantábrica están claramente diferenciados (Figura 2, Figura 3A y Figura 4), apoyando la clasificación de las poblaciones cantábricas con flores rojizas, como pertenecientes a la subespecie *aurantiaca* (Lainz, 1982). El estudio revela que un elevado número de bandas ISSR (21 de 106, 19,8%) se detectaron únicamente en las plantas con flores rojizas de la Cordillera Cantábrica. Este porcentaje es, en torno al doble del obtenido en el estudio comparativo entre las especies *Gentiana atunsiensis* (8,5%) y *Gentiana striolata* (11,3%), en el cual se comparaban 129 bandas ISSR (Zhang, Yuan e Ge, 2007).

El análisis de las poblaciones cantábricas reveló que se pueden establecer tres grupos diferentes, existiendo una correlación significativa entre las distancias genéticas y



geográficas. El análisis de las distancias genéticas, tanto en el agrupamiento mediante cladogramas como el análisis de coordenadas principales (PCoA), mostraron un grupo bien definido (LG24 y LG25), dos poblaciones localizadas al suroeste de la región estudiada. El análisis Bayesiano de los genotipos individuales multilocus también mostró esta agrupación para LG25 y LG24, pero además, las poblaciones situadas en la zona oriental de la región estudiada (LG21, LG22 y LG23) se asociaron en otro grupo. Esta estructura de las poblaciones puede deberse a la falta de continuidad del hábitat de la genciana, generando un aislamiento parcial de LG24 y LG25.

*G. lutea* L. es una especie autoincompatible, dependiendo principalmente de la polinización por insectos para producir semillas (Bucher, 1987). Los abejorros son los principales polinizadores de muchas especies de gencianas alpinas como es la *G. lutea* L. (Kozuharova, 1997). La dispersión del polen por los insectos a una distancia relativamente amplia y la de las semillas por la acción del viento pueden producir un flujo genético entre poblaciones cercanas de *G. lutea* y el aislamiento genético entre poblaciones ampliamente separadas.

Zhang et al. (2007) obtuvo altos niveles de diversidad utilizando marcadores ISSR en *G. striolata* (PPL= 80,5% a nivel de especie, y entre el 40,42% y el 52,57% a nivel de poblaciones) y *G. atunsiensis* (PPL= 70,2% a nivel de especie, y de entre el 33,41% y el 46,58% a nivel de población). Varias gencianas originarias de China y en peligro de extinción (*Gentiana macrophylla* Pall., *Gentiana dahurica* Fisch., *Gentiana straminea* Maxim., y *Gentiana crassicaulis* Duthie ex Burk) mostraron niveles más bajos de diversidad genética a nivel de especie utilizando marcadores ISSR, con valores comprendidos en el intervalo PPL= 43,75-67,71% (Zheng, Zhang e Wang, 2011). La diversidad genética estimada en *G. lutea* L. var. *aurantiaca* demuestra un nivel notable de variación entre poblaciones (PPL= 66,04%,  $He= 0,1480$ ) y un nivel de variación genética entre bajo y medio a nivel intrapoblacional (PPL para una sola población oscila entre el 18,87% y el 38,68%, con un nivel de diversidad genética medio a nivel de población de  $He=0,0956$ ). *G. lutea* L. var. *aurantiaca* es una planta herbácea perenne con una distribución irregular. Las poblaciones están localizadas con frecuencia en montañas lejanas unas de otras, y aisladas por medio de mesetas o valles. Las poblaciones del suroeste (LG24 y LG25) mostraron el valor más bajo de diversidad genética (PPL=18,87% y 19,81%;  $He=0,0719$  y  $0,736$ , respectivamente), debido al mayor aislamiento genético de estas dos poblaciones.

Se observa de forma generalizada la existencia de una relación directa entre el tamaño de la población, la capacidad adaptativa de la planta y la diversidad genética, lo cual implica que la fragmentación del hábitat ejerce un efecto negativo sobre la capacidad de adaptación de las plantas y su nivel de variación genética. Asimismo, dicha relación se ha mostrado con mayor intensidad cuando las especies analizadas son autoincompatibles (Kery, Matthies e Spillmann, 2000) y en cierta medida en especies "raras", como es el caso de *G. lutea* L., siendo estas especies más propensas al efecto negativo de la fragmentación del hábitat (Leimu et al., 2006).

Kery et al. (2000) estudiaron la reproducción y la capacidad de generar descendencia en relación al tamaño de la población en *G. lutea* L. La reproducción se vio fuertemente mermada en pequeñas poblaciones, donde las plantas produjeron menos semillas por fruto y por planta. Esta reproducción se vio aún más reducida en poblaciones con menos de 500 plantas, lo cual ocurre en las poblaciones de genciana estudiadas en el presente trabajo (con menos de 150 plantas por población). Por lo tanto, estas

pequeñas poblaciones de *G. lutea* L. se enfrentan a un elevado riesgo de extinción: a corto plazo debido a su reducida capacidad de reproducción y también a largo plazo debido a que estas poblaciones poseen una menor capacidad de adaptación a cambios ambientales como consecuencia de su baja variabilidad genética.

La estructura genética de las poblaciones vegetales refleja las interacciones de varios procesos evolutivos incluyendo la evolución histórica a largo plazo, tales como cambios en su distribución, la fragmentación del hábitat, el aislamiento poblacional, la mutación, la deriva genética, el sistema de cruzamiento, el flujo genético y la selección (Schaal *et al.*, 1998). Un elevado nivel de diferenciación poblacional puede estar explicado por la deriva genética y una fragmentación del hábitat, lo cual conduce al aislamiento genético de las poblaciones (Hogbin e Peakall, 1999). La estructura genética observada en las poblaciones de *G. lutea* L. analizadas en la Cordillera Cantábrica implica, que se debería considerar prácticas de conservación para el mayor número de poblaciones posible, de modo, que permitiese aumentar tanto el número de individuos de cada una de ellas como la variabilidad genética existente.

## 5. CONCLUSIONES

Las poblaciones *G. lutea* del noroeste de la Península Ibérica fueron agrupados en tres clúster diferentes, con una correlación significativa entre las distancias genéticas y geográficas. *Gentiana lutea* L. var. *aurantiaca* mostró un marcado nivel de variación genética, tanto entre poblaciones como dentro de las poblaciones. Las poblaciones con el mayor nivel de aislamiento son las que presentan la menor variación genética intrapoblacional. El bajo número de individuos, así como la estructura genética observada en las poblaciones analizadas hace necesario que estas poblaciones sean protegidas para asegurar su supervivencia antes de que sean demasiado pequeñas para sobrevivir de forma natural.

## 6. AGRADECIMIENTOS

Agradecer a la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León por la ayuda para la contratación de Óscar González López como Personal Investigador de Reciente Titulación Universitaria (PIRTU), ayuda cofinanciada por la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León y el Fondo Social Europea Orden EDU/1867/2009, así como a la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Castilla y León por financiar el proyecto (2008/00134/001).

## 7. BIBLIOGRAFÍA

BUCHER, T. **Biosystematische Untersuchungen an *Gentiana lutea* L., *Gentiana purpurea* L. und deren Hybriden [Biosystematic investigations on *Gentiana lutea* L., *Gentiana purpurea* L. and their hybrids]**. 1987. (Thesis). University of Zürich, Zürich, Switzerland.

CARNAT, A. et al. Influence of drying mode on iridoid bitter constituent levels in gentian root. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 4, p. 598-602, Mar 2005.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.



- GE, X. J. et al. Strong genetic differentiation of the East-Himalayan *Megacodon stylophorus* (Gentianaceae) detected by Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR). **Biodiversity and Conservation**, v. 14, n. 4, p. 849-861, Apr 2005.
- GÓMEZ-GÓMEZ, L. et al. Genetic characterization and variation within and among populations of *Anthyllis rupestris* Coss., and endangered endemism of southern Spain. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 45, p. 138-147, Dec 2012.
- HO, T.; LIU, S. **A worldwide monograph of Gentiana**. Beijing, China: Science Press, 2001.
- HOGBIN, P. M.; PEAKALL, R. Evaluation of the Contribution of Genetic Research to the Management of the Endangered Plant *Zieria prostrata*. **Conservation Biology**, v. 13, n. 3, p. 514-522, 1999.
- KERY, M.; MATTHIES, D.; SPILLMANN, H. H. Reduced fecundity and offspring performance in small populations of the declining grassland plants *Primula veris* and *Gentiana lutea*. **Journal of Ecology**, v. 88, n. 1, p. 17-30, Feb 2000.
- KOZUHAROVA, E. Wild bees as pollinators of four *Gentiana* species on Mount Vito sa (Bulgaria). **Bocconeia**, v. 5, p. 619-623, 1997.
- LAINZ, M. **Mis contribuciones al conocimiento de la flora de Asturias**. Oviedo, Spain: Diputación Provincial de Asturias, Instituto de Estudios Asturianos (del C.S.I.C.), 1982. 102.
- LEIMU, R. et al. How general are positive relationships between plant population size, fitness and genetic variation? **Journal of Ecology**, v. 94, n. 5, p. 942-952, 2006.
- LEWONTIN, R. C. The apportionment of human diversity. **Evolutionary biology**, v. 6, p. 381-398, 1972.
- NEI, M. Genetic distance between populations. **The American Naturalist**, v. 106, n. 10, p. 283-292, 1972.
- Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, n. 12, p. 3321-3323, Dec 1973. ISSN 0027-8424 (Print)
- NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. Oxford, UK: Oxford University Press, 2000.
- PIRTTILÄ, A. et al. DNA isolation methods for medicinal and aromatic plants. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, n. 3, p. 273-273, 2001.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425, July 1, 1987 1987.
- SCHAAL, B. A. et al. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. **Molecular Ecology**, v. 7, n. 4, p. 465-474, 1998.
- ZHANG, X. L.; YUAN, Y. M.; GE, X. J. Genetic structure and differentiation of *Gentiana atunsiensis* W.W. Smith and *G.striolata* T. N. Ho (Gentianaceae) as revealed by ISSR markers. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 154, n. 2, p. 225-232, Jun 2007.
- ZHENG, P.; ZHANG, K.; WANG, Z. Genetic diversity and gentiopicoside content of four *Gentiana* species in China revealed by ISSR and HPLC methods. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford; UK, v. 39, n. 4-6, p. 704-710, 2011.