



UFAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROTEÇÃO
DE PLANTAS



CECA

PAULO NOGUEIRA DE BARROS

**POTENCIAL DOS EXTRATOS DE PLANTAS DA CAATINGA PARA ATIVIDADE
ANTIFÚNGICA E INDUTORA DE RESISTÊNCIA**

RIO LARGO

2013

PAULO NOGUEIRA DE BARROS

**POTENCIAL DOS EXTRATOS DE PLANTAS DA CAATINGA COM ATIVIDADE
ANTIFÚNGICA E INDUTORA DE RESISTÊNCIA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alagoas como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas, para obtenção do título de Mestre em Proteção de Plantas.

Orientador: Prof.^o Dr. Gildemberg Amorim
Leal Júnior.

RIO LARGO

2013

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária: Helena Cristina Pimentel do Vale

B277p

Barros, Paulo Nogueira de.

Potencial dos extratos de plantas da caatinga com atividade antifúngica e indutora de resistência / Paulo Nogueira de Barros. – 2013.
59 f. : il.

Orientador: Gildemberg Amorim Leal Júnior.

Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2013.

Bibliografia: f. 46-59.

1. Caatinga. 2. *Lippia*. 3. Fenilalanina amônia-liase. 4. Biocontrole. 5. Fitopatígeno. I. Título.

CDU: 631:581.6

PAULO NOGUEIRA DE BARROS

**POTENCIAL DOS EXTRATOS DE PLANTAS DA CAATINGA COM ATIVIDADE
ANTIFÚNGICA E INDUTORA DE RESISTÊNCIA**

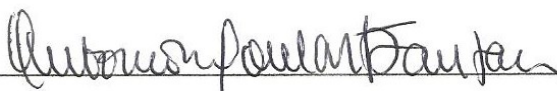
Dissertação apresentada à Coordenação do Curso de Mestrado em Proteção de Plantas, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Proteção de Plantas, tendo sido aprovada em 08 de Março do ano de 2013, pela seguinte Banca Examinadora:



Prof. Dr. Gildemberg Amorim Leal Júnior

Orientador

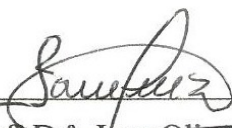
Universidade Federal de Alagoas



Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana

1º Examinador

Universidade Federal de Alagoas



Prof. Dr.ª Jane Oliveira Perez

2º Examinador

Instituto Federal do Sertão Pernambucano

RIO LARGO

2013

Aos meus pais, Alípio Nogueira de Barros e Adeilde Maria de Barros, por sempre estarem juntos, me apoiando e incentivando durante toda minha vida, diante de todas as dificuldades.

Em especial, a jóia mais bem lapidada que Deus me concebeu “Dé de Alípio”, fonte do saber, dignidade, honestidade e amor, não só por mim, mas por todas que vivem ao seu redor, isso sim é ser “MÃE”...

Aos meus maravilhosos irmãos: Elias, Eliane, Rute, “Raquel e Rogéria” pelo amor fraterno com que sempre nos tratamos...

Aos meus amados sobrinhos Lucas, Moisés, Karoline e Walderlan

Aos Meus avós: Maria Nunes Nogueira e Antônio Nogueira Sobrinho (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

“A gratidão é o único tesouro dos humildes.”

William Shakespeare

Ao senhor Deus, por nunca deixar que eu pereça, mesmo nos momentos mais difíceis.

À Universidade Federal de Alagoas (UFAL) e à Unidade Acadêmica Centro de Ciências Agrárias (CECA) pela possibilidade de ingresso no curso de pós-graduação em Proteção de Plantas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Ao Centro de Referência em Recuperação de Áreas Degradadas (CRAD) da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF) pelo auxílio na identificação de espécies da caatinga.

Aos Professores Gaus Silvestre de Andrade Lima e Iraildes Pereira de Assunção, por todo profissionalismo e suporte durante o desenvolvimento de todas as atividades desse projeto.

Ao Professor Antônio Euzébio Goulart Santana, pelo apoio e ensinamentos valiosos.

A Dannielle de Lima Costa, pela paciência e apoio durante todo trabalho realizado no Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais (LPqRN).

Ao Professor Fernando Finger, Universidade Federal de Viçosa (UFV), por todo conhecimento e atenção.

Aos Meus amigos do Instituto Federal do Sertão Pernambucano (IF SERTÃO – PE) e Universidade Federal da Paraíba (UFPB) – Campus Areia: Priscila, Juliane, Gutemberg, Nielton, Rosivan, Werik, Gláurea, Édipo, Fanuel, Lindamara, Geysa e Dany, pela amizade sincera em todos os momentos.

Aos amigos e parceiros de laboratório Jean Herllington, Lucas, Carlos, Arthur, Paula, Andrezo, Gabriel, Antônio, Fred, Edlene, Joyce e Sarah.

Aos Professores Júlio Cardoso, Edna Peixoto, Fátima Muniz, Marcelo Cruz, Sônia Forti, Silmar Tirone, Roseane Predes, Adriana Guimarães, Ivanildo Soares e Ricardo Brainer pela disponibilidade em repassar seus conhecimentos durante todo o mestrado.

Aos colegas da Pós-Graduação: Janubia, Mércia Ferreira, Mércia Elias, Jaqueline, Hully, Joseani, Jorge, Deyse, Quitéria, Ellen, Vanessa, Danilo, Wellington, Livoney e Karla:

por enfrentarmos as dificuldades apresentadas no decorrer das disciplinas, sempre com dedicação e alegria.

Aos meus tios: Dodora, Plácido, Plínio, Mirian, Carlito, Graciano, Edite, Juvenal, Alaide, Alderiva, Mário, João e Pedro

Ao companheirismo, amizade, carinho e amor da minha namorada, Wilza Carla Oliveira de Souza, “sem você seria mais difícil”...

A Dona Nenzinha, Vera, Eduardo, Leda, Seu José, Jarbas, Cassiano e todos os familiares de Wilza pelo carinho com que sempre me tratam...

A Josenaldo Aciole de Barros “Batinga” pela orientação, quanto à identificação primária das espécies estudadas.

Aos Meus Primos, Gracianinho, Isaac, Isaias, Jacó, Aarão, Moura, Márcia, Francisco, Domingos, Rominho, Ricardo Nogueira e muitos outros... “Vocês fizeram e fazem parte dessa história”

À minha eterna orientadora: Dr^a Jane Oliveira Perez, pela sua orientação, amizade e incentivo...

Aos Professores, Cícero, Flávia, Erbs, Luiz Fernando e todos do IF SERTÃO – PE.

Às grandes lições de dignidade, dedicação, profissionalismo do meu orientador Dr^o Gildemberg Amorim Leal Júnior.

À Secretaria do curso da Pós-Graduação nas pessoas de Geraldo Lima, Marcos Antônio e Michelle.

A todos que contribuíram de alguma forma para que esse sonho se realizasse

Agradeço!

*“O homem destrói a natureza na justificativa de sobreviver,
A natureza luta para sobreviver, para garantir a sobrevivência do homem.”*

Mauro Wesley

RESUMO

O controle de fitopatógenos com o uso de produtos efetivos e com baixa persistência no ambiente destina-se a uma maior segurança alimentar. Uma das estratégias para obtenção das moléculas base é avaliar o potencial de compostos produzidos por vegetais que vivem em condições adversas ou apresentam propriedades medicinais. Considerando esta abordagem, o potencial antimicrobiano e de indução de resistência vegetal de quatro espécies medicinais da caatinga (*Anadenanthera colubrina*, *Mimosa tenuiflora*, *Lippia origanoides* e *Myracodruon urundeuva*) foram avaliados. A atividade antimicrobiana foi testada contra 10 fitopatógenos de diferentes classes (*Pythium* sp., *Phytophthora palmivora*, *Moniliophthora perniciosa*, *Sclerotium rolfsii*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum coccodes*, *Colletotrichum truncatum*, *Cercosporidium* sp. e *Curvularia* sp.). O potencial de induzir resistência foi avaliado com o extrato de melhor atividade fungitóxica e com as frações obtidas por filtração. A indução de resistência foi determinada em *Solanum sculentum* (Micro-Tom) e através do incremento da atividade das enzimas Peroxidase (POX), Polifenoloxidase (PPO) e Fenilalanina Amônia-liase (FAL) relacionadas com as respostas de defesa vegetal. A atividade antimicrobiana foi realizada incorporando ao meio BDA (Batata, Dextrose e Agar, 2%), cada extrato concentrando-o a 100 e 1000 µg.mL⁻¹. O extrato de *L. origanoides* inibiu 100% dos patógenos e foi parcionado em quatro frações (Hexano, Cloroformio, Metanol e Acetato de Etila). As frações foram avaliadas nas concentrações de 40, 400 e 4000 µg.mL⁻¹ a hexânica inibiu 100% dos patógenos a 400 µg.mL⁻¹. Entretanto, a fração acetato de etila a 4000 µg.mL⁻¹ inibiu o crescimento dos Oomicetos. A atividade elicitora foi avaliada pulverizando 400 µg.mL⁻¹ do extrato bruto e frações de *L. origanoides* em *S. sculentum*. Todas as frações induziram o incremento da atividade exceto o extrato bruto. Neste contexto o *Lippia origanoides* demonstrou ser uma fonte rica de moléculas para controle de patógenos revelando três substâncias potenciais para controle de doenças: um biocida de ampla ação, outra específica à Oomiceto e no mínimo uma substância indutora de resistência.

Palavras-chave: Caatinga. *Lippia*. Fenilalanina amônia-liase. Biocontrole. Fitopatógenos.

ABSTRACT

Phytopathogens control using product effective and with low persistence is the aim of healthy food. One way to obtain molecules base is to analyze the potential of the substance produced by plants that grow in extreme climatic conditions. In this context, the objective of this study was to evaluate *in vitro* the capacity of four medicinal plant extracts collected in the caatinga (*Anadenanthera colubrina*, *Mimosa tenuiflora*, *Lippia origanoides* e *Myracodruon urundeuva*) to inhibiting the growing fungi and the induced resistance in *Solanum sculentum* (Micro-Tom). The capacity to inhibiting the growing fungi was tested against ten phytopathogens in three different classes (*Pythium* sp., *Phytophthora palmivora*, *Moniliophthora perniciosa*, *Sclerotium rolfsii*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum coccodes*, *Colletotrichum truncatum*, *Cercosporidium* sp e *Curvularia* sp.). The induced potential resistance was studied only with the best extract and the parts of the extract obtained after filtration. The induced resistance was determined in *S. sculetum* using the activity increased enzyme from peroxidase (POX), polyphenoloxidase (PPO) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL). All enzymes are associated with vegetal defense response. The antimicrobial activity was tested by incorporating the extract into two different dilutions (100 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) in PDA media (Potato, Dextrose and Agar, 2%). The *L. origanoides* ethanolic extract inhibit 100% of all pathogens and was fracted into four parts (Hexane, Chloroform, Methanol e Ethyl acetate). The antimicrobial activity was tested by incorporating each fraction into three different dilutions (40, 400 e 4000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). The hexane fraction was effective at 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ against all the pathogens. However, the Ethyl acetate fraction inhibits growing Oomycetes at 4000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. The induced potential resistance was verified by pulverizing *S. sculetum* water solutions with crude extract or fractions at 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. All treatments increased the enzyme activity except for the crude extract. All the results demonstrate the *Lippia origanoides* with one abundant font in the molecules with potential agricultural use and reveal three potential substances for pathogen control: the first with general antimicrobial activity, the second specifcly against Oomicytes and third resistance to indutor substance.

Keywords: Caatinga. *Lippia*. Phenylalanine ammonia lyase. Biocontrol. Phythopathogens.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Fluxograma do processo de extração dos extratos etanólicos das folhas de *A. colubrina*, *M. tenuiflora*, *M. urundeuva* e *Lippia origanoides* (Filtração)..... 31
- Figura 2** – Atividade antimicrobiana de extratos de plantas da Caatinga contra fungos filamentosos. E.B. de *L. origanoides* (Alec.), *A. colubrina* (Angi.), *M. urundeuva* (Aroe.) e *M. tenuiflora* (Jure.)..... 33
- Figura 3** – Atividade antimicrobiana do extrato bruto e Frações de *L. origanoides* contra fungos filamentosos. E.B., Fração Hexano (F.He), Fração clorofórmio (F.Cl.), Fração Acetato de etila (F.Ac.) e Fração metanol (F.Me.)..... 37
- Figura 4** – Inibição do crescimento micelial dos extratos de alecrim a 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$: A – Controle, B – E. B., C – F. He., D – F. Cl., E – F. Ac. e F – F. Me.; 1 - *Pythium sp.*, 2 – *C. gloeosporioides*., 3 - *C. musae*, 4 – *C. coccodes*, 5 – *C. truncatum*., 6 - *Cercosporidium sp.*, 7 - *Curvularia sp.*, 8 – *S. rolfsii*, 9 - *M. perniciosa* e 10 – *P. palmivora*..... 38
- Figura 5** – Inibição do crescimento micelial dos extratos de alecrim a 4000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$: A – Controle, B – E. B., C – F. He., D – F. Cl., E – F. Ac. e F – F. Me.; 1 - *Pythium sp.*, 2 – *C. gloeosporioides*., 3 - *C. musae*, 4 – *C. coccodes*, 5 – *C. truncatum*., 6 - *Cercosporidium sp.*, 7 - *Curvularia sp.*, 8 – *S. rolfsii*, 9 - *M. perniciosa* e 10 – *P. palmivora*..... 39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividade enzimática de Polifenoloxidase (PPO), Peroxidase (POX) e Fenilalanina amônia-liase (FAL), em mudas de microtom cultivadas em casa de vegetação e pulverizadas com <i>L. origanoides</i>	44
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	Extratos vegetais no controle de doenças de plantas.....	15
2.2	Extratos vegetais e a indução de resistência em plantas a patógenos.....	17
2.3	Plantas da Caatinga.....	19
2.4	Metabólitos secundários.....	20
2.5	Identificação de moléculas em vegetais	22
3	MATERIAL E METODOS	24
3.1	Localização do experimento	24
3.2	Coleta e identificação de plantas da Caatinga	24
3.3	Obtenção dos isolados	24
3.4	Obtenção de mudas de Micro-tom.....	25
3.5	Preparo do extrato bruto etanólico.....	25
3.6	Bioensaios com extrato etanólico	26
3.7	Bioensaios das frações	27
3.8	Ensaio de indução de resistência	28
3.9	Atividade de peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina-amônia liase.....	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1	Efeito da atividade antimicrobiana dos extratos vegetais <i>in vitro</i>	31
4.2	Filtração e atividade antimicrobiana das frações de <i>L. origanoides in vitro</i>	34
4.3	Resposta de defesa em mudas Micro-tom (MT) tratadas com <i>L. origanoides</i>	40
5	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

A busca por novos produtos derivados de compostos naturais tem estimulado a exploração e a pesquisa com espécies endêmicas de diferentes ecossistemas (MAGALLANES et al., 2003; ROJAS-FERNÁNDEZ et al., 2008; WILPS et al., 1993). As espécies botânicas potenciais têm sido analisadas em seus componentes químicos e sua reação biológica para elaboração de medicamentos (GHOSH-HAZRA; CHATTERJEE, 2008; KUSKOSKIE et al., 2005) antioxidantes (LIM; MURTIJAYA, 2007), conservante naturais de alimentos e principalmente defensivos agrícolas contra diferentes classes de fitopatógenos (PÉREZ-PACHECO et al., 2004; RODRIGUEZ et al., 2011).

No setor agrário as espécies botânicas têm sido exploradas como fonte de moléculas para elaboração de defensivos com maior biodegradabilidade (SAN-LANG et al. 2002; FERNANDO et al., 2005) ou pela potencialidade em induzir resistência (SCHWAN-ESTRADA et al., 2003). A busca por novas moléculas antimicrobianas ou indutoras de resistência em planta é motivada pelo surgimento de populações resistentes de patógenos a diferentes grupos químicos em uso corrente no controle de fitopatógenos, como os benzimidazóis, triazóis, estrobilurinas e dicarboximides (MA; MICHAILIDES, 2005; ISHII, 2006). A linha de pesquisa busca um alinhamento com a tendência do século XXI pela produção de alimentos com maior segurança alimentar, isentos de defensivos com alta persistência ou toxicidade.

Nos diversos biomas, diferentes famílias botânicas são estudadas, mas o alvo principal são as espécies aromáticas e medicinais por dispor do conhecimento prévio de produzir substâncias antimicrobianas ou que atuam na ativação do metabolismo celular (SILVA et al., 2010a). Plantas aromáticas e medicinais são utilizadas na medicina popular por seus extratos e óleos essenciais apresentarem conhecido efeitos antimicótico e anti-bacteriano (PINTO et al., 2007; HUSSAIN et al., 2008). Inúmeras famílias de plantas são citadas na literatura com atividade antimicrobiana, como as famílias **Asteraceae** [*Acanthospermum hispidum* DC., *Chamomilla recutita* (L.), *Eclipta prostrata* (L.) L., *Pluchea* sp., *Sonchus oleraceus* L., *Verbesina macrophylla* (Cass.) Black *Vernonia chalybaea* Mart., *Vernonia* sp., *Wiborgia parviflora* (Cav.) Kunth)] e **Lamiaceae** (*Aeollanthus suaveolens* Mart., *Hyptenia salzmannii* (Benth.), *Hyptis mutabilis* (Rich.) Briq.]. Gêneros das famílias **Euphorbiaceae** (*Croton*) e **Verbenaceae** (*Lippia*) são componentes importantes do bioma caatinga, a partir de um ponto de vista botânico e econômica de como fontes potenciais de medicamentos para a

indústria farmacêutica (ALBUQUERQUE et al., 2007). Além de agentes antimicrobianos as planta podem ser fonte de moléculas com ação na atividade celular, o caso clássico do ácido salicílico (CIPOLLINI, 2002), que atua como sinalizador da indução de resistência em células vegetais.

A caatinga apresenta uma imensa variedade de vida e um acentuado grau de endemismo. As plantas encontradas na caatinga ainda são pouco exploradas, diante do seu potencial medicinal e farmacológico. Dentre as espécies na medicina popular citando *Anacardium occidentale*, *Tabebuia*, *Schinopsis brasiliensis*, *Myracrodruon urundeuva*, *Mimosa tenuiflora*, *Maytenus rígida*, *Sideroxylon obtusifolium*, *Amburana cerarensis*, *Argemone mexicana*, *Bauhinia cheilantha*, *Cereus jamacaru*, *Operculina macrocarpa*, *Operculina hamiltonii*, *Anadenanthera colubrina*, e *Rosmarinus officinali* utilizadas como anti-inflamatórios, antitérmicas e sedativas. Seis espécies nativas da caatinga (*Amburana cerarensis*, *Maytenus rigida*, *Bauhinia cheilantha*, *Cereus jamacaru* e *Anadenanthera colubrina*) são utilizadas como agentes anti-inflamatórios, antitérmicas e sedativas, estas espécies são comumente referenciadas como tendo grande importância cultural, como plantas medicinais e fontes de produtos de madeira (AGRA et al., 2005; ALBUQUERQUE et al., 2005; ALMEIDA et al., 2006; MONTEIRO et al., 2006; SILVA et al., 2006). Algumas espécies de plantas pertencentes ao gênero *Allamanda*, relatadas no nordeste do Brasil (SOUZA-SILVA; RAPINI, 2009) apresentam metabólitos secundários com expressiva atividade farmacológica como os iridóides, flavonóides, cumarinas e terpenóides.

As condições edafoclimáticas da caatinga induzem a uma alta produção de compostos e uma grande variedade dos mesmos, sendo um banco de moléculas de extrema importância no estudo da fitopatologia (CASTRO et al., 2004a). Algumas espécies cultivadas encontradas no semi-árido cearense como a *Rosmarinus officinalis* (alecrim) *aloe vera* (L.) Burm f., (babosa) e *Ximenia americana* L. (ameixa) tem o seu potencial já avaliado (CARTAXO et al., 2010). No estudo do controle de doenças extratos brutos de plantas ou óleo essencial, obtidos a partir da flora nativa têm indicado potencial controle de fitopatógenos, tanto pela ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos como pela produção de fitoalexinas indicando a presença de compostos com características de elicitores (STANGARLIN et al., 2010).

A busca de novas moléculas surge como alternativa ao uso de alguns produtos químicos ora buscando a especificidade ora de efeito mais amplos para que o manejo de doenças tenha uma maior flexibilidade. Considerando que os extratos estudados também apresentam substâncias que atuem como indutoras de resistência, é necessário proceder a

avaliação desta característica. Considerando o contexto da agricultura do século XXI, a segurança alimentar e o bioma Caatinga, o objetivo do trabalho foi determinar atividade antimicrobiana e indutora de resistência dos extratos de quatro espécies da caatinga e avaliar a capacidade dos extratos efetivos na inibição do crescimento *in vitro* também em induzir resistência em *Solanum sculeteum*, cultivar Micro-Tom. Iniciando um processo de identificação das moléculas responsáveis pelas características identificadas dos extratos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A agricultura no contexto atual; com a procura por alimentos mais saudáveis, isentos de produtos químicos, de alta toxicidade e persistência; faz surgir à necessidade de alternativas viáveis, de tecnologias limpas, como a busca de novas moléculas presentes em extratos vegetais, obtidos de plantas medicinais, popularmente conhecidas pela capacidade de produzir substâncias que tem atividade antimicrobiana (VEZON et al., 2010). As plantas da caatinga se mostram nesse segmento, como uma alternativa importante, pois, as condições edafoclimáticas que são submetidas, induzem a uma alta produção de compostos e uma grande variedade dos mesmos, sendo um banco de moléculas de extrema importância no estudo da fitopatologia (CASTRO et al., 2004b).

Diversas culturas são atacadas por microrganismos com características morfofisiológicas diferentes e um alto grau de resistência, devido à particularidade de cada espécie. Fungos, bactérias, vírus, nematóides e outros; causam prejuízos inestimáveis na agricultura, necessitando de medidas eficientes no controle destas moléstias (AMORIM et al., 2011). O controle destes é de fundamental importância para o equilíbrio da agricultura mundial, disposta a oferecer produtos saudáveis e se comprometendo no fornecimento de alimento a todas as classes sociais, como o desafio ‘Zero Hunger Challenge’ lançado pelo secretário geral da ONU Ban Ki-moon na Rio + 20 em junho de 2012.

Quando se trata da identificação de substâncias deve ser considerada a simplicidade, a rapidez, a reprodutibilidade e o baixo custo dos testes biológicos (HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991). Alguns dos principais efeitos biológicos procurados são as atividades antimicrobianas. Os métodos de difusão em ágar e o de concentração inibitória mínima são os mais utilizados (BAUER et al., 1966; LIMA et al., 1995; MITSCHER et al., 1972; CECHINEL FILHO et al., 1996). No processo de purificação o método utilizado é a cromatografia, uma técnica versátil e de grande aplicação (DEGANI et al., 1998). A identificação de biomoléculas resultantes do metabolismo secundário auxilia a humanidade no

controle de diversos patosistemas (CASTRO et al., 2004b). A maioria dos compostos químicos utilizados na defesa das plantas são terpenóides (componentes do óleo essencial) e compostos fenólicos (tanino) (MEYER; KARASOV, 1991).

2.1 Extratos vegetais no controle de doenças de plantas

No Brasil, com 30% das florestas tropicais do planeta, existem entre 40 e 200 mil espécies vegetais, das quais 10 mil são medicinais (CECHINEL; YUNES, 1988). Atualmente, apenas 119 substâncias derivadas de plantas usadas para fins medicinais são obtidas de cerca de 90 espécies. Desses 119 compostos químicos, 74% têm o mesmo uso ou uso parecido com os das plantas na medicina popular (BRAZ-FILHO, 1994; CASTRO; FERREIRA, 2001). Existem três principais vias de metabólitos secundários, responsáveis pela produção desses compostos biologicamente ativos, são eles: a via do ácido chiquímico (precursor de vários compostos aromáticos); como a salicilina e o Ácido acetil Salicílico; a via do acetato (precursor de ácidos graxos, polifenóis, isoprenos e prostaglandinas) e a via de síntese dos aminoácidos (biosíntese de alcalóides) (CASTRO et al., 2004c).

Muitos compostos terpenóides ocorrem livres em tecidos vegetais, em *Passiflora alata*, por exemplo. A volatilidade de alguns terpenos, que são unidades formadas por isoprenos; estes formados de moléculas contendo cinco carbonos; faz com que esses compostos sejam facilmente perceptíveis nos aromas das plantas e prontamente obtidos por destilação de órgãos vegetais. Os monoterpenos e sesquiterpenos são os principais constituintes dos óleos essenciais das plantas e os diterpenos, constituintes minoritários de alguns óleos essenciais (WATERMAN, 1993; LOAYZA et al., 1995; HEFENDEHL; MURRAY, 1976). Várias espécies de plantas possuem terpenos na sua composição, como *Salvia officinalis*, *Ocimum basilicum*, *Ageratum conyzoides*, *Artemisia absinthium* e *Foeniculum vulgare* (SILVA et al., 1995). Alguns metabólitos provenientes do mevalonato fazem parte do mecanismo de defesa química dos vegetais. Espécies do gênero *Iridomyrmex*, por exemplo, apresentam o composto iridodial, que é repelente de predadores (MANN, 1995). Substâncias produzidas na rota do ácido chiquímico possuem em torno de 20% do carbono fixado pelas plantas, sendo os aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano formados nessa rota (HERRMANN, 1995). Os produtos das rotas citadas tem ação em diversos patosistemas, folhas de *Moringa oleifera* contêm alguns alcalóides, ácidos graxos, proteínas, glicosídeos e niazirin, responsáveis por atividades antimicrobianas em legumes e verduras atacadas por *Pythium sp.* (SIBAT, 1993).

A citronela (*Cymbopogon nardus*), gramínea aromática originária do Ceilão, Índia e Java, é considerada excelente repelente contra mosquitos e borrachudos, em função dos altos teores de geraniol e citronela contidos em seu óleo essencial (AGUIAR-MENEZES, 2005). Testes realizados *in vitro* mostraram que o óleo essencial dessa gramínea inibiu em 100 % o crescimento micelial e a esporulação de *C. perniciosus*, agente causal da vassoura-de-bruxa do cacauzeiro (BASTOS; SILVA, 2002).

Os produtos naturais, entre os quais os extratos vegetais, têm mostrado a capacidade de controlar fitopatógenos. O controle pode ser decorrente da atividade antimicrobiana exercida diretamente contra o patógeno, retardando o crescimento micelial ou inibindo a esporulação e a germinação de esporos. Outro mecanismo estudado é a ação indireta do produto sobre a planta hospedeira por meio da ativação dos mecanismos de resistência da própria planta, o que é denominado de indução de resistência. Os princípios bioativos de plantas podem exercer efeitos diretos e indiretos simultaneamente (VEZON et al., 2010). Os extratos vegetais podem ser utilizados na sua forma direta, na composição de produtos ou servirem na etapa inicial da descoberta de novas moléculas que satisfaçam às necessidades do controle e da segurança alimentar.

Várias espécies vegetais têm demonstrado potencial para uso no controle de doenças. (SCHWAN-ESTRADA et al., 2003) tanto por ação antimicrobiana como indutor de resistência. As espécies estudadas no Brasil têm o seu potencial testado na defesa vegetal, arruda (*Ruta graveolus*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), alfafa-cravo (*Ocimum gratissimum*), cânfora (*Artemisia canphorata*), carqueja (*Baccharis trimera*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*), citronela (*C. nardus*), cúrcuma (*Curcuma longa*) e gengibre (*Zingiber officinalis*) são exemplos clássicos. Na indução de resistência, o extrato de *Artemisia camphorata* Vill. (cânfora) induz a produção de fitoalexinas em soja, sorgo e trigo (SCHWAN-ESTRADA et al., 1997; FRANZENER et al., 2003).

O óleo essencial de *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum* foi efetivo no controle de *Alternaria Humicola*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora cactorum* e *Fusarium solani*, sendo o composto metileugenol majoritário, e efetivo no controle de *P. cactorum*, causando danos na ultra estrutura micelial do microrganismo (YANG DAN et al., 2010).

Algumas espécies de plantas pertencentes ao gênero *Lippia* já apresenta estudos mais avançados, como *Lippia aristata* Shauer, *Lippia* aff. *microphylla* Cham., *Lippia martiana* Shau e *Lippia salviifolia* Cham. Tendo suas propriedades químicas analisadas diante da sua importância medicinal (SILVA et al., 2010b). A espécie *Lippia microphylla* (alecrim do

campo) tem no seu extrato substâncias que inibem em 53,6% o crescimento micelial de *Fusicoccum* sp. isolado a partir de frutos de manga (BARROS et al., 2010). O efeito *in vitro* contra *Lasiodiplodia theobromae* foi mais efetivo inibindo em 100% o crescimento micelial do causador da morte descendente na videira (*Vitis vinifera*). As substâncias provenientes do metabolismo de alguns vegetais são, sem dúvida, uma ferramenta importante no controle de doenças causadas por fitopatógenos (LIMA et al., 2010) estes apresentam especificidade diferenciada.

Um exemplo de um produto obtido de extratos vegetais e que têm sua atividade comprovada é o Ecolife[®], um extrato obtido de biomassa cítrica, composto de bioflavonóides cítricos, fitoalexinas cítricas e ácido ascóbrico; atua por indução de resistência e por ação direta contra os fitopatógenos; é um produto registrado como fertilizante junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e possui selo de certificação orgânica (FURTADO et al., 2010; VENZON et al., 2010). Diversos produtos comerciais a base de extratos vegetais tem alavancado o estudo neste seguimento, pois os resultados mostram a eficiência dessas moléculas advindas do metabolismo vegetal. O Produto Ecolife-40[®] foi testado por Gasparotto et al. (2000) para o controle da sigatoca negra da bananeira, doença altamente destrutiva causada pelo fungo *Mycosphaerella fijiensis*. Tido como um produto natural, testado em condições de campo, mostrando-se eficiente no controle da doença quando aplicado a cada 14 dias, na concentração de 1 litro/ha, comparando-se aos produtos químicos utilizados rotineiramente. Outro exemplo é o Fitoforfe[®], um produto utilizado no controle de fitopatógenos em diversos patossistemas, e vêm sendo efetivo no controle de doenças em tomateiro, ativando respostas de defesa diferentes das tradicionais (MEDEIROS et al., 2010).

2.2 Extratos vegetais e a indução de resistência em plantas a patógenos

As plantas são capazes de se defender do ataque de pragas e doenças de maneira efetiva, dada a mutiplicidade e eficiência de mecanismos, de maneira que, na natureza a resistência é regra e a susceptibilidade exceção (CAMARGO, 2011). O processo de resistência induzida tem início quando um agente indutor na planta sinaliza para ativar a produção de compostos de defesa de forma local e/ou sistêmica, podendo os seus mecanismos de defesa permanecer ativados por um longo período de tempo.

A resistência induzida caracteriza-se por ser sistema multicomponente com amplo espectro de ação contra fitopatógenos (CAVALCANTI et al., 2005). Os mecanismos de resistência induzida podem ser estruturais, lignificação e formação de papilas, ou respostas

bioquímicas, acúmulo de fitoalexinas e de proteínas relacionadas com a patogênese do tipo β -1-3-glucanases e quitinases (PASCHOLATI; LEITE, 1995). As plantas modificam os seus componentes físico-químicos, ao serem atacados por microrganismos, dispondo de um arsenal de substâncias e estruturas que barram e/ou impedem a penetração dos mesmos. Sendo assim denominados: Mecanismos estruturais e bioquímicos, ambos pré e/ou pós-formados.

Os mecanismos estruturais constituem-se em barreiras físicas à penetração e/ou colonização do patógeno, enquanto que os mecanismos bioquímicos englobam substâncias capazes de inibir o desenvolvimento do patógeno ou gerar condições adversas para a sobrevivência nos tecidos do hospedeiro, devendo estar presentes em concentração adequada nas partes invadidas e em forma acessível ao patógeno, de tal maneira que mudanças na concentração da(s) substância(s) impliquem em mudanças na expressão da doença (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008; STANGARLIN et al., 2011).

A defesa vegetal contra fitopatógenos são alterações metabólicas, que estão correlacionadas com mudanças na atividade de enzimas chaves nos metabolismo primário e secundário. As enzimas peroxidase, fenilalanina amônia-liase e a polifenoloxidase são de fundamental importância na defesa vegetal.

Em diferentes patossistemas, as mudanças na atividade das peroxidases têm sido frequentemente correlacionadas à resposta de resistência ou suscetibilidade. A enzima peroxidase (H_2O_2 oxiredutase), a qual está presente nos tecidos das plantas, em certas células animais e em microrganismos, é conhecida por participar de vários processos fisiológicos de grande importância (HOAGLAND, 1990). Ela cataliza a oxidação e a eventual polimerização de álcool hidroxicinâmico em presença de peróxido de hidrogênio, originando lignina. As peroxidases participam da biossíntese do hormônio vegetal etileno (ISHIGE et al., 1993), da oxidação de compostos fenólicos, os quais acumulam em resposta à infecção (FRY, 1986), oxidação do ácido indolil-3-acético (AIA) (HOAGLAND, 1990) e na biossíntese de lignina (INTRAPRUK et al., 1994).

A fenilalanina amônia-liase (FAL) é a enzima do metabolismo secundário, que mais se estuda, nos vegetais, devido à importância nas reações do metabolismo dos compostos fenólicos, estabilidade e facilidade de preparação para os ensaios enzimáticos. Essa enzima é responsável pela desaminação da L-fenilalanina, transformando-a em ácido trans-cinâmico e amônia. O ácido trans-cinâmico pode ser incorporado em muitos diferentes compostos fenólicos (ácido 4-coumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido sinápico), os quais estão presentes na formação de ésteres, coumarinas, flavonóides e ligninas. A FAL já foi isolada de

algas, fungos e principalmente de plantas superiores, não tendo sido ainda detectada em células bacterianas ou tecidos animais (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008).

A polifenoloxidase está relacionada à oxidação de compostos fenólicos. Os compostos fenólicos são substâncias advindas de produtos secundários que contêm um grupo fenol, isto é, um grupo hidroxila funcional em um anel aromático, produzidas pelas plantas e que apresentam uma variedade de funções nos vegetais (TAIZ; ZEIGER, 2009). Segundo Campos e Silveira (2003) a enzima polifenoloxidase (PPO) é de extrema importância para os vegetais. As quinonas formadas pela ação dessa enzima possuem atividade antimicrobiana e os polímeros podem atuar como taninos, os quais inibem o ataque de alguns insetos. Ainda, podem formar complexos com proteínas que atuam como uma barreira física para a entrada de patógenos. Os mesmos autores ressaltam que a importância da polifenoloxidase (PPO) para as plantas é proveniente deste aspecto desejável, em que devido à propriedade de oxidar compostos fenólicos para quinonas possibilitam a formação de produtos mais tóxicos para os microrganismos do que o fenol original.

Dessa forma, a atividade enzimática torna-se promissora para a resistência à infecção, expressa por meio da redução do ataque de patógenos. Indutores de resistência bióticos e abióticos são utilizados na defesa vegetal ativando estas enzimas, e os extratos vegetais derivados de plantas medicinais vêm sendo usados como indutores nos patossistemas *Botrytis cinerea* Pers. (Podridão cinzenta da videira) em Videira (*Vitis vinifera*), *Mycosphaerella fijiensis* (Sigatoka-negra) em Bananeira (*Musa* spp.) e bacterioses no pimentão (*Capsicum annuum* L) e morangueiro (*Fragaria vesca* L.)(SILVA et al., 2010a).

2.3 Plantas da Caatinga

O Bioma caatinga ocupa uma área de cerca de 750.000 Km² sob as latitudes subequatorial compreendida entre 2° 45' e 17° 21' Latitude Sul e engloba parte dos territórios pertencentes aos estados do Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Paraíba, Alagoas, Sergipe, Bahia e parte de Minas Gerais. A área corresponde a 54% da Região Nordeste e a 11% do território brasileiro e constitui o chamado Polígono das Secas (ALVES et al., 2009). Menos de 750 mm de índice pluviométrico é ocorrido por ano nessa região, concentrados e distribuídos irregularmente em três meses consecutivos no período de novembro a junho (verão ou verão-outono); a temperatura média anual varia pouco; em torno de 26°C A cobertura vegetal é representada por formações xerófilas, as caatingas, muito diversificadas por razões climáticas, edáficas, topográficas e antrópicas. Ao lado destas

formações vegetais dominantes, ocorrem também às florestas dos relevos (florestas perenifólias e subperenifólias dos brejos de altitude e encostas expostas aos fluxos úmidos de ar e de florestas semidecíduas), as florestas ripárias e os cerrados.

A caatinga apresenta uma imensa variedade de vida e um acentuado grau de endemismo; diversas espécies vegetais são utilizadas no tratamento de enfermidades, fato esse que se deve ao grande volume de substâncias bioativas encontradas nesses vegetais, dado as condições em que elas são submetidas. Diversas partes das plantas são utilizadas como: raízes, folhas e caule na formulação de fitoterápicos poderosos no combate de algumas doenças. As plantas nativas da caatinga ainda são pouco exploradas, diante do seu potencial medicinal (ROQUE et al., 2010). O poder medicinal das plantas da caatinga do nordeste brasileiro já relatado para inúmeras espécies (ALBUQUERQUE et al., 2007). A exploração de biomas áridos tem revelado inúmeras plantas edêmicas como fontes de biomoléculas para diferentes fins, entre eles o controle de fungos (RODRIGUEZ et al., 2011). As famílias **Mimosaceae** representadas por *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan e *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret; **Anacardiaceae** (*Myracodruon urundeuva* Allemão); e **Verbenaceae** (*Lippia origanoides* Kunth) têm sua potencialidade medicinal comprovada em artigos revistos por Albuquerque e colaboradores (2007). A identificação dos compostos majoritários presentes nessas espécies, que possuem capacidade micotóxica, é de fundamental importância no manejo de doenças de plantas.

2.4 Metabólitos secundários

As substâncias atuantes nos extratos vegetais são provenientes do metabolismo secundário e têm um papel importante na adaptação das plantas aos seus ambientes. Essas moléculas contribuem para que haja interação direta com os diferentes ecossistemas (HARBORNE, 1988; AERTS et al., 1991). As mesmas aumentam a probabilidade de sobrevivência de uma espécie, pois são responsáveis por diversas atividades biológicas. Atuam como antibióticos, antifúngicos, antivirais e protegem as plantas dos patógenos, além de apresentar atividade antigerminativa ou tóxica para outras plantas. Alguns destes metabólitos constituem importantes compostos responsáveis pela absorção da luz ultravioleta evitando que as folhas sejam danificadas (LI et al., 1993).

Os metabólitos secundários podem ser definidos como uma série de compostos originados a partir da ativação de rotas metabólicas resultando na formação de compostos químicos específicos, tendo a sua distinção baseada nos conhecimentos sobre a sua função e

distribuição na natureza. O conceito de metabólitos secundários se opõe aos metabólitos primários (KOSSEL, 1891). Os metabólitos secundários têm sido sumariamente definidos como compostos pouco abundantes, com uma frequência inferior a 1% do carbono total, ou pelo fato de sua estocagem ocorrer em órgãos ou células específicas. O desenvolvimento das técnicas analíticas como, por exemplo, os diversos tipos de cromatografia, permitiram isolar mais destas moléculas, constituindo-se como a base para o estabelecimento da fitoquímica (HARBORNE, 1998). A fitoquímica objetiva a identificação de metabólitos secundários presentes nas espécies vegetais, observando-se a utilização de técnicas de extração, separação, purificação e determinação estrutural das substâncias (UGAZ, 2011).

Os metabolitos secundários de plantas são classificados de acordo com a sua rota biossintética (HARBORNE, 1999). Os compostos fenólicos, os compostos terpênicos, esteróides e os alcalóides são as quatro principais famílias. Os compostos fenólicos estão envolvidos com a síntese das ligninas que são comuns a todas as plantas superiores. Atrativos aos seres humanos devido ao odor, sabor e coloração agradáveis, estes compostos são importantes nas relações com outros animais, os quais são atraídos para polinização ou dispersão de sementes. Esse grupo de compostos é importante para proteger as plantas contra os raios ultravioletas, insetos, fungos, vírus e bactérias (CROTEAU et al., 2000). Há ainda relatos de espécies vegetais que desenvolveram compostos fenólicos para inibir o crescimento de outras plantas competidoras em um mecanismo conhecido como alelopatia (FUMAGALI et al., 2008). Os alcalóides podem ser definidos como compostos farmacologicamente ativos, contendo um nitrogênio e derivados de aminoácidos (CORDELL, 1981). Entretanto, os alcalóides não são distribuídos de maneira uniforme no reino vegetal e são mais específicos para alguns gêneros e espécies de plantas. Esta distribuição restrita dos compostos secundários constitui a base da quimiotaxonomia e ecologia química (HARBORNE, 1988).

A localização das substâncias nos vegetais ocorre principalmente em quatro tipos de tecidos ou células: tecidos com crescimento ativo, células epidérmicas ou hipodérmicas, bainhas vasculares e vasos laticíferos. Intracelularmente, são sintetizados no retículo endoplasmático, concentrando-se em seguida, nos vacúolos e, dessa maneira, não aparecem em células jovens antes de ocorrer a formação dessas estruturas. O local de estoque dos alcalóides (morfina, nicotina, cafeína, hiosciamina e ecopolamina) é diferente daquele no qual foram sintetizados (SIMÕES et al., 1999). Sustentado pela grande variedade de efeitos fisiológicos que estes exercem sobre os animais e, também, por suas atividades antimicrobianas são tóxicos a insetos e repelem herbívoros, constituindo-se em importante

ferramenta no controle das doenças de plantas (SALISBURY; ROSS, 1991; MUZQUIZ et al., 1994; BARBONI et al., 1994).

Os compostos fenólicos abrangem um extenso grupo de substâncias que possuem um anel aromático contendo pelo menos uma hidroxila. Estes compostos incluem: fenóis simples e outros glicosilados, ácidos fenol-carboxílicos, derivados dos ácidos benzóico e cinâmico, a-pirones (cumarinas e isocumarinas), ligninas, flavonóides (flavononas, antocianinas e catequinas) e quinonas. Em geral, tendem a ser solúveis em água, uma vez que ocorrem freqüentemente na forma de glicosídeos e localizados usualmente nos vacúolos celulares. As vias metabólicas envolvidas na síntese de compostos fenólicos estão muito bem estudadas. As vias do ácido chiquímico e cinâmico (fenilpropanóides) constituem a sequência comum que gera os diferentes grupos de polifenóis e lignina (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008).

Fenóis são bem conhecidos como substâncias fungitóxicas, antibacterianas e antiviróticas o efeito inibitório de compostos fenólicos na germinação de esporos, crescimento micelial e produção/atividade de enzimas microbianas variam entre os diferentes grupos de fenóis. Dessa forma, os compostos fenólicos podem estar envolvidos nos mecanismos bioquímicos e estruturais de resistência em plantas (NICHOLSON ; HAMMERSCHMIDT, 1992; NICHOLSON, 1995). Segundo Vidhyasekaran (1988) diversas substâncias fenólicas estão associadas à resistência a doenças como, por exemplo, ácido clorogênico, ácido protocatecóico e catecol, floridizina e arbutina (glicosídeos fenólicos).

2.5 Identificação de moléculas em vegetais

A identificação de biomoléculas resultantes do metabolismo secundário, com ação antimicrobiana, é uma alternativa, pois a diversidade de compostos encontrada nos vegetais auxilia a humanidade no controle de diversos patossistemas (CASTRO et al., 2004b).

A identificação requer uma triagem que seja específica e permita rápida eficiência na obtenção dessas substâncias (OLIVEIRA et al., 2009). Quando se trata de identificação destes compostos ativos há um grande número de amostras a serem analisadas, alguns aspectos devem ser observados quando se procura princípios ativos em plantas. Neste contexto, devem ser levados em consideração a simplicidade, a rapidez, a reprodutibilidade e o baixo custo dos testes biológicos (HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991). Usualmente, são feitas triagens com modelos experimentais menos complexos e após a seleção das substâncias puras ativas, estas são avaliadas em ensaios mais específicos, e posteriormente metidas à análise do mecanismo de ação biológica. Alguns dos principais efeitos biológicos procurados em plantas

e alguns dos modelos experimentais utilizados na atividade fúngica e bacteriana são os métodos de difusão em ágar e o de concentração inibitória mínima (BAUER et al., 1966; LIMA et al., 1995; MITSCHER et al., 1972; CECHINEL FILHO et al., 1996).

Dos métodos utilizados, a cromatografia, é um método físico-químico de separação. Ela está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. É uma técnica versátil e de grande aplicação, pois possui uma variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias (DEGANI et al., 1998).

Atualmente diferentes técnicas cromatográficas são utilizadas. A princípio, é geralmente empregada a cromatografia em coluna aberta (CC) (VOGEL et al., 1988) com sílica gel como fase estacionária, onde, dependendo do extrato, a mesma é eluída com uma mistura de solventes que deve ser previamente determinada por cromatografia em camada delgada (CCD) (MARINI-BETTÓLO et al., 1981; RIOS et al., 1986). Outros suportes cromatográficos podem ser usados, como alumina, celulose, poliamida e sephadex (WICHENEWSKI et al., 1988; SHRINER et al., 1983). As frações obtidas devem ser reunidas segundo seu perfil cromatográfico, verificado por CCD. Em muitos casos, se obtém compostos puros numa única CC, ou utilizando a cromatografia “flash” (STILL et al., 1978) ou ainda após uma simples recristalização da substância isolada. As frações reunidas, após serem analisadas farmacologicamente e se apresentarem atividade, devem ser novamente submetidas à CC ou, dependendo da complexidade da mistura, à técnicas cromatográficas especiais, como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (GÓMEZ-SERRANILLOS et al., 1995), cromatografia de dupla contra-corrente (CDCC) (MARSTON; HOSTETTMANN, 1994), etc. Uma vez isolados as substâncias bioativas, deve-se proceder a elucidação estrutural das mesmas. Uma ferramenta que seria importante para a identificação rápida e eficiente de misturas, consiste no uso de cromatografia gasosa ou cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa, onde grande parte dos componentes de uma mistura pode ser identificada e quantificada (CICCIÓ, 1995).

O uso em conjunto de técnicas espectrais tem permitido propor com segurança a estrutura molecular de substâncias naturais. Citando como exemplos a técnica com Ultra violeta (UV), Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV), Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e Ressonância magnética nuclear de carbono (¹³C) e Spectrofotometria de massa (MS) (KEMP, 1987; SILVERSTAIN et al., 1994; BROWN, 1995; MARKHAM, 1982) devem estar associadas as técnicas de Ressonância magnética nuclear (RMN) (NOE, COSY, HETCOR, INADEQUATE, etc.) (CORDELL,

1995), (JEENER et al., 1979; BAX; FREEMAN, 1981; COLEGATE; MOLYNEUX, 1993) Além disso, o uso de difração de raio-X, quando possível, possibilita avaliar a estereoquímica real destas substâncias (WHISTON, 1987).

3 MATERIAL E METODOS

3.1 Localização do experimento

Os testes biológicos foram conduzidos no laboratório da Clínica de Diagnose Vegetal do Centro de Ciências Agrárias (CECA), Rio Largo, Alagoas. As análises químicas dos extratos foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais – LPqRN do Instituto de Química e Biotecnologia, Maceió, Alagoas. Ambos os laboratórios estão sediados na Universidade Federal de Alagoas – UFAL.

3.2 Coleta e identificação de plantas da Caatinga

As plantas identificadas como Alecrim do campo, Angico, Aroeira; e Jurema preta, sendo retirados ramos, folhas e flores. As coletas foram realizadas no Povoado de Riacho Pequeno Latitude 8° 26' 0" S, e Longitude 39° 3' 0" W., município de Belém do São Francisco, PE durante o mês de Abril do ano de 2011, temperatura média de 25,9 °C e índice pluviométrico de 117 mm (EMBRAPA, 2013). Após as coletas foram montadas exsicatas com indivíduos da população amostrada e foram enviadas para identificação no Centro de Referência para a Recuperação de Áreas Degradadas da Caatinga (CRAD). No centro as amostras foram identificadas, catalogadas e depositadas no Herbário do Vale do São Francisco (HVASF).

3.3 Obtenção dos isolados

Os microrganismos utilizados nos ensaios foram obtidos da coleção da Clínica de Diagnose Vegetal, isolados de raízes, ramos, folhas e frutos sintomáticos. Os isolados foram mantidos em meio de cultura BDA (Batata, Dextrose e Ágar, 2%), dentro de tubos de ensaio e placas de Petri, na incubadora, no escuro e a temperatura de 26 ± 2 °C.

Os isolados representam as classes dos Oomicetos [Reino Chromista (Dois)], Ascomicetos [Reino Fungi (Seis)] e Basidiomicetos [Reino Fungi (Dois)]. Os isolados utilizados com seus respectivos hospedeiros foram: *Pythium* sp. (Coentro, *Coriandrum sativum* L.), *Phytophthora palmivora* (Mamoeiro, *Carica papaya*), *Colletotrichum*

gloeosporioides (Mandioca, *Manihot esculenta* Crantz), *Colletotrichum musae* (Bananeira, *Musa* spp.), *Colletotrichum coccodes* (Tomateiro, *Solanum lycopersicum*), *Colletotrichum truncatum* (Feijão fava, *Phaseolus lunatus* L.), *Cercosporidium* sp. (Urucum, *Bixa orellana*), *Curvularia* sp. (Cana-de-açúcar, *Saccharum officinarum* L.), *Sclerotium rolfsii* (Feijão fava) e *Moniliophthora perniciosa* (Cacaueiro, *Theobroma cacao* L.). Os isolados de diferentes classes e hospedeiros foram utilizados para verificar a especificidade antifúngica dos extratos às classes de fitopatógenos ou hospedeiros de origem.

3.4 Obtenção de mudas de Micro-tom

As sementes da cultivar ‘Micro-Tom’, *Solanum sculentum*, foram disponibilizadas pelo prof. Lázaro Eustáquio Pereira Peres (Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, São Paulo). As sementes foram semeadas em bandejas, contendo substrato Plantmax[®] e vermiculita (1:1) (sem adubação), sendo duas sementes do cultivar Micro-tom (MT) por célula. Após 15 dias da semeadura, 90 plântulas foram transplantadas para 30 vasos de 85 cm de diâmetro com capacidade para 450 mL contendo substrato Plantmax[®] e vermiculita (1:1); previamente adubados com 1,0 g de NPK (10:10:10)/L de substrato e 4 g de calcário dolomítico (Ca e Mg)/L de substrato. Distribui-se 03 plantas na borda de cada vaso em casa de vegetação, sendo feita adubação foliar com micronutrientes a cada 15 dias. A irrigação foi realizada diariamente, mantendo a umidade do substrato próximo à capacidade de campo com temperatura média diária de 32 °C e mínima noturna de 22 °C.

3.5 Preparo do extrato bruto etanólico

O preparo do extrato iniciou após a confirmação da identidade das espécies coletadas. Durante o período de identificação das espécies, o material foi desidratado e armazenado no laboratório de Produção Vegetal do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano (IF SERTÃO – PE, Campus Petrolina Zona Rural), Petrolina – PE. A secagem foi realizada em estufa, a temperatura constante de 40 °C, até a obtenção de peso contínuo (aproximadamente 72 h). As folhas foram trituradas em moinho de faca e o triturado embalado a vácuo, sendo transportado até o Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais – LPqRN, UFAL, Maceió – AL e armazenado a temperatura ambiente (25 ± 5 °C).

Os triturados de Alecrim do campo, Angico, Aroeira; e Jurema preta, foram pesados e colocados em recipientes de 15 L e macerados em etanol absoluto durante 72 horas, separadamente, repetindo o procedimento por três vezes. Após a extração, o líquido extrator foi colocado em evaporador rotativo com pressão reduzida para retirada do solvente, em temperatura de 43 ± 2 °C. O extrato bruto etanólico (E.B.) de cada espécie foi transferido para recipientes de vidro e deixado em capela até a completa evaporação do solvente. Após esse período foram transferidos para dessecadores para redução da umidade, após 30 dias procedeu-se a realização dos ensaios.

A etapa seguinte de partição foi realizada com os extratos com um percentual de inibição maior. Na partição foram utilizados dois métodos o líquido-líquido e por filtração. A partição Líquido-Líquido iniciou com 200 g do extrato bruto de alecrim em Funil de separação de 2000 mL e adicionando 500 mL de água, 500 mL de metanol, 700 de clorofórmio (1:2,5:2,7, m:v:v). No método de separação foi realizada a filtração em sílica (desativada, 100 g de sílica/10 mL de ADE), na qual 300 g do extrato diluído em 200 mL de Metanol, 100 mL de Acetato de etila foram incorporados (400 g de sílica, Fase estacionária), esperou-se a evaporação de todo o solvente do incorporado. Foram colocados 1000 g de sílica desativada no funil de separação (2000 mL) e adicionados os 400 g do extrato incorporado à sílica. Na fase móvel, foram utilizados solventes de diferentes polaridades iniciando com o mais apolar e terminando com o menos apolar: Hexano (F. He.), Clorofórmio (F. Cl.), Acetato de Etila (F. Ac) e Metanol (F. Me), respectivamente. A fase móvel foi succionada com uma bomba de vácuo e posteriormente evaporado em evaporador rotativo, obtendo-se quatro frações de diferentes polaridades.

3.6 Bioensaios com extrato etanólico

A atividade biocida dos extratos vegetais foi verificada em dois ensaios. No primeiro bioensaio os extratos foram avaliados nas concentrações de 100 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As diferentes concentrações foram obtidas a partir da diluição da solução estoque hidroalcoólica (15%) de 10.000 e 100.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de extrato adicionado e Tween[®] 20 (0,1%). As concentrações dos ensaios foram obtidas a partir da diluição da solução estoque em meio de cultura fundido e temperatura próxima de 50° C.

Os bioensaios inicialmente foram conduzidos com os extratos brutos nas dosagens de 100 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para determinação do extrato mais efetivo contra os patógenos avaliados. Os microrganismos foram utilizados em plena fase de desenvolvimento vegetativo, com sete

dias de cultivo, em meio de cultura BDA. O delineamento foi inteiramente casualizado com nove tratamentos e três repetições sendo cada repetição representada por uma placa de petri. Nove microrganismos foram testados. Os tratamentos consistiram do controle e os extratos (Alecrim, Angico, Aroeira e Jurema Preta) nas concentrações de 100 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O tratamento referência de não inibição, controle, consiste no meio com solução hidroalcoólica a 15% com Tween[®] 20 (0,1%) no mesmo volume adicionado para obter cada concentração avaliada. Os tratamentos foram o Controle (ADE, Álcool etílico 15%, Tween[®] 20 (0,1%)), Alecrim a 100 (Alec, 100) e 1000 (Alec.1000), Angico a 100 (Angi. 100) e 1000 (Angi.1000), Aroeira a 100 (Aroe.100) e Aroeira 1000 (Aroe.1000), Jurema preta a 100 (Jure.100) e 1000 (Jure.1000).

Placas de Petri foram vertidas com os tratamentos e discos de 5 mm de diâmetro contendo estruturas dos patógenos estudados foram dispostos no centro de cada placa. As placas foram incubadas a 26 ± 2 °C, no escuro contínuo durante quatro dias medindo-se diariamente o diâmetro (mm) do crescimento micelial em dois sentidos, perpendicularmente opostos, com paquímetro digital Stainless Hardened (HAINAN). Para o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento micelial, segundo Menten et al. (1976), foi aplicada a fórmula: % inibição = $[(\text{crtest} - \text{crtrat}) / \text{crtest}] \times 100$, onde: crtest = crescimento radial testemunha; crtrat = crescimento radial tratamento. Os resultados obtidos foram analisados através do teste de Tukey a 5% de probabilidade pelo software estatístico ASSISTAT 5.6 BETA versão 2012 (SILVA ; AZEVEDO, 2009).

3.7 Bioensaios das frações

No segundo bioensaio usaram-se as frações de hexano (F. He.), clorofórmio (F. Cl.), acetato de etila (F. Ac.); metanol (F. Me.) e o extrato bruto (E. B.). As concentrações utilizadas foram de 40, 400 e 4000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Neste ensaio, foi introduzido um isolado de *Phytophthora palmivora* aumentando a representatividade do grupo dos Oomycetos. Somando aos isolados de *Pythium* sp. (Coentro, *Coriandrum sativum* L.), *Phytophthora palmivora* (Mamoeiro, *Carica papaya*), *Sclerotium rolfsii* (Feijão fava, *Phaseolus lunatus* L.), *Colletotrichum gloeosporioides* (Mandioca, *Manihot esculenta* Crantz), *Colletotrichum musae* (Bananeira, *Musa* spp.), *Colletotrichum coccodes* (Tomateiro, *Solanum lycopersicum*), *Colletotrichum truncatum* (Feijão fava, *Phaseolus lunatus* L.), *Cercosporidium* sp. (Urucum, *Bixa orellana*), *Curvularia* sp. (Cana-de-açúcar, *Saccharum officinarum* L.) e *Moniliophthora perniciosa* (Cacaueiro, *Theobroma cacao* L.). O experimento avaliou 10 patógenos. Da

mesma forma que no ensaio dos extratos etanólicos, os isolados de diferentes classes e hospedeiros foram utilizados para verificar a especificidade antifúngica das frações as classes dos fitopatógenos ou hospedeiros de origem.

As placas de Petri com os tratamentos, foram incubadas à 26 ± 2 °C, no escuro contínuo durante 10 dias medindo-se diariamente o diâmetro do crescimento micelial (cm) em dois sentidos, perpendicularmente opostos, com paquímetro digital Stainless Hardened (HAINAN). Para o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento micelial, segundo Menten et al. (1976), foi aplicada a fórmula: % inibição = $[(crtest - crtrat) / crtest] \times 100$, onde: crtest = crescimento radial testemunha; crtrat = crescimento radial tratamento. Os resultados obtidos foram analisados através do teste de Tukey a 5% de probabilidade, pelo software estatístico ASSISTAT 5.6 BETA, versão 2012 (SILVA; AZEVEDO, 2009).

3.8 Ensaio de indução de resistência

A atividade elicitora de resposta de defesa em vegetais pode ser verificada e quantificada através de análises bioquímicas, como a indução da síntese de substâncias ligadas a defesa vegetal. A atividade eliciadora do extrato (E.B.) mais ativo e respectivas frações (F.He., F.Cl., F.Ac., F.Me.) foram avaliadas na concentração em que foi observada o melhor efeito fungitóxico nos ensaios anteriores. O efeito de não indução de resistência foi avaliado em plantas tratadas com água e a resposta positiva das plantas a presença do indutor foi verificada com aplicação de duas doses diferentes do indutor de resistência comercial Bion[®] ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$). O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, com oito tratamentos: (Extrato Bruto), F.He. (Fração Hexano), F.Cl. (Fração Clorofórmio), F.Ac. (Fração Acetato de Etila) e F.Me (Fração Metanol). à $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$; E.B. Controle negativo (ADE); Bion[®] ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$); Bion[®] ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$). A parcela foi representada por três plantas sendo utilizadas três repetições por tratamento (oito). No experimento foram pulverizadas 72 plantas de Micro-tom com 20 dias de transplantadas, após a pulverização com os tratamentos foram coletadas amostras de folhas (uma folha de cada planta, sendo a mais expandida após o meristema apical) com 72 h. Após a coleta, o material foi identificado e transportado até a clínica fitossanitária para o preparo dos extratos foliares. Posteriormente foram avaliadas as enzimas e proteínas relacionadas à resposta de defesa: peroxidase, fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase.

3.9 Atividade de peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina-amônia liase

Após a coleta as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer vertical (-86°C) para posterior análise. As análises enzimáticas para as três enzimas (Peroxidase, Fenilalanina-Amônia liase e Polifenoloxidase) foram conduzidas em tampão a base de acetato de sódio ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0,1 M, pH 5,0). A extração das proteínas foi realizada com 6 mL de tampão de extração para 0,3 mg de material vegetal. O material foi macerado com o uso de pistilo e cadinho de porcelana até a obtenção de massa homogênea, que foi então centrifugada 17.000 *g* durante 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade enzimática da peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina-amônia liase (FAL) utilizando diferentes frações de acordo com metodologia abaixo. Também foi realizada quantificação das proteínas totais pelo método proposto por Bradford, (1976).

A determinação da atividade enzimática da peroxidase (POX) foi verificada a partir de uma alíquota de 250 µL do extrato proteico. Ao extrato foi adicionado 750µL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 6,0), 250 µL guaiacol (1,7%) e 250 µL H_2O_2 (1,8%) totalizando o volume de 1,5 mL. O branco apresentou todos os componentes do meio de reação, exceto o extrato enzimático que foi substituído por água. A atividade enzimática foi analisada em espectrofotômetro, observando-se a variação na absorbância em comprimento de onda de 470 nm, a 25°C e expressa em UA/min/mg de proteína (LUSSO; PASCHOLATI, 1999).

A atividade da polifenoloxidase foi verificada em 500 µL de extrato proteico no qual foi adicionado 750 µL de tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8), acrescido de 250 µL de 4-metilcatecol 60 mM, completando-se um volume final de reação de 1,5 mL. O branco apresentou todos os componentes do meio de reação, exceto o extrato enzimático, que foi substituído por água. As amostras foram incubadas em banho-maria a 40 °C por 15 minutos e a atividade foi paralisada com adição de 800 µL de ácido perclórico (2,0 M). A atividade enzimática foi determinada pela variação da absorbância no comprimento de onda de 395 nm, a 25°C e expressa em U.A./min./mg de proteína (KAVRAYAN; AYDEMIR, 2001).

A atividade da enzima fenilalanina-amônia liase (FAL) foi avaliada com 250 µL do extrato enzimático na qual foram adicionados 1500 µL de Tris 100 mM, 500 µL de Fenilalanina (substrato) e 750 µL de ADE. Os tubos de ensaio contendo as reações foram mantidos em banho-maria à 40 °C por 60 minutos. Após o período de incubação a reação foi paralisada com a adição de 100 µL de ácido clorídico a (5,0 M). No ensaio foram realizadas duas reações de referência. A primeira constando apenas o substrato (Branco 1) e a segunda

apenas com o extrato proteico (Branco 2). O Branco 1 foi preparado adicionando-se 1500 µL de Tris HCl 100 mM (pH 8,8), 500 µL de Fenilalanina 30 mM e 1000 µL de ADE. O Branco 2 consistiu de 1500 µL de Tris 100 mM, 250 µL do extrato enzimático e 1250 µL de ADE. A leitura foi realizada, em cubeta de quartzo, por meio de variação na absorbância em comprimento de onda de 290 nm, a 25 °C e expressa em U.A./min./mg de proteína (UMESHA, 2006).

As leituras da absorbância foram realizadas no espectrofotômetro (Lightwave II, WPA, Biochrom). Reações para cada planta tratada foram realizadas em triplicatas. As análises estatísticas foram realizadas com os valores calculados de atividade enzimática e foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott em 5% de probabilidade por meio do programa estatístico ASSISTAT 5.6 BETA, versão 2012 (SILVA; AZEVEDO, 2009).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o objetivo de identificar substâncias que contribuam para o controle de microrganismos que causam perdas consideráveis na agricultura moderna, o trabalho baseou-se em identificar substâncias antifúngicas e indutoras de resistência em plantas presentes em um bioma pouco estudado, na busca por moléculas com essa finalidade, e que enfrentam condições edafoclimáticas extremamente contrárias a sobrevivência das mesmas. O trabalho teve como foco quatro espécies da caatinga conhecidas popularmente como: angico, jurema preta, alecrim do campo e aroeira.

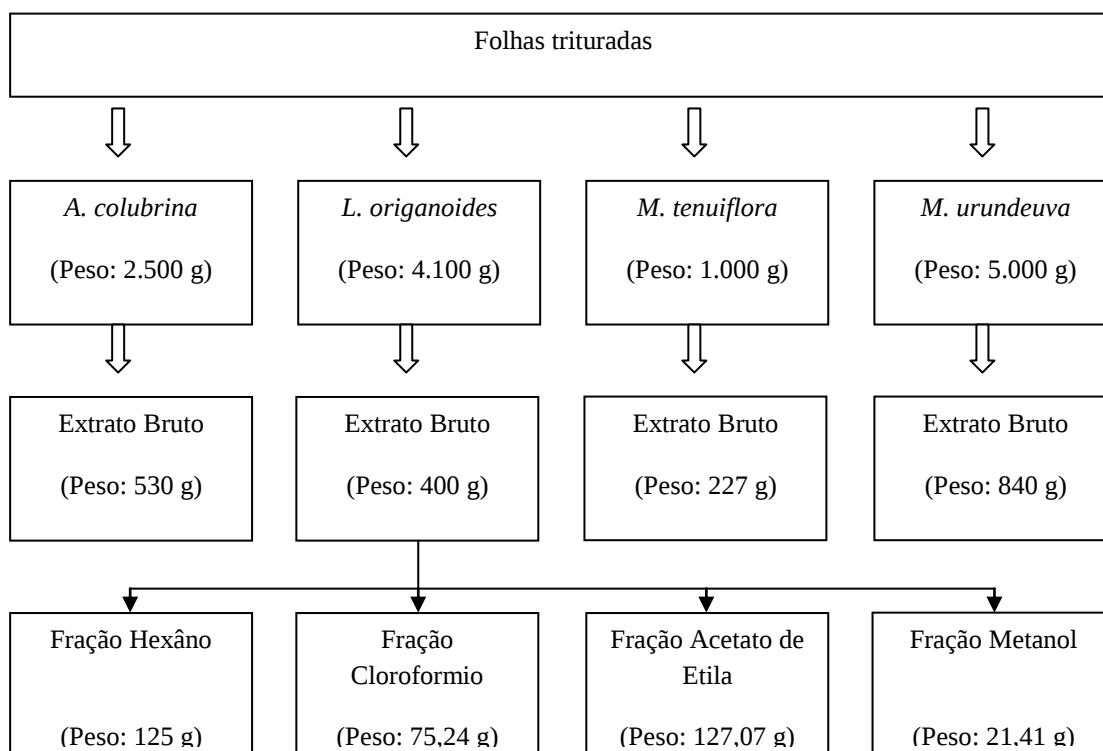
As plantas do estudo foram coletadas e identificadas como pertencentes à espécie *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret, *Lippia origanoides* Kunth e *Myracodruon urundeuva* Allemão. As exsiccatas contendo representantes de cada espécie foram catalogadas respectivamente com os seguintes códigos HVASF - 15814, HVASF - 15815, HVASF - 15817 e HVASF - 15816.

O trabalho iniciou com estudo dos extratos de plantas das quatro espécies. A avaliação seguiu dois critérios para determinar a especificidade das substâncias a serem identificadas. A primeira baseada na classe de fungos alvos (Oomicetos, Ascomicetos e Basidiomicetos) e a segunda direcionada a espécies com maior atividade tóxica aos isolados.

Os extratos vegetais foram preparados e a atividade avaliada no controle de fungos filamentosos em meio sólido com extrato incorporado em duas diluições (100 e 1000 µg.mL⁻¹). Os resultados preliminares serviram para determinação do extrato a ser fracionado com

objetivo de iniciar o processo de determinação da natureza da substância com atividade fungitóxica e/ou indutora de resistência.

Figura 1 – Fluxograma do processo de extração dos extratos etanólicos das folhas de *A. colubrina*, *M. tenuiflora*, *M. urundeuva* e *Lippia origanoides* (Filtração).



Fonte: Autor, 2013.

4.1 Efeito da atividade antimicrobiana dos extratos vegetais *in vitro*

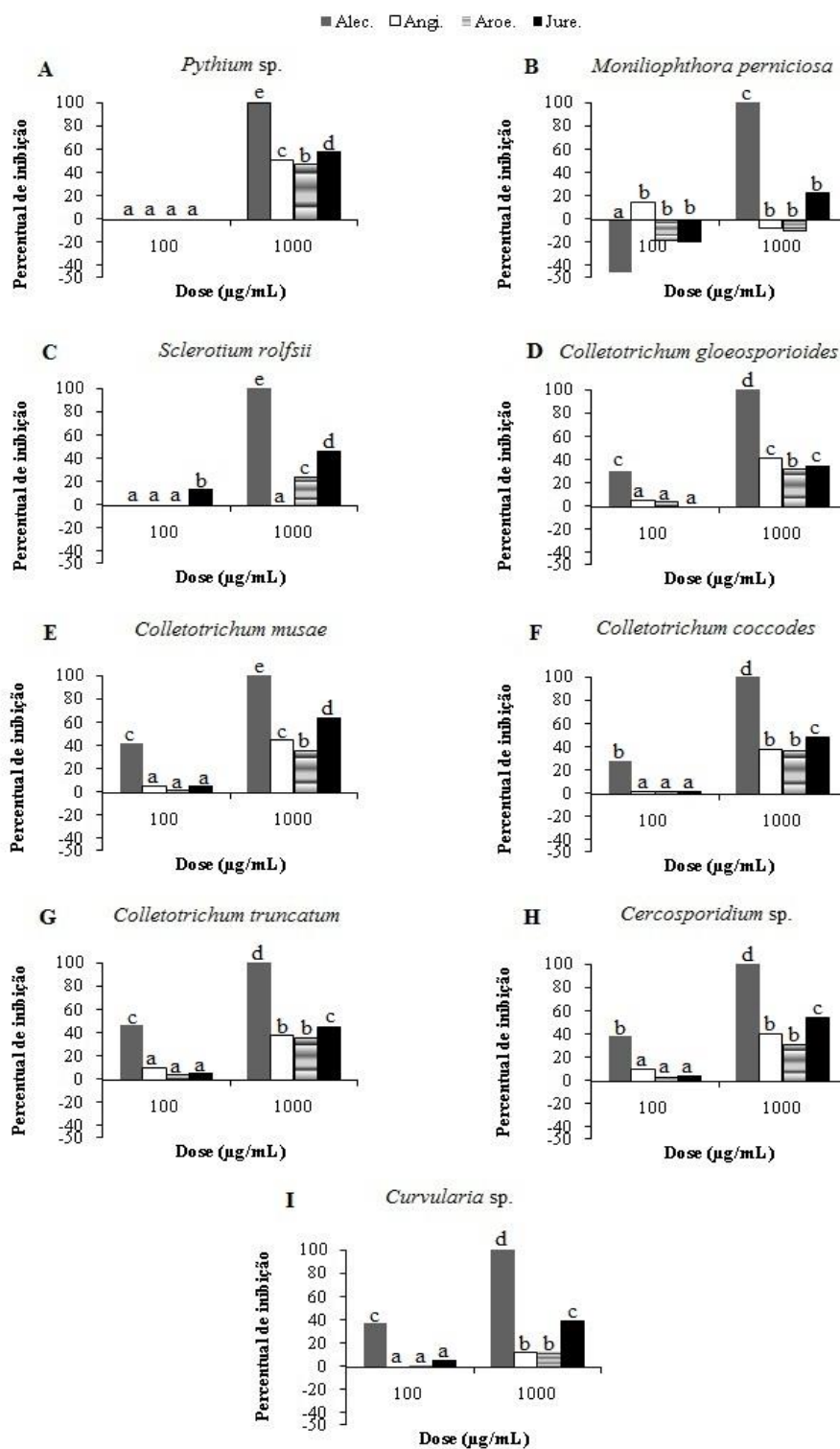
No procedimento de obtenção dos extratos, os macerados tiveram um percentual de rendimento diferenciado sendo para *A. colubrina* de 21,20%, *M. tenuiflora* de 22,71%, *M. urundeuva* de 16,80% e *Lippia origanoides* com 9,75%. O extrato de *Lippia origanoides* apresentou menor rendimento e consequentemente o mais concentrado. Na avaliação da atividade antifúngica dos extratos nos bioensaios foram testadas as concentrações de 100 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A dose efetiva foi a maior e o extrato de *L. origanoides* apresentou os melhores resultados com taxa de inibição 100% para todos os patógenos avaliados (Figura 2). Mesmo na menor dose, o extrato bruto, de *L. origanoides* apresentou melhores resultados com taxa de inibição variando entre 20 a 50% para os diferentes fungos (Figura 2).

Curiosamente, a menor dose do extrato bruto de *Lippia origanoides* induziu o crescimento de *C. perniciosa* juntamente com extratos de *M. tenuiflora* e *M. urundeuva*. Resultado similar de estímulo ao crescimento do patógeno também foi obtido com extrato desnaturado de ramos de lobeira (*S. lycocarpum*) para o mesmo patógeno, não sendo explicada a provável causa do fenômeno (RESENDE et al., 2007). O controle de todos os patógenos avaliados em maior ou menor intensidade revela a presença de substâncias com ampla ação fitotóxica. No entanto a menor dose do extrato de *Lippia origanoides* indica que os patógenos, *C. gloeosporioides*, *C. musae*, *C. coccodes*, *C. truncatum*, *Cercosporidium* sp. e *Curvularia* sp são mais sensíveis as substâncias presentes no extrato bruto.

A análise confirma o potencial do extrato de *L. origanoides* em apresentar substâncias de ampla ação não havendo especificidade para classe de patógenos ou tipo de espécie de origem para um mesmo gênero. Os outros três extratos de *M. tenuiflora*, *M. urundeuva* e *A. colubrina* apresentaram taxa de inibição que variaram até 60% na concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo consideradas efetivas as taxas acima de 30% de inibição do patógeno. O parâmetro adotado permite verificar que os extratos avaliados controlaram os patógenos *Pythium* sp., *C. gloeosporioides*, *C. musae*, *C. coccodes*, *C. truncatum* e *Cercosporidium* sp. nas mesmas faixas.

O amplo espectro de ação dos extratos vegetais chamam a atenção, levando em consideração, as diferentes fisiologias dos microrganismos utilizados, alguns possuindo tipo parede celular diferente, como no caso de *Pythium* sp. Em recentes pesquisas Yang Dan et al., (2010) constataram os efeitos do óleo essencial de *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum* contra *Phytophthora cactorum*, afetando as hifas do microrganismo, efeito esse, promovido pelo composto majoritário metileugenol. Algumas considerações devem ser adotadas, o extrato com maior taxa de inibição foi o que apresentou menor taxa de recuperação (9%) e logo o melhor resultado pode ser efeito de concentração. Em consonância como estudo, as demais espécies podem ser promissoras restando avaliar se as diferentes espécies de distintas famílias (**Fabaceae**, **Verbenaceae** e **Anarcadiaceae**) apresentam a mesma classe de metabólitos com mesmo efeito ou classes distintas com amplo espectro que atuam de modos diferentes. Neste contexto podemos identificar patógenos com inibição de crescimento por quatro extratos (*Pythium* sp, *C. gloeosporioides*, *C. musae*, *C. coccodes*, *C. truncatum*, *Cercosporidium* sp.), três extratos (*Sclerotium rolfii*) e dois extratos (*M. perniciosa*). No entanto não esta clara a relação da atividade de substâncias específica, à classe de fungos ou hospedeiro de origem.

Figura 2 – Atividade antimicrobiana de extratos de plantas da caatinga contra fungos filamentosos. E.B. de *L. organoides* (Alec.), *A. colubrina* (Angi.), *M. urundeuva* (Aroe.) e *M. tenuiflora* (Jure).



Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Fonte: Autor, 2013.

4.2 Filtração e atividade antimicrobiana das frações de *L. origanoides* in vitro

A triagem feita com os extratos brutos de quatro espécies vegetais permitiu selecionar o extrato de *L. origanoides* como o mais efetivo e iniciou-se a partição do extrato de *L. origanoides*. Inicialmente, a técnica Líquido-Líquido foi utilizada e não foi possível separar as fases do extrato de acordo com a polaridade. Provavelmente o extrato é composto por substâncias de polaridades próximas. Então se seguiu para filtração em sílica utilizando fases móvel (solventes) e estacionária (sílica e extrato), essa por sua vez, foi adequada ao material vegetal permitindo o fracionamento do extrato bruto em quatro frações. O rendimento do procedimento foi de 31,04%, 18,81%, 31,76% e 5,35% respectivamente para as frações obtidas com Hexano (F.He.), Clorofórmio (F.Cl.), Acetato de Etila (F.Ac.) e Metanol (F.Me.). As quatro frações foram testadas contra 10 isolados de fungos filamentosos durante 10 dias em incubadora.

No ensaio foi inserido o patógeno *Phytophthora palmivora* para aumentar a representatividade dos Oomicetos no grupo. O grupo teve a representatividade aumentada pela dificuldade de encontrar moléculas com ação biocida, de fácil degradabilidade e baixa toxicidade, a estes microrganismos. O controle químico através do uso de fungicidas específicos para Oomicetos, tais como metalaxil e fosetil-Al é bastante eficiente no controle preventivo e curativo de doenças causadas por estes patógenos (FEICHTENBERGER, 2001). O controle químico é eficiente mas não é o mais indicado visto que o uso de agrotóxicos gera uma série de impactos ambientais como exemplo a contaminação de alimentos, lençóis freáticos, e pode causar desequilíbrio nas populações microbianas no solo. Acarretando o surgimento de populações do patógeno resistentes a estes compostos químicos (DAVIS, 1982; LEONI; GHINI, 2003; MORANDI; BETTIOL, 2009; SCHWAN-ESTRADA et al., 2000).

As frações utilizadas a partir do extrato bruto conferiram resultados condizentes com a técnica de extração empregada. Na avaliação das diferentes frações na maior concentração ($4000 \mu\text{g.mL}^{-1}$) duas frações (F.Cl., F.He.) foram as mais eficientes com taxa de inibição de 100 % para todos os 10 isolados. A fração acetato de etila (F.Ac.) apresentou efetividade apenas para os Oomicetos e a metanólica (F. Me) não foi efetiva. Os resultados revelam que apesar da alta concentração a fração acetato de etila apresenta substâncias específicas ao grupo dos Oomicetos. A filtração concentrou o princípio ativo de ampla ação na fração hexano.

Os testes com a concentração intermediária ($400 \mu\text{g.mL}^{-1}$) revelaram que a fração hexano (F.He) e clorofórmica (F. Cl) mostraram mais eficientes e comparativamente com

extrato bruto (E.B.) tem efeito similar ao concentrado 10 vezes ($4000 \mu\text{g.mL}^{-1}$). O E.B. não foi efetivo a 400 e a $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Comparando a duas frações mais efetivas, a hexânica inibiu todos os patógenos. A fração clorofórmica (F.Cl.) foi efetiva contra sete patógenos citando o *Pythium* sp., *M. perniciosa*, *C. gloeosporioides*, *C. musae*, *C. coccodes*, *C. truncatum*, *Cercosporidium* sp. e *Curvularia* sp. com taxas variando de 70 a 100%. Os patógenos com menor taxa de inibição foram *Phytophthora palmivora* e *Sclerotium rolfsii*. revelando efeito diferencial principalmente para os Oomicetos.

A avaliação dos tratamentos contra *Pythium* sp. teve resultados interessantes quando utilizadas as concentrações de 400 e $4000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, as frações menos polares obtiveram maior efetividade no controle desse microrganismo. Quando testadas em *P. palmivora* outro microrganismo da classe dos Oomicetos, os resultados seguem quase o mesmo padrão, diferindo apenas na concentração de $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A fração acetato se mostra a segunda mais ativa, expressando uma especificidade ao gênero abordado. As frações de polaridade menor mantiveram a efetividade quando testadas contra os Basidiomicetos *M. perniciosa* e *S. rolfsii*. A classe dos Ascomicetos representados por *C. gloeosporioides*, *C. musae*, *C. coccodes*, *C. truncatum*, *Cercosporidium* sp. e *Curvularia* sp. também se mostraram sensíveis a fração Hexânica e Clorofórmica nas dosagens de 400 e $4000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo que *Cercosporidium* sp. se mostrou menos sensível a dosagem de $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 3).

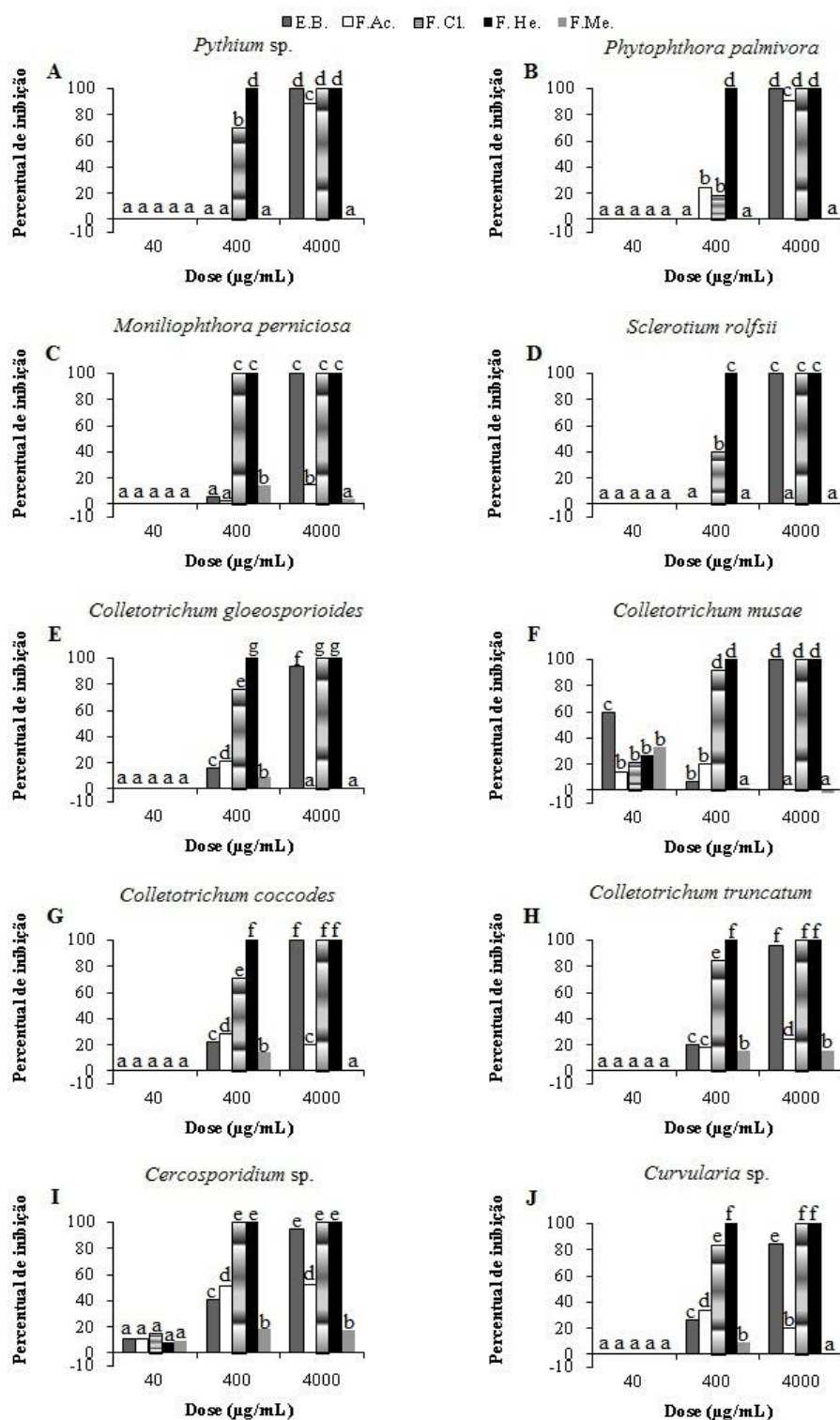
Chang et al. (2008) constataram o efeito fungitóxico do óleo essencial de *Calocedrus macrolepis* var. *formosana*, obtido após hidrodestilação e análise em cromatógrafo gasoso (CG), contra *Fusarium solani* tendo um controle de 50% e 80% para *Pestalotiopsis funerea*, comprovando que as técnicas cromatográficas promovem resultados significativos no controle de fitopatógenos. Outro dado que chama a atenção é o efeito dose/crescimento, no que se diz respeito às concentrações de 40, 400 e $4000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ da fração metanol, quando desafiado o microrganismo *C. musae*, quando aumentada a dosagem, menor foi o efeito do extrato, permitindo estudos mais aprofundados no que se diz respeito a fração no controle desse patógeno.

O processo de filtração que tendo como base, o extrato bruto, comprovou notoriamente que concentrando as substâncias do extrato de *L. origanoides* os resultados são mais consistentes e tendem a descoberta de substâncias com capacidade fungitóxica. Os efeitos das frações de *L. origanoides* podem estar ligadas a substâncias relatadas por Stashenko et al.. (2010) onde foram identificados três quimiotipos, de acordo com os principais compostos presentes no seu óleo essencial (quimiotipo A: p-cimeno, quimiotipo B: carvacrol e o quimiotipo C: timol). Vega-Vela e Sánchez (2012) relatam a atividade desta

espécie no controle de vários microrganismos, enfatizando a importância genética da espécie, por se tratar de uma planta que é submetida a condições ambientais extremas. As condições adversas enfrentadas por essa espécie somadas a sua grande variedade de compostos presentes na sua estrutura, a colocam, como uma planta ameaçada, pela exploração descontrolada. Na Colômbia, *L. origanoides* tem sido relatada em áreas semi-áridas (ALBESIANO, 2003; ALBESIANO; RANGEL-CH, 2006; SUÁREZ et al., 2008; STASHENKO et al., 2010). Justificando a caracterização das moléculas bioativas para aplicações agronômicas ao invés da utilização *in natura* através do uso de extratos desta planta.

Diversos compostos são considerados biologicamente ativos, exercendo ação específica sobre determinados microrganismos. Um grande número de compostos, obtidos de plantas, são eficientes no controle de patógenos, substâncias como: óleos essenciais, resinas, alcalóides, flavonóides e taninos, fazem parte desse arsenal produzido pelos vegetais. O controle pode ser decorrente da atividade antimicrobiana exercida diretamente contra o patógeno, eliminando o crescimento micelial (Figuras 4 e 5) ou inibindo a esporulação e a germinação de esporos. Outro mecanismo estudado é a ação indireta do produto sobre a planta hospedeira por meio da ativação dos mecanismos de resistência da própria planta, o que é denominado de indução de resistência. Os princípios bioativos (Compostos fenólicos, ácidos graxos, Alcalóides) de plantas podem exercer efeitos diretos, indiretos ou simultâneos na indução de resistência (VEZON et al., 2010).

Figura 3 – Atividade antimicrobiana do extrato bruto e Frações de *L. origanoides* contra fungos filamentosos. E.B., Fração Hexano (F.He), Fração clorofórmio (F.Cl.), Fração Acetato de etila (F.Ac.) e Fração metanol (F.Me.).



Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Fonte: Autor, 2013.

Figura 4 – Inibição do crescimento micelial dos extratos de alecrim a 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$: A – Controle, B – E. B., C – F. He., D – F. Cl., E – F. Ac. e F – F. Me.; 1 - *Pythium* sp., 2 - *C. gloeosporioides*., 3 - *C. musae*, 4 - *C. coccodes*, 5 - *C. truncatum*., 6 - *Cercosporidium* sp., 7 - *Curvularia* sp., 8 - *S. rolfsii*, 9 - *M. perniciososa* e 10 - *P. palmivora*.

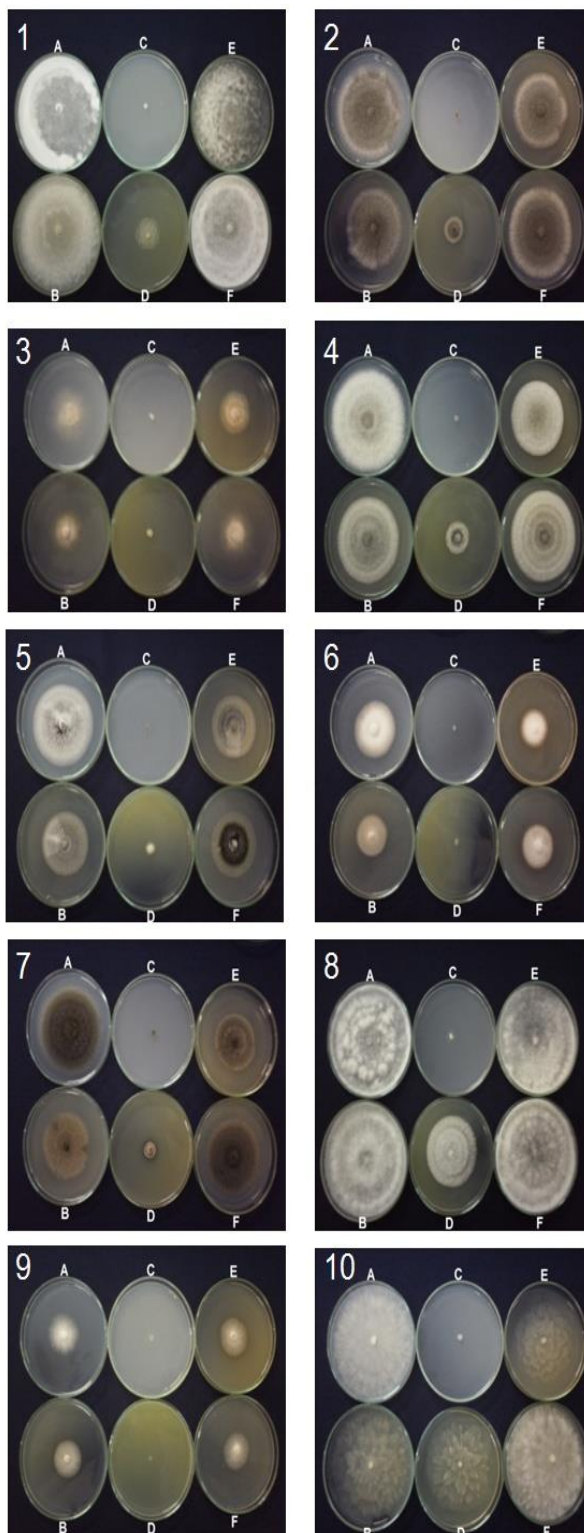


Foto: Autor, 2013.

Figura 5 – Inibição do crescimento micelial dos extratos de alecrim a 4000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$: A – Controle, B – E. B., C – F. He., D – F. Cl., E – F. Ac. e F – F. Me.; 1 - *Pythium* sp., 2 - *C. gloeosporioides*., 3 - *C. musae*, 4 - *C. coccodes*, 5 - *C. truncatum*., 6 - *Cercosporidium* sp., 7 - *Curvularia* sp., 8 - *S. rolfsii*, 9 - *M. pernicioso* e 10 - *P. palmivora*.

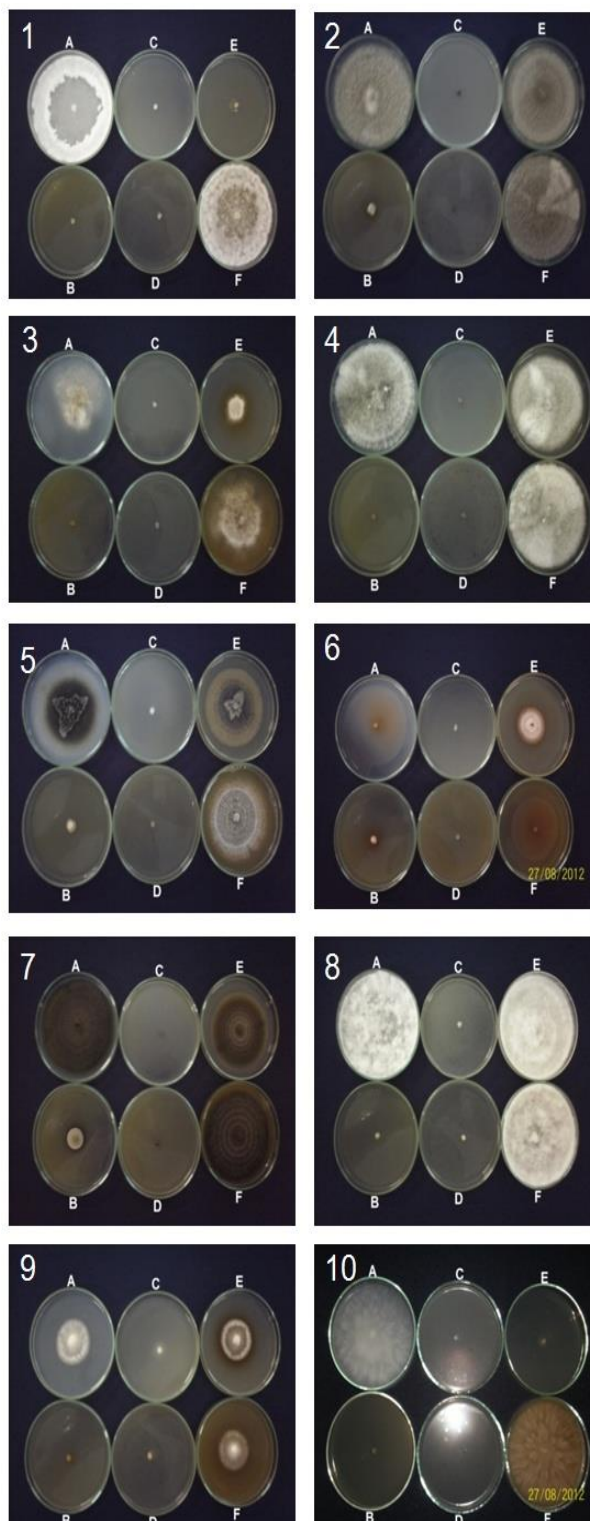


Foto: Autor, 2013.

4.3 Resposta de defesa em mudas Micro-tom (MT) tratadas com *L. origanoides*.

O potencial de indução de resistência foi avaliado após os resultados de fungitoxicidade dos extratos, direcionando o estudo para a espécie mais efetiva no controle de fungos filamentosos, a fração mais ativa e a concentração letal. Montou-se um ensaio com o extrato bruto de *L. origanoides* e as frações para verificar se os mesmos serviam como elicitores, ativando a resposta de defesa vegetal. A indução de resistência em plantas a patógenos vem incentivando as pesquisas na comunidade científica mundial, a fim de obter produtos mais eficientes e menos prejudiciais. Produtos que ativem os mecanismos de defesa de plantas estão contribuindo para uma redução nos índices de contaminação de alimentos por produtos de alta toxicidade (SANTOS et al., 2007).

Os resultados obtidos com o experimento em casa de vegetação, utilizando o Micro-tom (MT), como planta modelo, os extratos vegetais de *L. origanoides* e as frações demonstraram que o extrato bruto, não diferiu do tratamento controle, não induzindo a atividade das enzimas avaliadas nas condições estudadas. O experimento foi validado pelo tratamento como indutor Bion[®]. Este é um análogo do ácido salicílico e ativa reposta de defesa mediada pelo mesmo hormônio e típica contra fungos biotróficos. O Bion[®] [S-methyl benzo (1,2,3) thiadiazole-7-carbothioic] na dosagem de 200 µg.mL⁻¹, foi um eficiente indutor de resistência no tomateiro, pois obteve-se uma alta taxa de atividade nas enzimas PPO e POX quando comparado ao controle, mas não aumentou a atividade da enzima FAL. A dosagem é quatro vezes maior que a recomendada pelo fabricante e o material vegetal foi coletado com 72 horas após a pulverização. A dosagem recomendada pelo fabricante foi o melhor tratamento, quando se comparou a atividade das três enzimas associadas a resposta de defesa contra fitopatógenos. O Bion[®] à 50 µg.mL⁻¹ diferiu de todos os tratamentos obtendo maior incremento na atividade da PPO, FAL; e a POX. Revelando que uma maior quantidade do agente indutor pode resultar em um efeito negativo da indução de resistência.

No ensaio o E.B. não ativou a resposta de defesa. No entanto as frações obtidas do mesmo extrato aumentaram as atividades das enzimas polifenoloxidase (PPO), peroxidase (POX) e fenilalanina amônia-liase (FAL), indicadoras da indução da resposta de defesa da planta. A não ativação da resposta por E.B. revela que a ativação pelo extrato não é devido a uma simples resposta a indução abiótica de contato com a mistura de substâncias exógenas, mas, o resultado da ação específica de substâncias concentradas durante o processo de fracionamento. Comparando as frações e o padrão das enzimas ativadas verifica-se padrão de indução distinto para as frações. Em relação ao tratamento controle, as frações acetato,

clorofórmio e metanol tiveram atividade da PPO que variaram entre 4,04 e 4,96 U.A. min.⁻¹mg proteína⁻¹; não se diferenciando dos tratamentos com Bion[®]. Quanto a peroxidase (POX) os extratos não tiveram atividade eliciadora, sendo o produto comercial o melhor tratamento com uma atividade variando entre 13,12 e 14,04 U.A. min.⁻¹mg proteína⁻¹. As frações de Hexano, Clorofórmio, Metanol e Bion[®] na dosagem 50 µg.mL⁻¹ promoveram um incremento na atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL) de 3,88; 3,63; 4,59 e 4,80 U.A. min.⁻¹mg proteína⁻¹, respectivamente. O Bion[®] na dosagem 200 µg.mL⁻¹ não se diferenciou do tratamento controle, sendo a Fração acetato de etila a mais ativa com um incremento de 6,85 U.A. min.⁻¹mg proteína⁻¹ (Tabela 1).

A fração hexano, que inibiu 100% do crescimento micelial de todos os isolados testados nos ensaios *in vitro*, não aumentou a atividade da enzima polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POX), mas houve uma maior atividade de fenilalanina amônia-liase (FAL), cujo aumento foi de até três vezes o do tratamento controle. No que confere o estudo, a atividade da fração clorofórmio, com letalidade contra os isolados na dosagem a 4000 µg.mL⁻¹, também obteve resultados com a concentração de 400 µg.mL⁻¹ induzindo a produção das enzimas PPO e FAL. No estudo sobre a atividade enzimática foi observado que a fração acetato incrementou a produção de PPO e fez com que a o Micro-tom aumentasse a síntese de FAL em até seis vezes mais que o controle. As substâncias presentes na fração metanol tiveram atividade fungitóxica contra *C. musae in vitro* quando reduzida a dosagem. Nos ensaios de indução de resistência a fração a 400 µg.mL⁻¹ se mostrou ativa, promovendo o incremento da atividade de fenilalanina amônia-liase em quatro vezes no que se refere as plantas pulverizadas com o controle. A Fração hexânica demonstrou incremento da FAL e as frações F.Cl. F.Ac. e F.Me. induziram a atividade das enzimas PPO e FAL revelando que possivelmente as frações apresentem substâncias que ativem a expressão de diferentes genes.

A FAL participa ativamente da síntese de fitoalexinas que são substâncias de baixo peso molecular, com atividade antimicrobiana produzida pelas plantas em resposta a estresses físicos, químicos ou biológicos sendo capazes de impedir ou reduzir a atividade de agentes patogênicos, sendo a taxa de produção/acúmulo dependente dos genótipos do hospedeiro e/ou patógeno (LO et al., 1996). As frações hexano, clorofórmio e metanol, tiveram atividades similares ao tratamento com Bion[®] na dosagem recomendada pelo fabricante.

Na atividade de peroxidase, acibenzolar-S-metil ao ser pulverizado nos microtomateiros pode ter ativado espécies reativas de oxigênio devido à alta atividade da POX. Observa-se que o mesmo diferil do controle, os tratamentos com as frações clorofórmio e hexano, respectivamente, atingiram uma atividade próxima ao produto comercial.

Lembrando que as frações, contêm diversas substâncias na sua composição, não sendo um produto totalmente puro.

A síntese de PPO a enzima é bastante conhecida por participar do grupo das oxirredutases e contém o cobre como grupo prostético (MENDONÇA; GUERRA, 2003). A mesma está relacionada à oxidação de compostos fenólicos advindos de produtos secundários que contêm um grupo fenol, isto é, um grupo hidroxila funcional em um anel aromático, produzidas pelas plantas e que apresentam uma variedade de funções nos vegetais (TAIZ; ZEIGER, 2009). A PPO compreende duas enzimas distintas, cuja diferença está relacionada à especificidade aos substratos. A primeira, denominada lacase, e a segunda denominada tirosinase, cresolase, catecol oxidase, fenolase ou orto-difenol oxidase.

A ação da PPO está relacionada à formação de ligações cruzadas entre grupos fenólicos em proteínas de parede, pectinas e outros polímeros de parede; unindo-os de maneira complexa. A lignina, um componente da parede celular secundária, é um polímero de grupos fenilpropanóides altamente ramificado e irregular que une as subunidades aromáticas de três diferentes álcoois fenilpropanóides (coniferil, cumaril e cinapil). Essas subunidades, sintetizadas a partir da fenilalanina, são secretadas para a parede celular dos vegetais onde são oxidadas no local apropriado pelas enzimas polifenoloxidase e peroxidase (TAIZ; ZEIGER, 2009). Essa atividade confere resistência ao ataque de diversos microrganismos que causam doenças nos vegetais.

A diferença do padrão apresentado pelas frações comparativamente com a indução com O Bion[®]. Reforça a ideia de que as moléculas podem estar ativando um via diferente da regulada pelo Bion[®]. No ensaio, a melhor fração foi a que teve menor atividade fungitóxica e a fração menos ativa no incremento enzimático obteve melhor ação na inibição do crescimento micelial dos microrganismos testados. Demonstrando que a avaliação de potencial de extratos de plantas principalmente para indução deve ser realizada de forma mais criteriosa considerando o fracionamento dos extratos.

A natureza das moléculas deve ser evidenciada haja vista que diferentes substâncias têm apresentado potencial na indução de resistência, evidenciado por avaliações *in vivo* no controle de patógenos e atividade enzimática. Filtrado do micélio de *Rhizopus* sp.; quitosana de *Rhizopus* sp. e *Trichoderma* sp.; extratos de casca *in natura* e seca de maracujá; extrato metanólico de casca seca de frutos de maracujá; acibenzolar-S-metil (ASM – 200 µg.mL⁻¹); foram efetivas no controle de *Verticillium* em mudas de cacaueiro com 30 dias, sendo observada atividades de POX em torno de 15 U.A/mg de proteína/min após 96 horas da pulverização, tanto do ASM, quanto do filtrado do micélio de *Rhizophus* sp. Já os valores da

atividade da PPO foram 55 U.A/mg de proteína/min para o tratamento com ASM e de 45 U.A/mg de proteína/min para o filtrado do micélio de *Rhizopus* sp (PEREIRA et al., 2008). Em outras situações plantas infectadas são utilizadas como fonte de moléculas de tecidos infectados. Extratos aquosos produzidos a partir de ramos de lobeira (*Solanum lycocarpum*) com sintomas de vassoura-de-bruxa induziram proteção em mudas de cacaueiros contra a mesma doença em nível estatisticamente similar à proteção conferida pelo ASM, Sendo o controle do patógeno associado ao incremento da atividade das enzimas peroxidase, quitinase e β -1,3-glucanase. O acúmulo de lignina também foi verificado como marcador da indução de resistência (RESENDE et al., 2007).

Geralmente o padrão de controle utilizado para comparação são moléculas que ativam a via do ácido salicílico que regula a reposta de defesa efetiva contra fungos biotróficos. O padrão serve para indicar a manifestação da indução nos eventos nos experimentos avaliados. No tomateiro vários trabalhos identificaram o ASM como um potente indutor de resistência apresentando redução significativa na severidade do cancro bacteriano causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (KRONKA, 2004). Também conferindo proteção contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*) do tomateiro, promovida pelo Ecolife[®], foi evidenciada no trabalho realizado por Cavalcanti et al. (2006), com aumento da atividade de peroxidases e polifenoloxidasas. O mesmo indutor protegeu tomateiros contra *Cucumber mosaic virus* (ANFOKA, 2000).

Neste estudo, no entanto, é necessário identificar a via na qual as moléculas indutoras atuam sendo necessário associar o padrão de indução enzimático com demais enzimas e expressão gênica. Desta forma o estudo priorizou o cultivar Micro-tom para que estudos futuros de expressão gênica possam ser, realizadas com esta espécie que já apresenta o genoma sequenciado e em especial a cultivar que apresenta acessos com mutantes caracterizados para diferentes vias de reposta hormonal e genes marcadores para estudo de expressão gênica para resposta de defesa mediada por ácido salicílico, jasmonato e etileno (MEISSNER et al., 1997; LI et al., 2001)

No contexto no qual a fração não fungitóxica é a melhor indutora e que o extrato bruto mascara o efeito de substâncias indutoras. Os extratos das três espécies ainda podem servir como fonte de moléculas indutoras de resistência.

Tabela 1 – Atividade enzimática de Polifenoloxidase (PPO), Peroxidase (POX) e Fenilalanina amônia-liase (FAL), em mudas de Micro-tom cultivadas em casa de vegetação e pulverizadas com *L. origanoides*.

Tratamento	Atividade Enzimática		
	PPO	POX	FAL
	(U.A. min. ⁻¹ mg proteína ⁻¹)		
Controle	1,73b*	6,01b	1,03c
Extrato bruto	1,73b	7,54b	2,40c
Fração hexano	2,53b	8,66b	3,88b
Fração clorofórmio	4,96a	6,55b	3,63b
Fração acetato	4,25a	7,32b	6,85a
Fração metanol	4,04a	9,70b	4,59b
Bion [®] 200 µg.mL ⁻¹	6,03a	14,04a	2,18c
Bion [®] 50 µg.mL ⁻¹	5,70a	13,12a	4,80b
C.V. (%)	31,07	28,32	34,44

*Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

5 CONCLUSÃO

As plantas medicinais coletadas de um ambiente extremo são candidatas promissoras para seleção de moléculas com potencial biocida e indutor de resistência. No entanto, o trabalho revela que a avaliação do extrato bruto, isoladamente, não expressa totalmente o potencial da espécie estudada haja vista que o fracionamento revelou moléculas com ação específica e indutoras de resistência. Indicando que as três plantas descartadas no teste inicial devem ser ainda consideradas no estudo. No estudo, o Alecrim demonstrou ser uma fonte rica de moléculas, revelando três substâncias potenciais para controle de fitopatógenos: uma fungitóxica de ampla ação, outra específica à Oomiceto e no mínimo uma substância indutora de resistência.

REFERÊNCIAS

- AERTS, R. J. et al. Allelopathic inhibition of seed-germination by Cinchona alkaloids. **Phytochemistry**. Oxford: Pergamon press, v. 30, p. 2947-2951, 1991.
- AGRA, M. F. et al. Medicinais e produtoras de princípios ativos. In: SAMPAIO, E.V.S.B.; PAREYN, F. G. C.; FIGUEIRÔA, J. M.; SANTOS JÚNIOR, A. G. (Ed.). **Espécies da flora nordestina de importância econômica potencial**. Recife: Associação de Plantas do Nordeste, Recife, p. 135 – 198, 2005.
- AGUIAR-MENEZES, E. L. **Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 58 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 205), 2005.
- ALBESIANO, S.; RANGEL-CH, J.O. **Estructura de La vegetación del Cañón del río Chicamocha, 500 – 1200 m; Santander - Colombia: una herramienta para la conservación**. *Caldasia* v.28, p. 307–325, 2006.
- ALBESIANO, S. **La vegetación del Cañón del río Chicamocha (Santander, Colombia)**. *Caldasia* v. 25, p. 73–99, 2003.
- ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal plants of the *caatinga* (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, V. 114, p. 325 – 354, Elsevier Ireland Ltd., 03 de Dezembro, 2007.
- ALBUQUERQUE, U.P.; ANDRADE, L.H.C.; SILVA, A.C.O. Use of plant resources in a seasonal dry Forest (Northeastern Brazil). **Acta Botanica Brasilica**, 19, 27–38, 2005.
- ALMEIDA, C.F.C.B.R. et al. Medicinal plants popularly used in the Xingó region a semi arid location in Northeastern Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine** 2, 15, 2006.
- ALVES, J. J. A.; ARAÚJO, M. A. D. ; NASCIMENTO, S. S. D. Degradação da caatinga: uma investigação ecogeográfica. **Revista Caatinga**, v. 22, p.126-135, 2009.

AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia I: Princípios e Conceitos**. Agronômica Ceres, São Paulo, 4ª Ed., v. 2, 2011.

ANFOKA, G. H. Benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester induces systemic resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*. Mill cv. Vollendung) to *Cucumber mosaic virus*. **Crop Protection**, v. 19, p. 401-405, 2000.

BARBONI, L. et al. Alkaloid content in four spartium junceum populations as a defensive strategy against predators. **Phytochemistry**, v. 37, n. 4, p. 1197-1200, 1994.

BARROS, P.N. et al. Atividade antimicrobiana de extratos de plantas da caatinga a *Fusicoccum* sp. In: **ANAIS DO V CONGRESSO NORTE NORDESTE DE PESQUISA E INOVAÇÃO**, Maceió-AL, 2010.

BASTOS, C. N.; SILVA, D. M. M. H. Efeito do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* no controle de *Crinipellis pernicioso*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NATURAIS, 2., 2002, Fortaleza. **Anais...**Fortaleza: Academia Cearense de Ciências, 2002.

BAUER, A. W. **Amer. J. Clin. Pathol.** V.45, p. 493, 1966.

BAX, A.; FREEMAN, R. **J. Mag. Reson.** 44, 542. 1981.

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

BRAZ-FILHO, R. Química de produtos naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. A peregrinação de um pacaturno. **Química Nova**, v. 17, n. 5, p. 405-445, 1994.

BROWN, W. H. Organic Chemistry, **Saunders College Publishing**, USA 1995.

BYRNE, L. T. In Bioactive Natural Products. Detection, Isolation and Structure Determination, COLEGATE, M. S.; MOLYNEUX, R. J. Eds., **CRC Press**, Boca Raton, FL 1993.

CAMARGO, L.E.A. Genética da interação patógeno-hospedeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia I: Princípios e Conceitos**. Agronômica Ceres, São Paulo, 4ª Ed., V.2, Cap. VI, p. 119, 2011.

CAMPOS, A. D. ; SILVEIRA, E. M da L. **Metodologia para determinação da peroxidase e da polifenol oxidase em plantas**. Pelotas: Embrapa, 2003. (Comunicado Técnico, 87).

CARTAXO, S.L.; SOUZA, M.M.A.; ALBUQUERQUE, U.P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology** 131, 326–342, 2010.

CASTRO, H. G.; FERREIRA, F. A. A dialética do conhecimento no uso das plantas medicinais. Revista Brasileira de Plantas Medicinais – **Brazilian Journal of Medicinal Plants**, v. 3, n. 2, p. 19 – 21, 2001.

CASTRO, H. G. et al. Contribuição ao estudo das plantas medicinais metabólitos secundários. **Fatores que influenciam a produção de metabólitos secundários**. 2. ed. Visconde do Rio Branco: Suprema, p.89-101, 2004a.

CASTRO, H. G. et al. Contribuição ao estudo das plantas medicinais metabólitos secundários. **Importância das plantas medicinais**. 2. ed. Visconde do Rio Branco: Suprema, p.04-22, 2004b.

CASTRO, H. G. et al. Contribuição ao estudo das plantas medicinais metabólitos secundários. **Natureza dos metabólitos secundários**. 2. ed. Visconde do Rio Branco: Suprema, p.33-85, 2004c.

CAVALCANTI, F.R. et al. Induced defence responses and protective effects on tomato against *Xanthomonas vesicatoria* by an aqueous extract from *Solanum lycocarpum* infected with *Crinipellis pernicioso*. **Biological Control**. v. 39, p. 408-417, 2006.

CAVALCANTI, L.S. et al. Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba SP. **FEALQ**. pp. 51-80, 2005.

CECHINEL FILHO, V. et al. **J. Ethnopharmacol.** v. 53, p. 171, 1996

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural e otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CHANG, HUI-TING et al. Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* Florin leaf against plant pathogenic fungi. **Bioresource Technology**. v. 99, p. 6266–6270, 2008.

CICCIÓ, J. F. **Ing. Cien. Quim.** 15, 15. 1995.

CIPOLLINI, D. F. Does competition magnify the fitness costs of induced responses in *Arabidopsis thaliana*: A manipulative approach. **Oecologia**. v. 131, p. 514-520. 2002.

CORDELL, G. A. Changing strategies in natural products chemistry. **Phytochemistry**, v. 40, n. 6, p. 1585-1612, 1995

CORDELL, G. A. Introduction to alkaloids: A Biogenetic approach. Nova York: **John-Wiley & Sons**, p. 208, 1981.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural Products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Eds.) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, Rockville: **American Society of Plant Physiologists**, p. 1250-1318, 2000.

DAVIS, R. M. Control of *Phytophthora* root and foot rot of Citrus with systemic fungicides Metalaxyl and Phosethyl Aluminum. **Plant Disease**, v. 86, n. 3, p. 218-220, 1982.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: Um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, n. 7, p. 21-25, 1998.

EMBRAPA MONITORAMENTO POR SATÉLITE. Banco de dados climáticos do Brasil. Disponível em <http://www.bdclima.cnpm.embrapa.br/resultados/balanco.php?UF=&COD139>. Acesso em 15 de Mar. 2013, 22:57:00.

FEICHTENBERGER, E. Doenças incitadas por *Phytophthora* em citros. In: LUZ, E. D. M. N. et al. (Eds.). Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil. Campinas: **Editora rural**. 283-332 p, 2001.

FERNANDO, W. G. et al. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 955-964, 2005.

FRANZENER, G. et a. Atividade antifúngica e indução de resistência em trigo a *Bipolaris sorokiniana* por *Artemisia camphorata*. **Acta Scientiarum**. Agronomy, v.25, n.2, p.503-507, 2003.

FRY, S. C. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell wall of angiosperms. **Annual Review of Plant Physiology**. v.37, p.165-186, 1986.

FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p.627-641, 2008.

FURTADO, L. M. Utilização de Ecolife® e Acibenzolar-s-metil (ASM) no controle da antracnose da banana em pós-colheita. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 36, n. 3, p.237-239, 2010.

GASPAROTTO, L. et al. Efeito do Ecolife-40 no controle da sigatoka negra da bananeira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NATURAIS, 1., **Anais...**Fortaleza-CE: Academia Cearense de Ciências, p. 52, 2000.

GHOSH-HAZRA, A.; CHATTERJEE, P. A. Nontoxic antitumour compound from the leaves of *Bauhinia scandens* characterized as 1-O-alkyl glycerol by gas–liquid chromatography and evaluation of its antitumour property by Brine Shrimp bioassay. **Ind. Crops Prod.** 27, 39–43, 2008.

GÓMEZ-SERRANILLOS, M. P.; CARRETERO, M. P.; VILLAR, A. **Fitoterapia**, 66, 156, 1995.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3864, 1991.

HARBORNE, J. B. Classes and functions of secondary products, In: WALTON, N. J.; BROWN, D. E. (Ed.). *Chemicals from plants, perspectives on secondary plant products*. London: **Imperial College**, p.1-25, 1999.

HARBORNE, J. B. *Introduction to Ecological Biochemistry*. London: **Academic Press**. 1988.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical Methods**. London: Chapman & Hall. 1998.

HEFENDEHL, F. W.; MURRAY, M.J. Genetic aspects of the biosynthesis of natural odors. **Lloydia**, v. 39, n. 1, p. 39-52, 1976.

HERRMANN, K. M. The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. **The Plant Cell**, v. 7, p. 907-919, 1995.

HOAGLAND, R. E. Biochemical responses of plants to pathogens. In: HOAGLAND, R. E. (Ed.). *Microbes and microbial products as herbicides*. Washington, **American Chemical Society**, p. 87-113, 1990.

HUSSAIN, A. I. et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chem.** v. 108, p. 986-995, 2008.

INTRAPUK, C. I.; TAKANO, M.; SHINMYO, A. Nucleotide sequence of a new cDNA for peroxidase from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**. v.104, p.285-286, 1994.

ISHIGE, F. et al. Identification of a basic glycoprotein induced by ethylene in primary leaves of azuki bean as a cationic peroxidase. **Plant Physiology**. v.101, p.193-199, 1993.

ISHII, H. Impact of fungicide resistance in plant pathogens on crop disease control and agricultural environment. **Jpn. Agric. Res. Q.** v. 40, p. 205–211, 2006.

JEENER, J. et al. **J. Chem. Phys.** v. 71, p. 4546. 1979.

KAVRAYAN, D.; AYDEMIR, T. Partial purification and characterization of polyphenoloxidase from peppermint (*Mentha piperita*). **Food chemistry**, v. 74, n. 2, p. 147-154, 2001.

KEMP, W. Organic Spectroscopy, 2a. ed., **Macmillan Education Ltda.**, Hong Kong 1987.

KOSSEL A. Über die chemische Zusammensetzung der Zelle. **Archiv für Physiologie** p. 181-186, 1891.

KRONKA, A.Z. **Cancro bacteriano no tomateiro: metodologia de inoculação, reação de genótipos do hospedeiro e eficiência de químicos sobre o controle.** 2004. 79 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

KUSKOSKI, E. et al. Propriedades químicas y farmacológicas del fruto guaraná (*Paullinia cupana*). **Rev. Fac. Quím. Farm.** v. 12, p. 45–52, 2005.

LEONI, C.; GHINI, R. Efeito do Lodo de Esgoto na Indução de Supressividade *in vitro* a *Phytophthora nicotianae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 67-75, 2003.

LI L, LI C, HOWE GA. Genetic analysis of wound signaling in tomato. Evidence for a dual role of jasmonic acid in defense and female fertility. **Plant Physiol.** v. 127, p. 1414–1417, 2001.

LI, J. et al.. *Arabidopsis* mutants are hypersensitive to UV-B radiation. **Plant Cell**, v. 5, p. 171-179, 1993.

LIM, Y.; MURTIJAYA, J. Antioxidant properties of *Phyllanthus amarus* extracts as affected by different drying methods. **LWT-Food Sci. Technol.** v. 40, p. 1664–1669, 2007.

LIMA, E. O. et al. **Acta Farm. Bom.** v. 14, p. 213, 1995.

LIMA, J.S. et al. Atividade fungitóxica de extratos vegetais de plantas da caatinga sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* EM *Vitis vinifera* L. In: **ANAIS DO V CONGRESSO NORTE NORDESTE DE PESQUISA E INOVAÇÃO**. Maceió – AL, 2010.

LO, L. C. et al. Phytoalexin accumulation in sorghum: identification of a methyl ether of luteolinidin. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v.49, p.21-31, 1996.

LOAYZA, I. et al. Essential oils of *Baccharis salicifolia*, *B. latifolia* and *B. dracunculifolia*. **Phytochemistry**, v. 38, n. 2, p.381-389, 1995.

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

MA, Z.H.; MICHAILIDES, T.J. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. **Crop Protection**. v.24, p. 853–863, 2005.

MAGALLANES, C.; CÓRDOVA, C.; OROZCO, R. Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de macroalgas marinas de la costa central del Perú. **Rev. Peru. Biol.** v. 10, p. 125–132, 2003.

MANN, J. Secondary metabolism. 2. Ed. Oxford: **Clarendon Press**, 374 p. 1995.

MARINI-BETTÓLO, G. B. et al. **J. Chromatogr.** v. 213, p. 113, 1981.

MARKHAM, K. R. Techniques of Flavonoid Identification, **Academic Press**, London 1982.

MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. **J. Chromatogr.** v. 658, p. 315, 1994.

MEDEIROS, F.C.L. et al. Expressão Gênica Comparativa: O caso do Fitoforce®. In: **ANAIS DO X SIMPÓSIO DE CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS: INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA NOVOS CONCEITOS E APLICAÇÕES**, Lavras – MG, p. 161-168, 2010.

MEISSNER, R. et al. A new model systema for tomato genetics. **Plant Journal**, v.12, p.1465-1472, 1997.

MENDONÇA, S. C.; GUERRA, N. B. Métodos físicos e químicos empregados no controle do escurecimento enzimático de vegetais. **Boletim SBCTA**, Campinas, v. 37, n. 2, p. 113-116, 2003.

MENTEN, J. O. M. et al. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. “*in vitro*”. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 1, n. 2, p. 57- 66, 1976.

MEYER, M.W.; KARASOV, W.H. Chemical aspects of herbivory in arid and semiarid habitats. In: PALO, R.T.; ROBBINS, C.T (Eds). Plants defenses against mammalian herbivory. Boca Raton: **CRC Press**, 1991 p. 167-187.

MITSCHER, L.A. et al. **LLOYDIA**. v. 35, p. 157, 1972.

MONTEIRO, J. M. et al. Use patterns and knowledge of medicinal species among two rural communities in Brazil's semi-arid northeastern region. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 105, p. 173–186, 2006.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. p. 7-14, 2009.

MUZQUIZ, M. et al. Variation of alkaloid components of lupin seeds in 49 genotypes of *Lupinus albus* L. from different Counties and Locations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 7 p. 1447 – 1450, 1994.

NICHOLSON, R. L. Events in resistance expression in maize and sorghum: Molecular and biochemical perspectives. **Summa Phytopathologica**. v.21, p.95-99, 1995.

NICHOLSON, R. L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**. v.30, p.369-389, 1992.

OLIVEIRA, N. V. **Estudo fitoquímico e da atividade biológica das folhas e do caule da espécie *Acacia langsdorfii* Benth (LEGUMINOSACEAE)**. 2009. Cap. III, p. 88 – 89. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Alagoas, 2009.

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

PEREIRA, R. B. et al. Ativação de defesa em cacaueiro contra a murcha-de-verticílio por extratos naturais e acibenzolar-S-metil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43(2), p. 171-178, 2008.

PÉREZ-PACHECO, R. et al. Toxicidad de aceites, esencias y extractos vegetales en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Acta Zool. Mex.** 20, 141–152, 2004.

PINTO, E. et al. In vitro susceptibility of some species of yeasts and filamentous fungi to essential oils of *Salvia officinalis*. **Industrial Crops and Products**. v. 26, p. 135 - 141, 2007.

RESENDE, M. L. V. et al. Seleção de extratos vegetais para indução de resistência e ativação de respostas de defesa em cacaueiro contra a vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**. v. 32, p. 213-221. 2007.

RIOS, J. L. et al. **Fitoterapia**, v. 57, p. 153, 1986.

RODRÍGUEZ, D. J. R. et al. In vitro antifungal activity of extracts of Mexican Chihuahuan Desert plants against postharvest fruit fungi. **Industrial Crops and Products**. v. 34, p. 960–966, 2011.

ROJAS-FERNÁNDEZ, J. A. et al. Metabolitos secundarios de líquenes de la zona nival de la Sierra Nevada de Mérida - Venezuela y su papel en la absorción de la radiación ultravioleta. **Anales Jard. Bot. Madrid**. V. 65, p. 59–72, 2008.

ROQUE, A. A.; ROCHA, R. M.; LOIOLA, M. I. B. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, n. 1, p. 31-42, 2010.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. Plant physiology. Claifornia: **Wadsworth Publishing Company**. 682 p., 1991.

SANTOS, F. S. et al. Efeito de extratos vegetais no progresso de doenças foliares do cafeeiro orgânico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32(1), jan - fev 2007.

SAN-LANG, WANG et al. Production of antifungal compounds from chitin by *Bacillus subtilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 3, p. 321-328, 02 August 2002.

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, n. 1/2, p. 129-137, 2000.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. et al. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 554-556, 2003.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. et al. Efeito do extrato bruto de plantas medicinais na indução de fitoalexinas em soja e sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 346-346, 1997. (Resumo)

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

SHRINER, R.L. et al. **Identificação Sistemática de Compostos Orgânicos**. Ed. Guanabara Dois, Rio de Janeiro, p. 318-363, 1983.

SIBAT. **Organic pest control in rice, corn and vegetables**. Techno-Series 1, Quezon City, Phillipines, 1993.

SILVA, F. A. S. E.; AZEVEDO, C. A. V. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, 2009.

SILVA, I. et al. **Noções sobre o organismo humano e utilização de plantas medicinais**. 4. ed. Cascavel: Assoeste, 1995.

SILVA, M.B. et al. **Extratos de plantas e seus derivados no controle de doenças e pragas**. In: VEZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J.; PALLINI, A. Controle Alternativo de Pragas e Doenças na Agricultura Orgânica. EPAMIG, Viçosa-MG 2010.p.33-50. 2010a.

SILVA, M. S. et al. Plantas medicinais usadas nos distúrbios do trato gastrintestinal no povoado de colônia Treze, Lagarto, SE, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. v. 20, p. 815 – 829, 2006.

SILVA, P.S. et al. Chemical composition of the essential oil and hexanic fraction of Lippia and Lantana species. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 20(6), p. 843-849, Dez. 2010b.

SILVERSTAIN, R.M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 5a. ed., Ed. Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro 1994.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. UFSC/Florianópolis. 821 p., 1999.

SOUZA-SILVA, R. F.; RAPINI, A. *Allamanda caticola* (Apocynaceae), a overlooked new species from limestone outcrops in the State of Minas Gerais and Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Pharnocognosy**, v. 19, p.349-352, 2009.

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

STANGARLIN, J.R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**. Volume 10, número 1 - p. 18-46, 2011.

STASHENKO, E. E. et al. *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. **J. Sep. Sci.** v. 33, p. 93–103, 2010.

STILL, W. C.; KAHN, M.; MITRA, A. **J. Org. Chem.** v. 13, p. 3926, 1978.

SUÁREZ, A. G., G. CASTILLO; CHACÓN, M. I. Genetic diversity and spatial genetic structure within a population of an aromatic shrub, *Lippia origanoides* (Verbenaceae), in the Chicamocha Canyon, northeastern Colombia. **Genet. Res.** v. 90, p. 455–465, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed,. 819 p. 2009.

UGAZ, O.L. **Análisis fitoquímico y metabolitos secundarios**. Disponível em: <<http://www.maca-peruana.com/analisis.htm>>. Acesso em: 19 janeiro 2013.

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

VEGA-VELA, N. E.; SÁNCHEZ, M. I. C. Genetic structure along an altitudinal gradient in *Lippia origanoides*, a promising aromatic plant species restricted to semiarid areas in northern South America. **Ecology and Evolution**. v. 2(11), p. 2669–2681, 2012.

VEZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J.; PALLINI, A. Controle Alternativo de Pragas e Doenças na Agricultura Orgânica. In: SILVA, M.B. et al. **Extratos de plantas e seus derivados no controle de doenças e pragas**. EPAMIG, Viçosa-MG, p.33-50, 2010.

VIDHYASEKARAN, P. et al. Physiology of disease resistance in plants. Volume 2. **CRC Press, Inc.**, 1988.

VOGEL, A. I. **Ao Livro Técnico S. A.** Química Orgânica, vol 1, 3a. ed. Rio de Janeiro, RJ, p. 172, 1988.

WATERMAN, P. G. Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production. **Essex: Longman Group**, p. 47-61, 1993.

WHISTON, C. **X-Ray Methods**, PRICHARD, F. E. Ed., JOHN WILEY & SONS, London 1987.

WICHENEWSKI, W. **In introdução a métodos cromatográficos**; COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L., 3a ed., Ed. Unicamp, Campinas, São Paulo, p. 71, 1988

WILPS, H. et al. The effect of *Melia volkensii* extracts on mortality and fitness of adult *Schistocerca gregaria* (Forsk.) (Orth., Cyrtacanthacrinae): investigations conducted under natural conditions in *S. gregaria* recession areas in the southern Tamesna Desert (Republic of Niger). **Z. Angew. Entomol.** v. 6, p. 12–19, 1993.

YANG DAN et al. Crop protection Activities of essential oils from *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum* against five phytopathogens. **Crop Protection.** v. 29, p. 295–299, 2010.