

GILCIANNY PIGNATA CAVALCANTE

**EXTRATOS DE *Stryphnodendron adstringens* e *Caesalpinia ferrea* NO
CONTROLE DE BACTERIOSES DO TOMATEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

C376e
2013

Cavalcante, Gilcianny Pignata, 1980-
Extratos de *Stryphnodendron adstringens* e
Caesalpinia ferrea no controle de bacterioses do tomateiro /
Gilcianny Pignata Cavalcante. – Viçosa, MG, 2013.
x, 54f. : il. ; 29cm.

Orientador: José Rogério de Oliveira
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Solanum lycopersicum*. 2. *Pseudomonas syringae*.
3. *Ralstonia solanacearum*. 4. *Clavibacter michiganensis*.
5. Taninos. 6. Saponinas. 7. Acibenzolar-S-metil. 8. Tomate -
Doenças e pragas - Controle biológico. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Fitopatologia. Programa
de Pós-Graduação em Fitopatologia. II. Título.

CDD 22. ed. 635.64296

GILCIANNY PIGNATA CAVALCANTE

**EXTRATOS DE *Stryphnodendron adstringens* e *Caesalpinia ferrea* NO
CONTROLE DE BACTERIOSES DO TOMATEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 27 de fevereiro de 2013.

Prof. João Paulo Viana Leite
(Co-orientador)

Prof. Fabrício de Ávila Rodrigues

Prof^a. Beatriz Gonçalves Brasileiro

Dr^a. Renata Sousa Resende

Prof. José Rogério de Oliveira
(Orientador)

À DEUS,

Aos meus pais, Gilson Batista Cavalcante (*in memorian*) e Dora Silvia Pignata Cavalcante, pelo amor e dedicação, à minha querida irmã Gilianny pelo estímulo e carinho, minha avó Maria (*in memorian*) pelo incentivo, e aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre está comigo nos momentos mais difíceis, sempre me dando sabedoria e coragem para prosseguir.

Aos meus pais Gilson e Dora, exemplos de honestidade, pela educação que me deram e pelo esforço em sempre me proporcionar o melhor. Tudo que tenho e tudo que sou devo ao incentivo e apoio que eles sempre me deram. Especialmente minha mãe que contribuiu direta e indiretamente para que eu concluísse mais esta etapa da minha vida.

À minha amada irmã Gilianny Nickerson, por tudo que tem feito por mim, pelos conselhos, incentivos, sempre me dizendo que eu posso e vou conseguir.

Ao meu cunhado Tory Nickerson que é como um irmão para mim.

Ao meu sobrinho Noah, que é a prova real de que Deus existe e pode fazer milagres em nossa vida.

Ao professor José Rogério de Oliveira que foi como um pai, pelos ensinamentos transmitidos, amizade e carinho.

Aos professores Fabrício de Ávila Rodrigues e João Paulo Viana Leite, pela ajuda, críticas e sugestões.

À Maria Sueli de Oliveira Cardoso, pela amizade, ensinamentos e por transmitir sua experiência de anos no laboratório de bacteriologia.

Aos colegas do Laboratório de Bacteriologia de Plantas, Lívio e Patrícia, pelos conselhos, idéias e ajuda na execução de experimentos.

À Renata, pelos conselhos e por compartilhar sua experiência durante a execução dos ensaios enzimáticos.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa por compartilharem suas experiências e ensinamentos.

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudo e pelo auxílio financeiro para a execução deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial o Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade que me deram de realizar o curso de Doutorado.

Aos funcionários da casa de vegetação Delfim e Dagoberto que sempre me ajudaram em todos os momentos que precisei.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia Bráz, Elenize e Sara por todas as informações, ajuda e gentilezas.

Aos meus amigos da Primeira Igreja Batista de Viçosa e da Igreja Batista no Asa Branca em Boa Vista-RR, pelo apoio e orações.

Ao Gustavo, que sempre esteve ao meu lado me ajudando nos momentos em que eu me sentia sozinha e com saudade da família.

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
RESUMO	2
ABSTRACT	3
CAPÍTULO 1	
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DE <i>Stryphnodendron adstringens</i> e <i>Caesalpinia ferrea</i> CONTRA AS BACTÉRIAS <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> , <i>Ralstonia solanacearum</i> e <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	
1. Introdução	4
2. Material e Métodos	5
2.1. Obtenção das Plantas	5
2.2. Procedimento de extração e fracionamento	5
2.3. Bactérias fitopatogênicas testadas.....	6
2.4. Determinação da atividade antimicrobiana.....	6
2.4.1. Ensaio de microdiluição das frações	6
2.4.2. Bioautografia das frações	7
2.5. Prospecção Fitoquímica das frações ativas.....	7
3. Resultados e Discussão	9
4. Referências Bibliográficas	14
CAPÍTULO 2	
AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS DE <i>Stryphnodendrom adstringens</i> E <i>Caesalpinia ferrea</i> CONTRA A MURCHA BACTERIANA E O CANCRO BACTERIANO DO TOMATEIRO	
RESUMO	18
ABSTRACT	19
1. Introdução	20
2. Material e Métodos	21
2.1. Fitobactérias testadas	22
2.2. Obtenção das mudas de tomateiro	22
2.3. Avaliação das frações contra a murcha bacteriana do tomateiro	22
2.4. Avaliação das frações contra o cancro bacteriano do tomateiro	23
3. Resultados e Discussão	24
4. Referências Bibliográficas	30

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS DE *stryphnodendron adstringens* E *Caesalpinia ferrea* NO CONTROLE DA PINTA BACTERIANA DO TOMATEIRO E NA ATIVIDADE DE ENZIMAS DE DEFESA

RESUMO	34
ABSTRACT	35
1. Introdução	36
2. Materiais e Métodos.....	37
2.1. Obtenção do isolado de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	37
2.2. Obtenção das mudas de tomateiro	38
2.3. Avaliação das frações contra a <i>Pst</i>	38
2.4. Determinação da atividade Enzimática.....	39
2.4.1. Peroxidases (POX) (EC 1.11.1.7) polifenoloxidasas (PFO) (EC 1.10.3.1)	39
2.4.2. β -1,3-glucanase (GLU) (EC 3.2.1.39) e fenilalanina amônia-liase (FAL) (EC 4.3.1.5) .	39
3. Resultados e Discussão	40
4. Referências Bibliográficas	49

RESUMO

CAVALCANTE, Gilcianny Pignata, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2013. **Extratos de *Stryphnodendron adstringens* e *Caesalpinia ferrea* no controle de bacterioses do tomateiro.** Orientador: José Rogério de Oliveira. Co-orientadores: João Paulo Viana Leite e Luis Cláudio Vieira da Cunha.

A atividade antimicrobiana dos extratos de cascas de *Stryphnodendron adstringens* e de frutos de *Caesalpinia ferrea* foi investigada contra as bactérias *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. As frações dos extratos em acetato de etila e n-butanol de *C. ferrea* apresentaram maior atividade contra as três bactérias estudadas. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi igual a 0,32 e 1,3 mg/mL contra a bactéria *R. solanacearum*, conferida pelas frações de *C. ferrea* em acetato de etila e n-butanol, respectivamente. Para a bactéria *P. syringae* pv. *tomato*, a CIM foi igual 0,65 mg/mL em ambas as frações, *C. ferrea* em acetato de etila e n-butanol. Já para a bactéria Gram positiva, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, a CIM foi igual a 1,3 mg/mL conferida pelas mesmas frações de *C. ferrea*. De acordo com os resultados da bioautografia, a bactéria *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* teve seu crescimento inibido pelas frações de *C. ferrea* e de *S. adstringens* em acetato de etila. Já a bactéria *R. solanacearum* foi inibida pelas frações de *C. ferrea* e *S. adstringens* em acetato de etila e pela fração de *C. ferrea* em n-butanol. A bactéria *P. syringae* pv. *tomato* foi inibida pelas frações das duas plantas em acetato de etila e n-butanol. Análises fitoquímicas das frações ativas revelaram a presença de saponinas e taninos, sendo a atividade conferida pelos taninos, evidenciada pela formação de halo de inibição em bioautografia. A ação das frações também foi investigada contra a murcha bacteriana e o cancro bacteriano do tomateiro, não ocorrendo redução na incidência da murcha bacteriana, mas ocorrendo o controle do cancro bacteriano do tomateiro. As plantas tratadas com as frações de *C. ferrea* em acetato de etila, n-butanol e aquosa apresentaram redução ou ausência dos sintomas da doença. As frações também foram avaliadas quanto a redução da severidade da pinta bacteriana do tomateiro. No primeiro experimento houve redução na severidade da doença em 96,5; 81,7 e 80,1% nos tratamentos com o acibenzolar-S-metil (ASM), fração de *S. adstringens* em acetato de etila e n-butanol, respectivamente. No segundo experimento, houve redução na severidade da doença em 71; 50,8 e 46,9% nas plantas tratadas com a fração de *S. adstringens* em acetato de etila, seguido pelo ASM e fração

de *C. ferrea* em n-butanol. A fração de *S. adstringens* em acetato de etila e o ASM foram avaliados quanto a atividade de enzimas de defesa contra a pinta bacteriana. De acordo com os resultados, em determinadas épocas de avaliação, houve o aumento na atividade das enzimas peroxidase, polifenoloxidase, β -1,3-glucanase e fenilalanina amônia-liase nas plantas tratadas com o ASM e a fração *S. adstringens* em acetato de etila, aumentando a resposta de defesa principalmente nas plantas tratadas e inoculadas com a bactéria.

ABSTRACT

CAVALCANTE, Gilcianny Pignata, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, february, 2013. ***Stryphnodendron adstringens* and *Caesalpinia ferrea* extracts on bacterial diseases of tomato control.** Adviser: José Rogério de Oliveira. Co-advisers: João Paulo Viana Leite and Luis Cláudio Vieira da Cunha.

Antimicrobial activity of extracts of *Stryphnodendron adstringens* bark and *Caesalpinia ferrea* fruits were investigated against bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. The fractions *C. ferrea* extracts in ethyl acetate and n-butanol showed greater activity against all three bacteria. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was equal to 0.32 and 1.3 mg/ml against the bacteria *R. solanacearum*, conferred by fractions of *C. ferrea* in ethyl acetate and n-butanol respectively. For the bacteria *P. syringae* pv. *tomato*, the MIC was equal to 0.65 mg/mL in both ethyl acetate and n-butanol *C. ferrea* fractions. For the Gram positive bacteria, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, the MIC was equal to 1.3 mg/mL conferred by the same *C. ferrea* fractions. According to the results of bioautography, the bacteria *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* had their growth inhibited by fractions of *C. ferrea* and *S. adstringens* in ethyl acetate. The bacteria *R. solanacearum* was inhibited by fractions of *C. ferrea* and *S. adstringens* in ethyl acetate and the *C.ferrea* fraction in n-butanol. The bacteria *P. syringae* pv. *tomato* was inhibited by the fractions of two plants in ethyl acetate and n-butanol. Phytochemical analysis of the active fractions revealed the presence of saponins and tannins, and the activity was conferred by tannins, evidenced by the inhibition zone. The fractions were also investigated against bacterial wilt and bacterial canker of tomato. There was not a reduction in the incidence of bacterial wilt, but the bacterial canker of tomato was controlled. Plants treated with *C. ferrea* fractions in ethyl acetate, n-butanol and aqueous showed reduction or absence of disease symptoms. The fractions were also evaluated for severity reduction of bacterial speck of tomato. In the first experiment there was a reduction in disease severity in 96.5, 81.7 and 80.1% on treatments with acibenzolar-S-methyl (ASM), fraction of *S. adstringens* in ethyl acetate and n-butanol, respectively. In the second experiment, there was a reduction in disease severity in 71, 50.8 and 46.9% in plants treated with the fraction of *S. adstringens* in ethyl acetate, followed by ASM and *C. ferrea* fraction in n-butanol. The fraction of *S. adstringens* in ethyl acetate and ASM were evaluated for defense enzyme activity

against bacterial speck. According to the results, at certain times of assessment, there was an increase in the activity of peroxidase, polyphenol oxidase, β -1,3-glucanase and phenylalanine ammonia lyase in plants treated with ASM and the fraction of *S. adstringens* in ethyl acetate, increasing defense response primarily on the treated and inoculated plants with bacteria.

Capítulo 1

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DE *Stryphnodendron adstringens* E *Caesalpinia ferrea* CONTRA AS BACTÉRIAS *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Ralstonia solanacearum* E *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

RESUMO

CAVALCANTE, Gilcianny Pignata, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2013. **Atividade antimicrobiana dos extratos de *Stryphnodendron adstringens* e *Caesalpinia ferrea* contra as bactérias *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.** Orientador: José Rogério de Oliveira. Co-orientadores: João Paulo Viana Leite e Luis Cláudio Vieira da Cunha.

Avaliou-se a atividade antimicrobiana das frações de *Stryphnodendron adstringens* “barbatimão” e *Caesalpinia ferrea* “júca” contra as bactérias *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. As frações em acetato de etila e n-butanol de *C. ferrea* apresentaram maior atividade contra as três bactérias estudadas. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi igual a 0,32 e 1,3 mg/mL contra a bactéria *R. solanacearum*, conferida pelas frações de *C. ferrea* em acetato de etila e n-butanol, respectivamente. Para a bactéria *P. syringae* pv. *tomato*, a CIM foi igual 0,65 mg/mL em ambas as frações, *C. ferrea* em acetato de etila e n-butanol. Já para a bactéria Gram positiva, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, a CIM foi igual a 1,3 mg/mL conferida pelas mesmas frações de *C. ferrea*. De acordo com os resultados da bioautografia a bactéria *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* teve seu crescimento inibido pelas frações de *C. ferrea* e de *S. adstringens* em acetato de etila. Já a bactéria *R. solanacearum* foi inibida pelas frações de *C. ferrea* e *S. adstringens* em acetato de etila e pela fração de *C. ferrea* em n-butanol e a bactéria *P. syringae* pv. *tomato* foi inibida pelas frações das duas plantas em acetato de etila e n-butanol. Análises fitoquímicas das frações ativas revelaram a presença de saponinas e taninos, sendo a atividade provavelmente conferida pelos taninos, evidenciada pela formação de halo de inibição no bioautograma. Portanto, as frações obtidas a partir das duas plantas apresentam potencial para uso no controle de bacterioses de plantas, sendo uma alternativa de baixo impacto ambiental.

Palavras-chave: taninos, saponinas, *Solanum lycopersicum*, extratos de plantas.

ABSTRACT

CAVALCANTE, Gilcianny Pignata, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, february, 2013. ***Stryphnodendron adstringens* and *Caesalpinia ferrea* antimicrobial extracts activity against bacterias *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis***. Adviser: José Rogério de Oliveira. Co-advisers: João Paulo Viana Leite and Luis Cláudio Vieira da Cunha.

The antimicrobial fractions activity of *Stryphnodendron adstringens* “barbatimão” and *Caesalpinia ferrea* “jucá” were evaluated against bacterias *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. The ethyl acetate and n-butanol fractions showed greater antimicrobial activity, and *C. ferrea* fractions were more effective against all three bacterias. The minimum inhibitory concentration (MIC) against *R. solanacearum* was equal to 0.32 and 1.3 mg/mL for *C. ferrea* fractions in ethyl acetate and n-butanol, respectively. For *P. syringae* pv. *tomato* the MIC was equal to 0.65 mg/mL for both fractions, *C. ferrea* fractions in ethyl acetate and n-butanol. For *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* the MIC was equal to 1.3 mg/mL for both fractions. According to the bioautography results, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* bacteria had their growth inhibited by *C. ferrea* and *S. adstringens* fractions in ethyl acetate. The bacteria *R. solanacearum* was inhibited by fractions of *C. ferrea* and *S. adstringens* in ethyl acetate and the fraction *C. ferrea* in n-butanol. The bacteria *P. syringae* pv. *tomato* was inhibited by the fractions of the two plants in ethyl acetate and n-butanol. Phytochemical analysis of the active fractions revealed the presence of saponins and tannins, with activity most likely conferred by tannins, evidenced by the inhibition zone in bioautograma. Therefore, fractions obtained from the two plants have potential for use in the control of bacterial diseases of plants, and an alternative low environmental impact.

Key words: tannins, saponins, *Solanum lycopersicum*, plant extracts.

1. Introdução

Doenças causadas por bactérias fitopatogênicas são responsáveis por grandes perdas na agricultura, pois o controle é extremamente difícil, principalmente pela falta de produtos registrados. O tomate (*Solanum lycopersicum* L.), por ser uma hortaliça cosmopolita, tornou-se uma das mais populares em todo o mundo sendo, a segunda em importância econômica. A cultura está sujeita a várias doenças que podem limitar a sua produção e dentre elas estão a murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Yabuuchi et al. 1996, o cancro bacteriano, causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith, 1910) Davis et al. 1984, e a pinta bacteriana, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe, 1933) Young et al. 1978.

O Brasil tem a maior biodiversidade genética vegetal do mundo com mais de 55.000 espécies de plantas catalogadas (Simões et al., 2003). Muitas dessas espécies têm sido investigadas com relação aos seus compostos antimicrobianos, sintetizados pelo metabolismo secundário da planta. Esses compostos, apesar de não possuírem função direta no crescimento e no desenvolvimento das plantas, conferem atividade de fitoproteção, atração de polinizadores e adaptação ambiental. Dentre estes metabólitos secundários alguns se destacam por apresentarem atividade antimicrobiana, como os óleos essenciais, saponinas, flavonoides, cumarinas, fitoalexinas, taninos e alcaloides (Taiz & Zeigler, 2004). A maioria desses compostos já explorados na medicina popular é fruto do conhecimento tradicional, que é de grande interesse à ciência e essencial na descoberta de compostos e moléculas ativas, capazes de exercer alguma ação no combate de doenças. Alguns estudos destacam o potencial de extratos vegetais no controle de doenças causadas por bactérias fitopatogênicas (Kagale et al., 2004; Satya et al., 2006; Balestra et al., 2009; Vadlapudi & Kaladhar, 2012).

Plantas das espécies *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) (Mart.) Coville e *Caesalpinia ferrea* (júca) (Mart.) Tusslane, ambas da família Fabaceae, tem sido utilizadas na medicina popular e investigadas quanto as suas propriedades antimicrobianas. *S. adstringens* é uma espécie arbórea encontrada no cerrado, sua casca tem propriedades anti-inflamatória e cicatrizante contendo, pelo menos, 8% de taninos totais em sua composição (Lima et al., 1998; Hernandez et al., 2010; Farmacopeia Brasileira, 2010). As cascas e folhas de *C. ferrea* apresentam propriedades anti-inflamatórias e analgésicas e investigações fitoquímicas revelam a presença de

flavonoides, saponinas, taninos, cumarinas, esteroides e outros compostos fenólicos (Carvalho et al., 1996; Gonzalez et al., 2004; Vasconcelos et al., 2011; Lima et al., 2012). Os taninos são polifenóis de origem vegetal, conhecidos pela sua adstringência e encontrados em quase todas as partes das plantas como casca, madeira, folha, frutos e raízes (Scalbert, 1991; Haslam, 1996).

O objetivo deste trabalho foi investigar a atividade antimicrobiana de frações obtidas a partir dos extratos dos frutos de *Caesalpinia ferrea* e das cascas de *Stryphnodendron adstringens*, contra três bactérias fitopatogênicas ao tomateiro, *P. syringae* pv. *tomato*, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* e *R. solanacearum*.

2. Material e Métodos

2.1. Obtenção das Plantas

Os materiais vegetais das cascas de *S. adstringens* e frutos de *C. ferrea* foram coletados em dezembro de 2009 no município de Boa Vista, estado de Roraima, Brasil. As plantas tiveram suas excisas depositadas no herbário na Universidade Federal de Roraima em janeiro de 2013, sob os códigos 3445 (*C. ferrea*) e 3446 (*S. adstringens*). Após a coleta, os materiais vegetais foram secos à temperatura ambiente (25°C), em sala ventilada, por uma semana, e estabilizados em estufa de ar circulante a 40°C durante 5 dias, sendo, em seguida pulverizados em moinho de facas e armazenados em frascos protegidos de umidade e luminosidade.

2.2. Procedimento de extração e fracionamento

Os extratos aquosos dos materiais vegetais foram preparados pelo método de infusão, na proporção de 1:20 p/v (droga vegetal: água destilada), mantendo-se as mesmas em contato com a água fervente durante 30 minutos, sob constante agitação, seguido de filtração em algodão. Os extratos aquosos assim obtidos foram congelados a -80°C, liofilizados e armazenados em local seco e sem luminosidade. Sendo obtidos ao final os extratos aquosos liofilizados de cascas de *S. adstringens* (25,03 g) e dos frutos de *C. ferrea* (80,71 g). Posteriormente, parte dos liofilizados (10 g) foram ressuspensos em água (200 mL) e submetidos a uma partição líquido-líquido seriada, e exaustiva em funil de separação com solventes de polaridade crescente (Figura 1), resultando nas frações em acetato de etila de *S. adstringens* (SAFA), fração em acetato de etila de *C. ferrea* (CFFA), fração em n-butanol de *S. adstringens* (SAFB), fração em n-butanol de *C. ferrea* (CFFB) e fração aquosa de *S. adstringens* (SAFW) e fração

aquosa de *C. ferrea* (CFFW). As frações em acetato de etila e em n-butanol foram concentradas em evaporador rotatório, a 50°C e 85°C, respectivamente, e colocadas em frascos em dessecador até a completa evaporação do solvente. Já as frações aquosas foram liofilizadas para a remoção do solvente.

2.3. Bactérias fitopatogênicas testadas

Os isolados de *P. syringae* pv. *tomato* e *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* foram obtidos a partir de plantas sintomáticas nos municípios de Coimbra e Viçosa, Minas Gerais, Brasil, respectivamente. Os isolados foram devidamente identificados e mantidos na coleção do Laboratório de Bacteriologia de Plantas da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. O isolado de *R. solanacearum* (código 381-Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil) foi cedido pelo pesquisador Dr. Carlos Alberto Lopes da Embrapa Hortaliças. Todos os isolados foram preservados em glicerina 30% e armazenados a -80°C. Para a utilização nos ensaios, os isolados foram cultivados em meio 523 de Kado & Heskett (1970) por 48 horas a temperatura de 28°C. A concentração da suspensão foi ajustada em espectrofotômetro a 600 nm de absorvância para OD = 0,1, o que corresponde aproximadamente a $1,0 \times 10^8$ UFC mL⁻¹.

2.4. Determinação da atividade antimicrobiana

2.4.1. Ensaio de microdiluição das frações

Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), as frações obtidas foram solubilizadas em dimetilsulfóxido 10% (DMSO) na concentração de 50mg/mL, sendo uma alíquota de 100µL de cada fração retirada para a diluição 50% com água destilada esterilizada, nos poços das microplacas (Eloff, 1998; Mahlo et al., 2010). Posteriormente, a suspensão bacteriana (100µL) cultivada em meio líquido 523 foi adicionada aos poços da microplaca. O antibiótico Neomicina (100µL) foi utilizado na concentração de 50mg/mL como controle positivo e o solvente DMSO (100µL) a 10% foi utilizado como controle negativo. Como indicador de crescimento, adicionou-se o violeta p-iodonitrotetrazólio (Sigma®) (INT), 40µl a 0.2 mg/mL, dissolvido em água, em cada poço da microplaca. O INT atua como um aceptor de elétrons e é reduzido a um produto de cor vermelha chamado formazan por organismos biologicamente ativos (Eloff, 1998). Onde o crescimento bacteriano é inibido, o meio permanece incolor ou com uma redução na intensidade da cor após a incubação. Portanto, o volume final contido nos poços das microplacas foi de 240µL, sendo a

maior concentração das frações testadas igual a 20,83 mg/mL e a menor igual a 0,16 mg/mL. As placas foram cobertas com papel filme para minimizar a contaminação e incubadas a 28°C durante 48hs. Foi determinada a CIM, que é a concentração mais baixa que inibe o crescimento bacteriano e é inversamente proporcional à quantidade de compostos antimicrobianos presentes e a atividade total que indica o quanto o extrato a partir de 1g da planta pode ser diluído e ainda assim inibir o organismo teste (Eloff, 1999).

2.4.2. Bioautografia das frações

A bioautografia foi realizada por meio da Cromatografia em Camada Delgada (CCD) empregando-se cromatoplasmas de alumínio (ALIGRAM®SIL g/UV 254, Merck) de acordo com Wagner & Bladt, 1996. Às cromatofolhas de CCD foram pipetados 10µL de cada fração, ressuspendidas em metanol (5mg/100µL) e em seguida eluídas com a fase móvel n-butanol/ácido acético glacial/água (45:10:35), em cuba de vidro. Após a eluição, as placas cromatográficas foram secas a temperatura ambiente em câmara de fluxo laminar durante 5 dias para a completa remoção do solvente. Foram realizados diferentes cromatogramas eluídos com a mesma fase móvel, sendo estes posteriormente, borrifados com as suspensões bacterianas de *R. solanacearum*, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* e *P. syringae* pv. *tomato*. As bactérias foram cultivadas em meio 523 líquido por 48 h e posteriormente, foram transferidos 100 µL da suspensão bacteriana para 20 mL de meio 523 semi-sólido a 50°C, o qual foi borrifado até cobrir totalmente a placa. As placas recobertas por camada de suspensão bacteriana foram mantidas a 28°C durante 48 hs e reveladas com Cloreto de Trifenil Tetrazólio (CTT) na concentração 20 mg/mL, o CTT atua da mesma forma que o INT. O ensaio foi realizado em triplicata, e os halos observados nos bioautogramas foram mensurados. O teste de Tukey a 5% de significância foi utilizado para a avaliação dos dados. As análises foram realizadas utilizando-se o software SAS (SAS Institute, Inc., 1989, Cary, NC, EUA) versão 9.1.

2.5. Prospecção Fitoquímica das frações ativas

A análise dos constituintes químicos das frações ativas foi realizada por meio da CCD de acordo com Wagner & Bladt, 1996. O eluente utilizado para a separação dos compostos foi o mesmo utilizado na bioautografia (item 2.4.2). As frações foram solubilizadas em metanol (5mg/100µL) e depositadas sobre as placas, com auxílio de capilar de vidro. Para a caracterização dos cromatogramas foram utilizados reveladores

específicos para cada grupo de metabólito secundário (Tabela 1), sendo, em alguns casos, observados sob fluorescência em câmara escura na região de luz ultravioleta a 254 nm e/ou a 365 nm.

Tabela 1. Reveladores e padrões de referência utilizados para a prospecção fitoquímica das frações de *Stryphnodendron adstringens* e *Caesalpinia ferrea*.

Metabólito secundário	Padrão de referência	Revelador
Antraquinonas	1,8 diidroxiantraquinona	KOH 5% em etanol
Cumarinas	Venalot®	KOH 5% em etanol
Flavonoides	Quercetina	AlCl ₃ 5% em etanol
Cardiotônicos	Digitoxina	Reagente Kedde
Saponinas	18-β-Glicirretínico	Anisaldeído sulfúrico
Alcaloides	Quinina	Reagente de Drangendorff
Taninos	Ácido pirogálico	Reagente de Barton

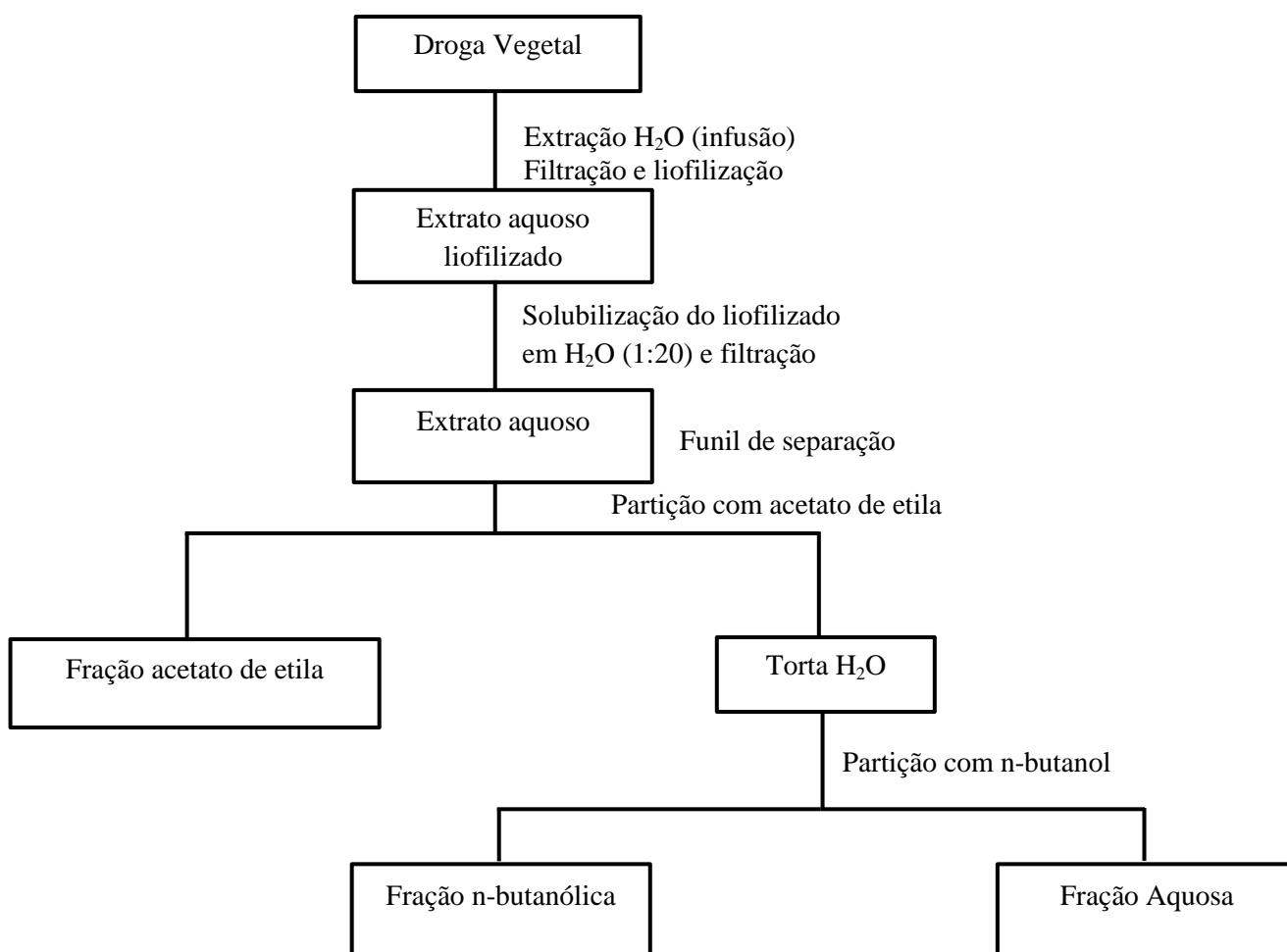


Figura 1. Procedimento geral para o isolamento dos compostos ativos em bioensaios.

3. Resultados e Discussão

Experimentos realizados anteriormente com os extratos aquosos dos frutos de *C. ferrea* e das cascas de *S. adstringens* demonstraram o potencial antimicrobiano dos mesmos contra as bactérias *P. syringae* pv. *tomato*, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* e *R. solanacearum* (Cavalcante, 2009). Portanto, para descobrir qual composto presente nestes extratos era responsável pela atividade, foi realizado o fracionamento dos mesmos, permitindo a separação de compostos com diferentes polaridades. A partir das frações obtidas foi realizado o ensaio de microdiluição onde foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM). O rendimento das frações variou de acordo com o solvente utilizado e o extrato de cada planta, sendo que as frações aquosas tiveram um maior rendimento (Tabela 2). As frações obtidas a partir dos frutos de *C. ferrea* apresentaram os menores valores de CIM quando comparadas com as frações de *S. adstringens* que precisaram de uma concentração maior para inibição do crescimento bacteriano. A inibição foi evidenciada pela coloração observada nos poços das microplacas, utilizando-se o corante violeta p-iodonitrotetrazólio (INT). As bactérias Gram negativas, *R. solanacearum* e *P. syringae* pv. *tomato* tiveram seu crescimento inibido por um número maior de frações quando comparadas a bactéria Gram positiva *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Tabela 2. Rendimento das frações (g) obtidas a partir de 10g de cada extrato aquoso liofilizado.

Extratos	Acetato de etila	n-butanol	Aquoso
<i>Stryphnodendron</i>	0,516	2,522	4,568
<i>adstringens</i>			
<i>Caesalpinia ferrea</i>	1,455	1,993	3,694

As frações em acetato de etila e n-butanol de *C. ferrea* apresentaram uma elevada atividade antimicrobiana contra a bactéria *R. solanacearum*, sendo os valores da CIM de 0,32 e 1,30 mg/mL, respectivamente. A fração aquosa de *C. ferrea* também apresentou um bom resultado, sendo a CIM igual a 2,60 mg/mL, quando comparada às frações de *S. adstringens* onde a CIM em todas as frações foi 10,41 mg/mL (Tabela 3). Já contra a bactéria Gram positiva, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, o menor valor de CIM foi conferido pelas frações de *C. ferrea*, onde a CIM foi igual a 1,30 mg/mL nas frações de *C. ferrea* em acetato de etila e n-butanol. Já a fração aquosa de *C. ferrea* teve a CIM igual a 10,41 mg/mL, o mesmo da fração de *S. adstringens* em

acetato de etila, sendo que a fração *S. adstringens* em n-butanol teve o menor valor de CIM igual a 5,20 mg/mL e o maior valor de CIM de 20,83 mg/mL conferido pela fração aquosa de *S. adstringens* (Tabela 3). O menor valor de CIM registrado contra a bactéria *P. syringae* pv. *tomato* foi igual a 0,65 mg/mL, conferido pelas frações de *C. ferrea* em acetato de etila e n-butanol, seguido pelas frações aquosa e em n-butanol de *C. ferrea* com os valores de CIM iguais a 5,20 mg/mL e 2,60 mg/mL, respectivamente. A fração aquosa de *S. adstringens* apresentou o maior valor de CIM igual a 20,83 mg/mL para as bactérias *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* e *P. syringae* pv. *tomato* (Tabela 3).

Tabela 3. Concentração inibitória mínima (mg/mL) das seis frações obtidas a partir de extratos de *Stryphnodendron adstringens* e *Caesalpinia ferrea* contra três bactérias fitopatogênicas, *Ralstonia solanacearum* (*Rs*), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*).

Bactéria	CFFA	CFFB	CFFW	SAFA	SAFB	SAFW
<i>Rs</i>	0,32	1,30	2,60	10,41	10,41	10,41
<i>Cmm</i>	1,30	1,30	10,41	10,41	5,20	20,83
<i>Pst</i>	0,65	0,65	5,20	10,41	2,60	20,83

CF- *C. ferrea* e SA- *S. adstringens* (FA- fração acetato de etila; FB- fração n-butanol e FW- fração aquosa)

Para determinar quais plantas possuem o maior potencial, é importante saber, além do valor de CIM, o teor extratável de cada fração. Por isso, a quantidade de compostos antimicrobianos presentes (atividade total) foi calculada dividindo a quantidade em mg extraída a partir de 1 g da droga vegetal pelo CIM em mg/mL. A maior atividade total foi de 180,68 mL/g, conferida pela fração de *C. ferrea* em acetato de etila contra a bactéria *R. solanacearum*, seguida de 61,87 e 57,24 mL/g conferida pelas frações de *C. ferrea* em n-butanol e aquosa, respectivamente (Tabela 4). Para a bactéria Gram positiva, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, os melhores resultados foram de 61,87; 45,17 e 14,31 mL/g conferidos pelas frações de *C. ferrea* em n-butanol, acetato de etila e aquosa, respectivamente (Tabela 4). Já para a bactéria *P. syringae* pv. *tomato* a atividade total maior foi de 123,74; 90,34 e 28,62 mL/g nas frações *C. ferrea* em n-butanol, acetato de etila e aquosa, respectivamente. O maior valor conferido por uma fração de *S. adstringens* contra essa bactéria foi 12,12 mL/g, da fração de *S. adstringens* em n-butanol (Tabela 4). O menor valor de atividade total foi conferido pela fração *S. adstringens* em acetato de etila, 0,62 mL/g, para as três bactérias fitopatogênicas testadas. Esses resultados mostram quais frações apresentam maior

potencial contra cada bactéria testada e o quanto da droga vegetal das mesmas pode ser diluída e ainda assim continuar apresentando atividade. Por exemplo, a fração de *C. ferrea* em acetato de etila que apresentou atividade total de 180,68 mL/g contra a bactéria *R. solanacearum* pode ter seu extrato, preparado a partir da droga vegetal, diluído em 180,68 mL e ainda assim continuar inibindo o crescimento deste patógeno. Conclui-se assim, que a atividade total das frações para as bactérias Gram positivas foi diferente das Gram negativas, ou seja, para a inibição do crescimento das Gram positivas é necessário uma maior quantidade de compostos ativos do que para as Gram negativas. Outro fato interessante é que mesmo que o valor da CIM seja igual para duas frações, a atividade total pode diferir. Como por exemplo, nas frações *C. ferrea* em acetato de etila e n-butanol contra a bactéria *P. syringae* pv. *tomato*, onde o valor da CIM é igual, porém a atividade total é diferente.

Tabela 4. Atividade total (mL/g) das seis frações obtidas a partir dos extratos de *Stryphnodendron adstringens* e *Caesalpinia ferrea* contra três bactérias fitopatogênicas, *Ralstonia solanacearum* (*Rs*), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*).

Bactéria	CFFA	CFFB	CFFW	SAFA	SAFB	SAFW
<i>Rs</i>	180,68	61,87	57,24	0,62	3,03	5,48
<i>Cmm</i>	45,17	61,87	14,31	0,62	6,06	2,74
<i>Pst</i>	90,34	123,74	28,62	0,62	12,12	2,74

CF- *C. ferrea* e SA- *S. adstringens* (FA- fração acetato de etila; FB- fração n-butanol e FW- fração aquosa)

A bioautografia foi realizada com o intuito de descobrir quais são os compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana nas frações obtidas. O cloreto de trifênil tetrazólio foi utilizado para a visualização dos locais onde ocorreu o crescimento bacteriano permitindo a visualização dos halos de inibição, atuando da mesma forma que o violeta p-iodonitrotetrazólio. De acordo com os resultados, a bactéria Gram positiva *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* teve seu crescimento inibido pelas frações de *C. ferrea* e *S. adstringens* em acetato de etila (Tabela 5). A bactéria *R. solanacearum* foi inibida pelas frações *C. ferrea* e *S. adstringens* em acetato de etila e pela fração *C. ferrea* em n-butanol, ocorrendo a formação do halo de inibição (Tabela 5). Já a bactéria *P. syringae* pv. *tomato* foi inibida pelas frações de *C. ferrea* em acetato de etila e n-butanol e *S. adstringens* em acetato de etila e n-butanol (Tabela 5). Os halos de inibição formados foram mensurados e comparados nas diferentes bactérias estudadas, não apresentando diferença estatística entre si. A fração *S. adstringens* em n-

butanol mostrou atividade somente contra a bactéria *P. syringae* pv. *tomato* e as frações aquosas não apresentaram atividade contra as bactérias testadas. As frações em acetato de etila e n-butanol proporcionaram uma melhor extração dos compostos ativos, conferindo uma maior atividade antimicrobiana contra as três bactérias estudadas. Por esse motivo, foi realizada a prospecção fitoquímica das frações ativas, *C. ferrea* em acetato de etila e n-butanol e *S. adstringens* em acetato de etila e n-butanol, revelando a presença de taninos e saponinas. Entretanto, a atividade antimicrobiana foi conferida pelos taninos, sendo evidenciada pela formação do halo de inibição no bioautograma. Dessa forma, o fracionamento dos extratos liofilizados permitiu a separação dos compostos e a obtenção de frações enriquecidas com taninos. Estudos realizados com *C. ferrea* mostram que os taninos são o componente principal dos extratos obtidos dessa espécie, como o ácido gálico e metil galato (Gonzalez et al., 2004; Nakamura et al., 2002). *S. adstringens*, também possui um alto conteúdo de taninos em sua casca. Pesquisas realizadas com a fração solúvel em acetona de *S. adstringens* revelaram a presença de taninos condensados em sua composição (Mello et al., 1999). Outros estudos realizados com a casca de *S. adstringens* relataram a presença de flavan-3-ols, prodelfinidinas e prorobinetidina. Foram também isoladas e elucidadas as estruturas do tanino hidrolisável ácido gálico e dos taninos condensados galocatequina, epigallocatequina, dentre outros (Lima et al., 1998; Mello et al., 1996 a,b).

Tabela 5. Média dos halos de inibição (cm) formados na bioautografia pelas frações nas três bactérias testadas, *Ralstonia solanacearum* (*Rs*), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*).

Bactéria	CFFA	SAFA	CFFB	SAFB	CFFW	SAFW
<i>Rs</i>	1,4a	1,1a	1,35a	-	-	-
<i>Cmm</i>	1,15a	1,0a	-	-	-	-
<i>Pst</i>	1,22a	1,2a	0,9a	0,85	-	-

CF- *C. ferrea* e SA- *S. adstringens* (FA- fração acetato de etila; FB- fração n-butanol e FW- fração aquosa). As médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$). O sinal (-) mostra onde não ocorreu a formação do halo de inibição.

Na literatura existem relatos da relação entre o teor de taninos e a atividade contra bactérias Gram positivas, que tem a estrutura celular mais rígida, parede celular quimicamente menos complexa e menor teor lipídico do que as Gram negativas. (Khan et al., 2001; Cimanga et al., 2002). Em geral, as bactérias Gram positivas são mais sensíveis que as Gram negativas, mas nesse caso os resultados mostraram o contrário,

sendo as bactérias Gram negativas mais sensíveis aos taninos presentes no extrato. Algumas hipóteses sugerem o mecanismo de ação antimicrobiana de taninos. O primeiro seria que os taninos inibem enzimas bacterianas e fúngicas e/ou se complexam com os substratos dessas enzimas; o segundo propõe a ação dos taninos sobre as membranas celulares dos microorganismos, modificando seu metabolismo através da inibição da fosforilação oxidativa; a terceira está relacionada a complexação de íons metálicos por taninos, diminuindo a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo microbiano. Os taninos também podem inativar as adesinas microbianas, células envolvidas no transporte de proteínas e complexar com polissacarídeos (Scalbert, 1991; Cowan, 1999). Portanto, podemos concluir que as frações obtidas a partir das plantas estudadas apresentam grande potencial para uso no tratamento de doenças causadas por bactérias fitopatogênicas. Levando em consideração os problemas que os produtos químicos vêm causando ao homem e ao ambiente, bem como a inexistência de produtos eficientes para o controle de fitobacterioses, a busca por medidas alternativas de controle é importante, principalmente de baixo impacto ambiental e que sejam eficientes para o objetivo estabelecido

4. Referências Bibliográficas

Balestra GM, Heydari A, Ceccarelli D, Ovidi E, Quattrucci A (2009) Antibacterial effect of *Allium sativum* and *Ficus carica* extracts on tomato bacterial pathogens. *Crop Protection* 28:807-811.

Carvalho JCT, Teixeira JRM, Souza PJC, Bastos JK, Filho DS, Sarti SJ (1996) Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. *Journal of Ethnopharmacology* 53:175-178.

Cavalcante, GP (2009) Atividade de extratos de plantas medicinais da Amazônia sobre três patógenos bacterianos do tomateiro. Tese de doutorado, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa MG, Brasil.

Cimanga K, Kambu K, Tona L, Apers S, De Bruyne T, Hermans N, Totté J, Pieters L, Vlietinck AJ (2002) Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology* 79:213-220.

Cowan MM (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12:564-582.

Eloff JN (1998) A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plants extracts for bacteria. *Planta Medica* 64:711-713.

Eloff JN (1999) The antibacterial activity of 27 southern African members of the Combretaceae. *South African Journal of Science* 95:148-152.

Farmacopeia Brasileira (2010) Substâncias farmacêuticas químicas, vegetais e biológicas. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, Brasil: Anvisa. vol.2-5 ed. pp 669-670.

Gonzalez FG, Barros SBM, Bachi EM (2004) Atividade antioxidante e perfil fitoquímico de *Caesalpinia ferrea* Mart. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 40:79.

Haslam E (1996) Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. *Journal of Natural Products* 59:205-215.

- Hernandes L, Pereira LMS, Palazzo F, Mello JCP (2010) Wound-healing evaluation of ointment from *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) in rat skin. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 46:431-436.
- Kado CI, Heskett MG (1970) Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60:969-976.
- Kagale S, Marimuthu T, Thayumanavan B, Nandakumar R, Samiyappan R (2004) Antimicrobial activity and induction of systemic resistance in rice by leaf extract of *Datura metel* against *Rhizoctonia solani* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 65: 91-100.
- Khan MR, Kihara M, Omoloso AD (2001) Antimicrobial activity of *Symplocos cochinchinensis*. *Fitoterapia* 72: 825-828.
- Lima JCS, Martins DTO, De Souza PT (1998) Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for antiinflammatory activity. *Phytotherapy Research* 12: 218-220.
- Lima SMA, Araújo LCC, Sitônio MM, Freitas ACC, Moura SL, Correia MTS, Malta DJN, Gonçalves-Silva T (2012) Anti-inflammatory and analgesic potencial of *Caesalpinia ferrea*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 22:169-175.
- Mahlo SM, Mcgaw JN, Eloff JN (2010) Antifungal activity of leaf extracts from African trees against plant pathogens. *Crop Protection* 29:1529-1533.
- Mello JCP, De Petereit F, Nahrstedt A (1996a) Flavan-3-ols and prodelfphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry* 41: 807-813.
- Mello JCP, De Petereit F, Nahrstedt A (1996b) Prorobinetinidins from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry* 42: 857-862.
- Mello JCP, Petereit F, Nahrstedt AA (1999) dimeric proanthocyanidin from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry* 51:1105-1107.
- Monteiro JM, Albuquerque US, Araújo EL (2005) Taninos: Uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova* 28:892-896.

Nakamura ES, Kurosaki F, Arisawa M, Mukainaka T, Okuda M, Tokuda H, Nishino H, Pastore F (2002) Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. *Cancer Letters* 117: 119-124.

Satya VK, Gayathiri S, Bhaskaran R, Paranidharan V, Velazhahan R (2006) Induction of systemic resistance to bacterial blight caused by *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* in cotton by leaf extract from a medicinal plant Zimmu (*Allium sativum* L. *Allium cepa* L.). *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 39:1-14.

Scalbert A (1991) Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30:3875-3883.

Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G (2003) *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*. Editora UFRGS. 5 ed. pp. 1102.

Taiz I, Zeiger E (2004) Metabólitos secundários e defesa vegetal. In: Taiz I, Zeiger E (Eds.) Santarém, et al., (Tradutores). *Fisiologia vegetal*. Porto Alegre-RS, Editora Artimed. pp. 309-332.

Vadlapudi V, Kaladhar DSVGK (2012) Antimicrobial study of plant extracts of *Datura metel* L. against some important disease causing pathogens. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 2:94-97.

Vasconcelos CFB, Maranhão HML, Batista TM, Carneiro EM, Ferreira F, Costa J, Soares LAL, Sá MDC, Souza TP, Wanderley AG (2011) Hypoglycaemic activity and molecular mechanisms of *Caesalpinia ferrea* Martius bark extract on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology* 137:1533-1541.

Wagner H, Bladt S (1996) *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. 2th Ed. Berlin. Springer Verlag. 384p.

Capítulo 2

AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS DE *Stryphnodendrom adstringens* E *Caesalpinia ferrea* CONTRA A MURCHA BACTERIANA E O CANCRO BACTERIANO DO TOMATEIRO

RESUMO

CAVALCANTE, Gilcianny Pignata, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2013. **Avaliação dos extratos de *Stryphnodendrom adstringens* e *Caesalpinia ferrea* contra a murcha bacteriana e o cancro bacteriano do tomateiro.** Orientador: José Rogério de Oliveira. Co-orientadores: João Paulo Viana Leite e Luis Cláudio Vieira da Cunha.

O efeito dos extratos das cascas de *Stryphnodendron adstringens* “barbatimão”, dos frutos de *Caesalpinia ferrea* “jucá”, e o indutor de resistência acibenzolar-S-metil (ASM) foram avaliados contra a murcha bacteriana e o cancro bacteriano do tomateiro. Nas plantas tratadas com as frações dos extratos e o ASM não houve redução na incidência da murcha bacteriana. Sendo, que nos dois experimentos realizados, todas as plantas morreram entre 5 e 6 dias após a inoculação. Contra o cancro bacteriano do tomateiro, as frações de *C. ferrea* mostraram-se mais promissoras para o controle da doença, sendo que as plantas tratadas com as frações de *C. ferrea* em n-butanol e aquosa não expressaram nenhum dos três tipos de sintomas da doença, apresentando o individual disease rating scores (IDRS) e o percentual máximo de doença (PMD) igual a 0. Nas plantas tratadas com o ASM e com a fração aquosa de *S. adstringens* não houve controle da doença e todas as plantas morreram, sendo o IDRS = 5,0 e PMD = 42,59 e 40,37, respectivamente. As frações de *S. adstringens* e de *C. ferrea* em acetato de etila apresentaram o PMD = 8,89 e 6,29, respectivamente, ou seja, essas frações retardaram o progresso da doença ao longo do tempo. No segundo experimento, as plantas tratadas com as frações de *C. ferrea* em acetato de etila, n-butanol e aquosa não apresentaram os sintomas da doença, sendo o IDRS = 0 e o PMD = 0. Entretanto, os tratamentos ASM e ADE apresentaram o IDRS = 5 e o PMD = 57,41 e 42,58, respectivamente.

Palavras-chave: *Solanum lycopersicum*, *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, acibenzolar-S-metil, extratos de plantas.

ABSTRACT

CAVALCANTE, Gilcianny Pignata, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, february, 2013. ***Stryphnodendron adstringens* and *Caesalpinia ferrea* extracts evaluation against bacterial wilt and bacterial canker of tomato.** Adviser: José Rogério de Oliveira. Co-advisers: João Paulo Viana Leite and Luis Cláudio Vieira da Cunha.

The effect of *Stryphnodendron adstringens* “barbatimão” bark extracts, *Caesalpinia ferrea* “jucá” fruits and the resistance inductor acibenzolar-S-methyl (ASM) were evaluated against bacterial wilt and bacterial canker of tomato. Plants treated with the extracts fractions and ASM showed no reduction in the incidence of bacterial wilt. All plants died between 5 and 6 days after inoculation in two experiments realized. *C. ferrea* fractions were more promising for disease control against bacterial canker of tomato. Plants treated with fractions of *C. ferrea* in n-butanol and aqueous did not express any of the three disease symptoms, presenting the individual disease rating scores (IDRS) and maximum percentage of disease (PMD) equal to 0. Plants treated with ASM and aqueous fraction of *S. adstringens* had no disease control and all plants died, the IDRS = 5.0 and PMD = 42.59 and 40.37, respectively. The fractions of *S. adstringens* and *C. ferrea* in ethyl acetate showed the PMD = 8.89 and 6.29, respectively, i.e. these fractions retarded the progress of the disease over time. In the second experiment, the plants treated with the fractions of *C. ferrea* in ethyl acetate, n-butanol and aqueous showed no symptoms of the disease, with IDRS = 0 and PMD = 0. However, treatments with ASM and ADE had IDRS = 5 and the PMD = 57.41 and 42.58, respectively.

Key words: *Solanum lycopersicum*, *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, acibenzolar-S-methyl, plant extracts.

1. Introdução

O tomate, (*Solanum lycopersicum* L.), é uma das olerícolas mais importantes em todo o mundo, o qual pode ser consumido tanto “in natura” como industrializado. Por ser uma hortaliça cultivada em todas as regiões do Brasil, tornou-se uma das mais populares e é atualmente a segunda cultura em importância econômica, sendo superada apenas pela da batata. A cultura está sujeita a vários problemas que podem limitar a sua produção, destacando-se as cerca de duzentas doenças e distúrbios fisiológicos que já foram relatados em todo mundo, sendo as bacterioses de plantas responsáveis por grandes perdas na produção de olerícolas, tanto durante o cultivo como em pós-colheita (Lopes & Ávila, 2005).

Dentre as doenças que ocorrem no tomateiro está a murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896) Yabuuchi et al. 1996, que ocorre principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Temperaturas elevadas e alta umidade do solo são as condições determinantes para que ocorram epidemias desta doença. Seu controle é muito complexo devido à alta capacidade de sobrevivência da bactéria no solo e nenhuma medida individual é suficiente, fazendo-se necessário o uso medidas integradas de controle, como práticas culturais, rotação de culturas e cultivares resistentes, as quais podem prover um controle limitado da doença (Ji et al., 2003).

O cancro-bacteriano, causado pela bactéria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith, 1910) Davis et al. 1984, é uma doença muito frequente em tomateiro estaqueado, cuja condução requer manejo intensivo das plantas devido às operações de desbrota e amarração. Sua ocorrência depende muito de fatores climáticos e da sanidade das sementes utilizadas no plantio. A temperatura ideal para o desenvolvimento da doença é entre 18 a 25°C e alta umidade relativa do ar, condições que ocorrem principalmente nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. O controle pode ser feito por meio do uso de sementes livres da bactéria e da esterilização do substrato para produção de mudas. A utilização de cobre e antibióticos registrados, pode se dar na sementeira ou na lavoura (Lopes & Ávila, 2005).

Devido aos problemas fitossanitários, o tomateiro é alvo de constantes aplicações de produtos químicos que resultam no aumento dos custos de produção, além de contribuir para a seleção de organismos-alvo resistentes e serem tóxicos ao homem e ao ambiente (Mariconi, 1981). Se para as doenças fúngicas existe um grande arsenal de produtos químicos utilizados para o controle, para as bactérias, os poucos existentes são

de eficácia incerta, diante deste quadro, torna-se necessária a busca de soluções para evitar ou minimizar os danos causados pelas mesmas. Além disso, as bactérias apresentam alta taxa de multiplicação, principalmente em olerícolas que são irrigadas frequentemente e normalmente contêm alto teor de água em seus tecidos.

Apesar da grande extensão de florestas e da diversidade de espécies encontradas no Brasil, poucos estudos têm sido realizados com o controle alternativo de bacterioses de plantas, sendo que muitas destas espécies apresentam atividade biológica, podendo ter potencial benéfico ou maléfico sobre vários organismos (Almeida, 1993). Essas substâncias naturais muitas vezes são de fácil obtenção, baixo custo, podendo se tornar uma alternativa para o controle de doenças de plantas, pois são de fácil degradação, e de pouca ou nenhuma fitotoxicidade (Bettioli & Morandi, 2009).

As plantas das espécies *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) (Mart.) Coville e *Caesalpinia ferrea* (jucá) (Mart.) Tusslane, ambas da família Fabaceae, são utilizadas na medicina popular e foram investigadas quanto as suas propriedades antimicrobianas. *S. adstringens* é uma espécie arbórea encontrada no cerrado, sua casca tem propriedades anti-inflamatória e cicatrizante contendo, pelo menos, 8% de taninos totais em sua composição (Lima et al., 1998; Hernandez et al., 2010; Farmacopeia Brasileira, 2010). As cascas e folhas de *C. ferrea* apresentam propriedades anti-inflamatórias e analgésicas, e investigações fitoquímicas revelam a presença de flavonoides, saponinas, taninos, cumarinas, esteroides e outros compostos fenólicos (Carvalho et al., 1996; Gonzalez et al., 2004; Vasconcelos et al., 2011; Lima et al., 2012).

O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito de frações obtidas a partir dos extratos dos frutos de *Caesalpinia ferrea* e das cascas de *Stryphnodendron adstringens* contra duas bacterioses do tomateiro: o cancro bacteriano, causado por *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* e a murcha bacteriana, causada por *R. solanacearum*.

2. Material e Métodos

O procedimento de obtenção das plantas, fracionamento dos extratos e análises fitoquímicas foram realizadas de acordo com metodologia citada no capítulo 1.

2.1. Fitobactérias testadas

O isolado da bactéria *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* foi obtido a partir de plantas sintomáticas coletadas no município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil; sendo, devidamente identificado e mantido na coleção do Laboratório de Bacteriologia de Plantas da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. O isolado de *R. solanacearum* (código 381) foi coletado em Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil, e cedido pelo pesquisador Dr. Carlos Alberto Lopes da Embrapa Hortaliças. Para a utilização nos ensaios, os isolados foram cultivados em meio 523 de Kado & Heskett (1970) por 48 horas a temperatura de 28°C. A concentração da suspensão foi ajustada em espectrofotômetro a 600 nm de absorbância para OD = 0,1, o que corresponde aproximadamente a $1,0 \times 10^8$ UFC mL⁻¹. Os isolados foram preservados em glicerina 30% e armazenados a -80°C.

2.2. Obtenção das mudas de tomateiro

Mudas de tomate da cultivar Santa Clara, foram produzidas em substrato organo-mineral inerte (Plantmax[®]), e foram transplantadas com 21 dias após a semeadura, em vasos plásticos com capacidade de 2 L. As plantas receberam adubação com solução nutritiva 15 dias após o transplântio, 40mL/vaso, em g/L⁻¹ contendo 0,192 de KCl, 0,104 de K₂SO₄, 0,150 de MgSO₄.7H₂O, 0,061 de uréia, 0,1 de NH₄NO₃, 0,0003 de (NH₄)₆ Mo₇O₂₄. 4H₂O, 0,002 de H₃BO₃, 0,007 de ZnSO₄, 0,002 de CuSO₄.5H₂O, 0,004 de MnCl₂.4H₂O, 0,004 de FeSO₄.7H₂O e 0,006 de EDTA bisódico.

2.3. Avaliação das frações contra a murcha bacteriana do tomateiro

Utilizou-se os seguintes tratamentos: 1- fração em n-butanol de *C. ferrea* (CFFB), 2- fração em acetato de etila de *C. ferrea* (CFFA), 3- fração aquosa de *C. ferrea* (CFFW), 4- fração em n-butanol de *S. adstringens* (SAFB), 5- fração em acetato de etila de *S. adstringens* (SAFA), 6- fração aquosa de *S. adstringens* (SAFW), 7- água destilada esterilizada (ADE), 8- Bion[®] e controle (plantas não inoculadas).

As frações dos extratos foram diluídas em água na concentração de 0,06 g/L, e o substrato foi regado com 10 mL/vaso, 3 dias antes da inoculação. O acibenzolar-S-metil (ASM), produto comercial Bion[®], foi pulverizado na concentração de 0,05 g/L. A inoculação foi realizada no momento do transplântio das mudas, por meio do corte das raízes com tesoura e imersão em suspensão bacteriana por 5 minutos. Posteriormente, as

plantas foram mantidas em câmara de crescimento com temperatura controlada, a 30°C. Foram realizados dois experimentos com 9 tratamentos e 4 repetições, sendo utilizado o delineamento inteiramente casualizado. A avaliação dos tratamentos foi realizada por meio da incidência, quantificando a percentagem de plantas doentes. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software SAS (SAS Institute, Inc., 1989, Cary, NC, EUA) versão 9.1.

2.4. Avaliação das frações contra o cancro bacteriano do tomateiro

Utilizou-se os seguintes tratamentos: 1 - fração em n-butanol de *C. ferrea* (CFFB), 2 - fração em acetato de etila de *C. ferrea* (CFFA), 3 - fração aquosa de *C. ferrea* (CFFW), 4 - fração em n-butanol de *S. adstringens* (SAFB), 5 - fração em acetato de etila de *S. adstringens* (SAFA), 6 - fração aquosa de *S. adstringens* (SAFW), 7 - água destilada esterilizada (ADE), 8 - Bion[®].

As frações dos extratos foram diluídas em água na concentração de 0,06 g/L, e o substrato foi regado com 10 mL/vaso, 3 dias antes da inoculação. O acibenzolar-S-metil (Bion[®]) foi pulverizado na concentração de 0,05 g/L. As plantas foram inoculadas 15 dias após transplântio, de acordo com Francis & Kabelka, (2001), com modificações. Cortou-se com tesoura o pecíolo do cotilédone do tomateiro, seguido da imersão do local do corte em suspensão bacteriana por 5 min. Foram realizados dois experimentos com 8 tratamentos e 3 repetições, utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado. A avaliação das plantas sintomáticas foi realizada por meio do “Individual Disease Rating Scores” (IDRS), usando a escala descritiva de Francis & Kabelka, (2001). As notas variaram de 0 a 5, em que 0 representa a planta sem sintomas, com a adição de 1 ponto em cada sintoma: necrose marginal, murcha e cancro. A nota 5 foi atribuída às plantas mortas. Dos sintomas moderados foi subtraído 0,5 ponto e ao sintoma severo foi adicionado 0,5 ponto. O progresso da doença foi avaliado com base no Percentual Máximo de Doença (PMD), com a escala de 0-5 ajustada para 0-100%. Para o cálculo do PMD foram realizadas quatro avaliações ao longo de 30 dias (Francis & Kabelka, 2001).

$$PMD = \frac{100 \sum_{i=1}^{n-1} [(D_i + D_{i+1})/2][T_{i+1} - T_i]}{[T_n - T_1]M}$$

Onde, n = número total de observações, D_i = individual disease rating scores da i -ésima observação, T_i = tempo (dias) da i -ésima observação, e M = máxima pontuação da escala de doença.

A Análise de Variância (ANOVA) e o teste de média do IDRS foram utilizados para estimar a severidade da doença de 0 (sem sintomas) a 5 (planta morta). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software SAS (SAS Institute, Inc., 1989, Cary, NC, EUA) versão 9.1.

3. Resultados e Discussão

As frações utilizadas nos tratamentos contra a murcha bacteriana do tomateiro, bem como o Bion[®], não tiveram efeito na redução da incidência da doença. No primeiro experimento todas as plantas morreram aos 5 dias após a inoculação (dai) (Figura 1). Já no segundo experimento, as plantas morreram entre 5 e 6 dai sendo que nenhum dos tratamentos utilizados apresentaram efeito na redução da incidência da doença, quando comparados às plantas não inoculadas que permaneceram vivas e sem sintomas da doença (Figura 2). O controle dessa bacteriose é difícil, principalmente quando as condições são favoráveis, como elevada temperatura e alta umidade do solo (McCarter, 1979; Hayward, 1991). No período de condução dos experimentos, as plantas foram mantidas em temperatura de 30°C e irrigadas diariamente, condições ideais para a ocorrência da doença. Outra questão que pode ter dificultado o controle, é que somente uma aplicação foi realizada, sendo talvez necessário um maior número de aplicações, ou mesmo aplicações curativas, e em concentrações mais elevadas. O método drástico de inoculação utilizado também favoreceu a penetração da bactéria na planta e, além disso, o isolado de *R. solanacearum* utilizado no experimento era muito agressivo, provocando murcha nas plantas em 3 dias. O modo de aplicação do Bion[®], por meio da pulverização, não deve ter influenciado nos resultados, pois em estudo realizado por Barreti et al., (2010), contra a murcha bacteriana do tomateiro, mostra que não há diferença no modo de aplicação do produto, seja regado ou pulverizado nas plantas. Além disso, a ação do acibenzolar-S-metil (ASM) não é direta contra o patógeno. Ji et al., (2005), comprovaram a ação do óleo de thymol (*Thymus* spp.) e palmarosa (*Cymbopogon martinii*) na redução da incidência da murcha bacteriana em condições de campo. O óleo de thymol mostrou-se mais efetivo contra a doença do que o óleo de palmarosa, sendo que 33,1 e 48,1% das plantas murcharam quando tratadas com thymol e palmarosa, respectivamente. Silva et al., (2007), investigaram o efeito do ASM (0,05

g/L) no controle da murcha bacteriana, onde o ASM foi regado no solo 2 dai, reduzindo significativamente a severidade da doença e promovendo o aumento na atividade das enzimas de defesa quitinase e peroxidase. Portanto, a busca por medidas alternativas de controle para esta bacteriose é importante, principalmente pela falta de produtos eficientes para o controle dessa doença. Embora os resultados obtidos no presente estudo não tenham sido positivos, outros testes poderão ser realizados, testando concentrações mais elevadas, utilizando um método de inoculação menos drástico ou mesmo o aumentando o número de aplicações.

Legenda:

- CFFB - *C. ferrea* n-butanol
- CFFA - *C. ferrea* acetato de etila
- CFFW - *C. ferrea* aquoso
- SAFB - *S. adstringens* n-butanol
- SAFA - *S. adstringens* acetato de etila
- SAFW - *S. adstringens* aquoso
- ADE - água destilada esterilizada
- Controle - plantas não inoculadas

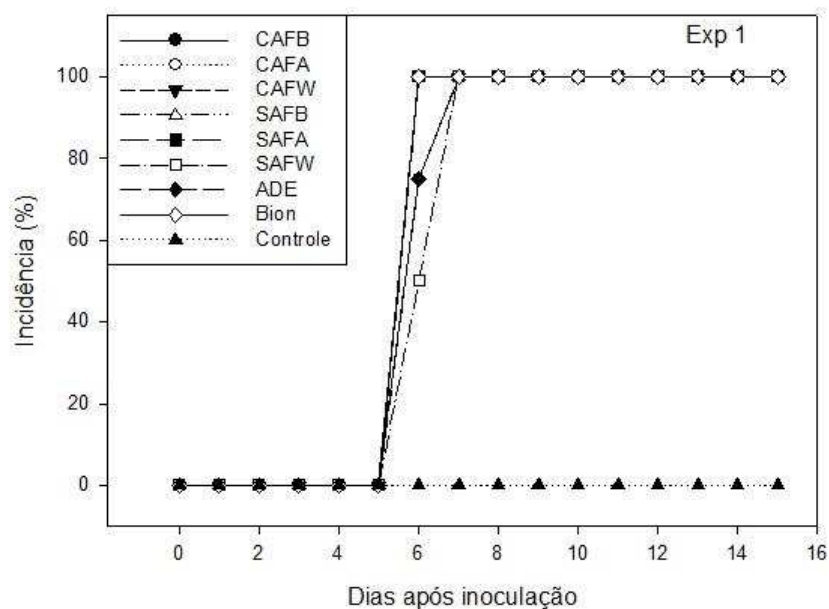


Figura 1- Incidência da murcha bacteriana em tomateiro tratado com as frações, Bion® e ADE.

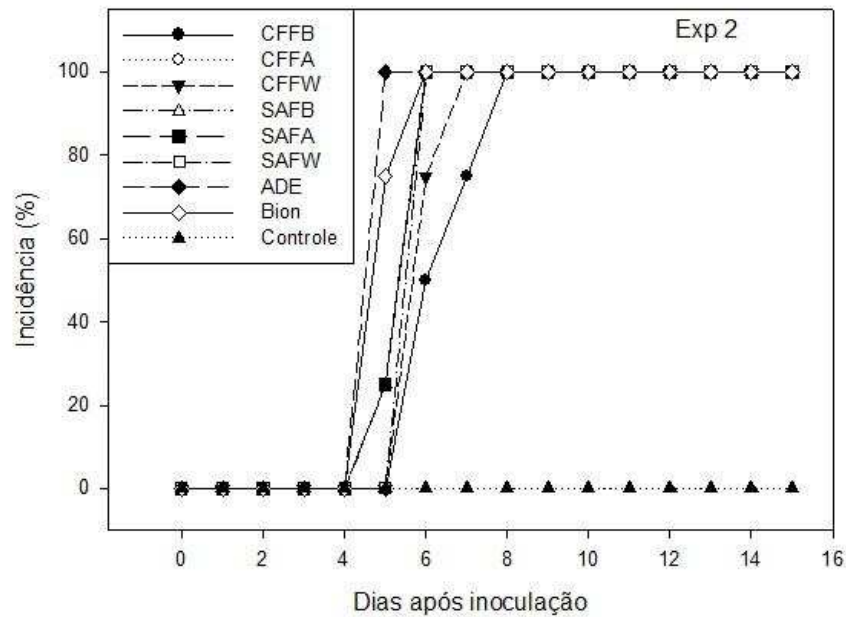


Figura 2- Incidência da murcha bacteriana em tomateiro tratado com as frações, Bion[®] e ADE.

Contra o cancro bacteriano do tomateiro, as frações de *C. ferrea* mostraram-se mais promissoras para o controle desta bacteriose, sendo que as frações de *C. ferrea* em n-butanol e aquosa apresentaram os melhores resultados, pois, as plantas tratadas não expressaram nenhum dos três tipos de sintomas da doença. As frações de *C. ferrea* e *S. adstringens* em acetato de etila também foram efetivas na redução dos sintomas da doença nas plantas inoculadas (Figura. 3). No segundo experimento, as plantas tratadas com as frações *C. ferrea* em n-butanol, acetato de etila e aquosa não apresentaram os sintomas da doença (Figura 4). Apenas a fração de *S. adstringens* em acetato de etila apresentou efeito na redução da doença no primeiro experimento (Figura 3).

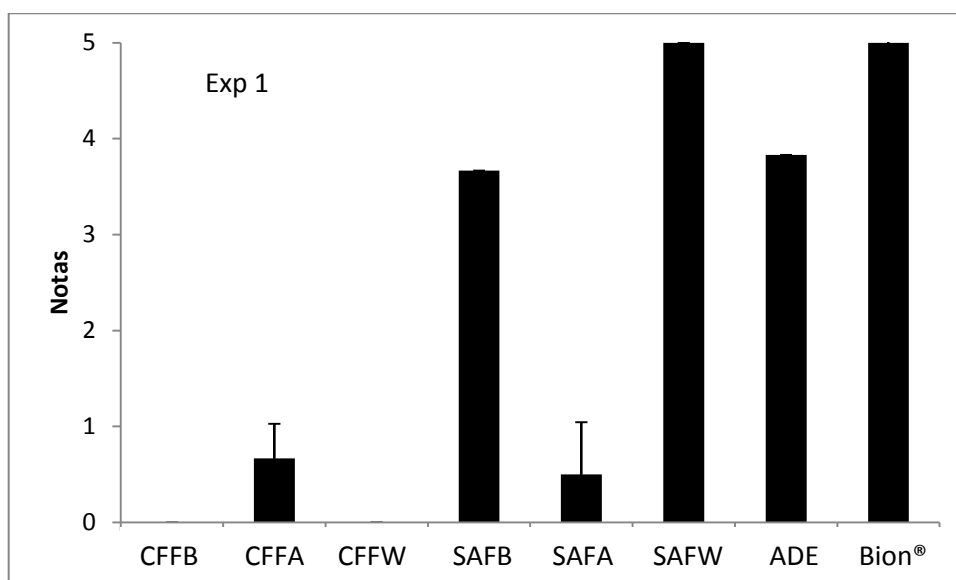


Figura 3. IDRS do cancro bacteriano do tomateiro após tratamento com as frações. Avaliação realizada por meio da média da IDRS, utilizando escala descritiva de 0 a 5. O erro padrão da média está representado em cada barra.

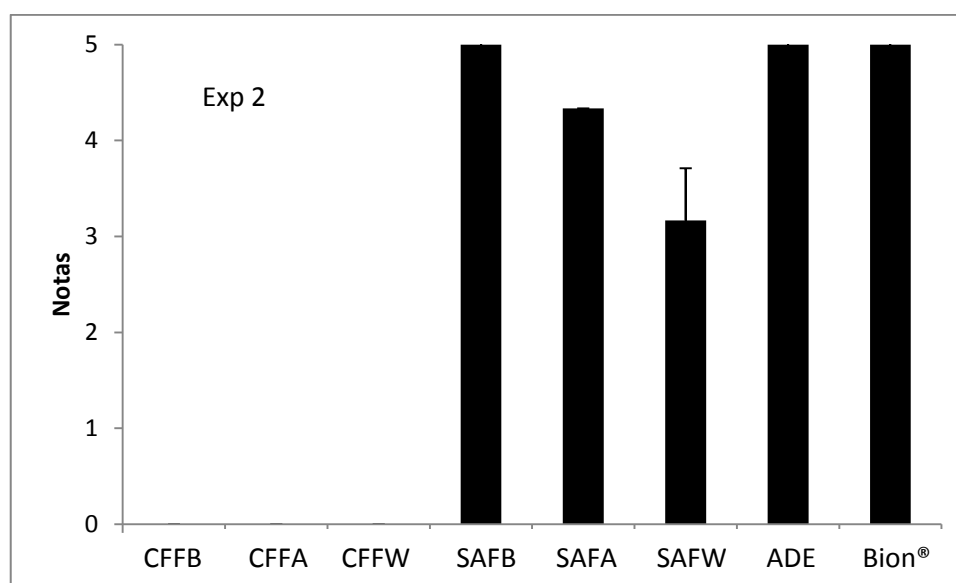


Figura 4. IDRS do cancro bacteriano do tomateiro após tratamento com as frações. Avaliação realizada por meio da média da IDRS. O erro padrão da média está representado em cada barra.

O individual disease rating scores (IDRS), obtido a partir da avaliação realizada por meio da escala de notas, permitiu avaliar a severidade da doença. As frações obtidas de *C. ferrea* apresentaram os melhores resultados no controle da doença, reduzindo ou inibindo a expressão dos sintomas nas plantas avaliadas até 30 dias após a inoculação. No primeiro experimento, a doença não ocorreu nas plantas tratadas com as frações de

C. ferrea em n-butanol e aquosa, onde a IDRS e o PMD foram igual a 0 (Tabela 1). Nas plantas tratadas com as frações de *S. adstringens* e *C. ferrea* em acetato de etila a severidade da doença foi reduzida, quando comparadas com o Bion e a fração aquosa de *S. adstringens*, apresentando o PMD = 8,89 e 6,29, respectivamente, retardando o progresso da doença ao longo do tempo (Tabela 1). Nos tratamentos Bion[®] e a fração aquosa de *S. adstringens* não houve controle da doença e todas as plantas morreram, sendo a IDRS = 5,0 e PMD = 42,59 e 40,37, respectivamente (Tabela 1).

No segundo experimento, as plantas tratadas com as frações de *C. ferrea* em acetato de etila, n-butanol e aquosa não apresentaram os sintomas da doença, sendo o IDRS = 0 e o PMD = 0 (Tabela 2). Entretanto, os tratamentos Bion[®] e ADE apresentaram a IDRS = 5 e o PMD = 57,41 e 42,58, respectivamente, sendo que todas as plantas morreram ao longo das avaliações (Tabela 2). Já as frações SAFW e SAFA não diferiram estatisticamente quanto ao IDRS com relação ao Bion[®], porém, houve diferença no valor do PMD, podendo-se afirmar que as plantas tratadas com essas frações tiveram o progresso da doença menor ao longo do tempo.

Tabela 1. Média do individual disease rating scores (IDRS) e do percentual máximo de doença (PMD) em tomateiro (*Solanum lycopersicum*) inoculado com a bactéria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, no primeiro experimento.

Tratamentos	Média da IDRS	PMD
Bion [®]	5,00 a	42,59 a
SAFW	5,00 a	40,37 a
ADE	3,83 a	33,70 ab
SAFB	3,67 a	30,56 ab
CFFA	0,67 b	6,29 bc
SAFA	0,50 b	8,89 bc
CFFW	0,00 b	0,00 c
CFFB	0,00 b	0,00 c

As médias seguidas da mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

Tabela 2. Média do individual disease rating scores (IDRS) e percentual máximo de doença (PMD) em tomateiro (*Solanum lycopersicum*) inoculado com a bactéria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, no segundo experimento.

Tratamentos	Média da IDRS	PMD
Bion [®]	5,00 a	57,41 a
ADE	5,00 a	42,58 ab
SAFB	5,00 a	28,83 b
SAFA	4,33 a	26,75 b
SAFW	3,17 a	22,58 b
CFFW	0,00 b	0,00 c
CFFB	0,00 b	0,00 c
CFFA	0,00 b	0,00 c

As médias seguidas da mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

Foi realizada a prospecção fitoquímica para diversos grupos de metabólitos secundários, como antraquinonas, cumarinas, flavonoides, cardiotônicos, saponinas, alcaloides e taninos, sendo revelada a presença de taninos e saponinas nas frações em acetato de etila e n-butanol de *C. ferrea* e *S. adstringens* (Capítulo 1).

Na literatura existem relatos da utilização de extratos de plantas para o controle de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, como os extratos de *Allium sativum* e *Ficus carica*. Os extratos de *A. sativum* e de *F. carica* apresentaram atividade contra essa bactéria nas concentrações de 1 e 30%, respectivamente, sendo que em casa de vegetação, o extrato de *A. sativum* reduziu a doença em 56%, enquanto que *F. carica* reduziu em 38% (Balestra et al., 2009). O efeito de óleos essenciais foi investigado contra a bactéria *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, ocorrendo a completa inibição do crescimento bacteriano pelos óleos essenciais de *Origanum vulgare*, *Thymus capitatus* e *Origanum dictamnus* a 100, 85 e 100 µg/mL, respectivamente (Daferera et al., 2003). Esses resultados demonstram que os produtos naturais, oriundos do metabolismo secundário das plantas podem apresentar potencial para uso no tratamento de fitobacterioses de plantas, como o cancro bacteriano do tomateiro. Embora não se tenha isolado a(s) molécula(s) antimicrobiana(s), as frações apresentaram resultados promissores para uso em campo, minimizando assim o uso de produtos químicos convencionais.

4. Referências Bibliográficas

- Almeida ER (1993) Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos. São Paulo. p.341.
- Balestra GM, Heydari A, Ceccarelli D, Ovidi E, Quattrucci A (2009) Antibacterial effect of *Allium sativum* and *Ficus carica* extracts on tomato bacterial pathogens. *Crop Protection* 28:807-811.
- Barreti PB, Souza RM, Pozza EA, Resende MLV (2010) Aplicação de doses de acibenzolar-S-metil na proteção contra a murcha bacteriana, população do patógeno e crescimento do tomateiro. *Tropical Plant Pathology* 35: 229-235.
- Bettiol W, Morandi MAB (2009) Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. P.149.
- Carvalho JCT, Teixeira JRM, Souza PJC, Bastos JK, Filho DS, Sarti SJ (1996) Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 53:175-178.
- Cimanga K, Kambu K, Tona L, Apers S, De Bruyne T, Hermans N, Totté J, Pieters L, Vlietinck AJ (2002) Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology* 79:213-220.
- Cowan MM (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12:564-582.
- Daferera DJ, Ziogas BN, Polissiou MG (2003) The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection* 22: 39-44.
- Farmacopeia Brasileira (2010) Substâncias farmacêuticas químicas, vegetais e biológicas. Vol. 2. In: Farmacopeia Brasileira. Brasília: Anvisa. 5ª. Ed. 2010. pp 669-670.
- Francis DM, Kabelka E (2001) Resistance to Bacterial Canker in Tomato (*Lycopersicon hirsutum* LA 407) and its Progeny Derived from Crosses to *L. esculentum*. *Plant Disease* 85: 1171-1176.

Gonzalez FG, Barros SBM, Bachi EM (2004). Atividade antioxidante e perfil fitoquímico de *Caesalpinia ferrea* Mart. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences 40:79.

Hayward AC (1991) Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Review of Phytopathology 29:65-87.

Hernandes L, Pereira LMS, Palazzo F, Mello JCP (2010) Wound-healing evaluation of ointment from *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) in rat skin. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences 46:431-436.

Ji P, Momol MT, Olson SM, Pradhanang PM, Jones JB (2005) Evaluation of thymol as biofumigant for control bacterial wilt of tomato under field conditions. Plant Disease 89:497-500.

Kado CI, Heskett MG (1970) Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. Phytopathology 60:969-976.

Khan MR, Kihara M, Omoloso AD (2001) Antimicrobial activity of *Symplocos cochinchinensis*. Fitoterapia 72: 825-828.

Lima JCS, Martins DTO, Souza Jr PT (1998) Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for antiinflammatory activity. Phytotherapy Research 12:218-220.

Lima SMA, Araújo LCC, Sitônio MM, Freitas ACC, Moura SL, Correia MTS, Malta DJN, Gonçalves-Silva T (2012) Anti-inflammatory and analgesic potencial of *Caesalpinia ferrea*. Revista Brasileira de Farmacognosia 22:169-175.

Lopes CA, Ávila AC (2005) Doenças do tomateiro. Brasília: Embrapa Hortaliças. 151p.

Mariconi FAM (1981) Inseticidas e seu emprego no combate às pragas. Vol. 1. Defensivos. São Paulo. Nobel. 5ª. Ed.

McCarter SM (1979) Persistence of *Pseudomonas solanacearum* in artificially infested soils. Phytopathology 66:998-1000.

Scalbert A (1991) Antimicrobial properties of tannins. Phytochemistry 30:3875-3883.

Silva RF, Pascholati SF, Bedendo IP (2007) Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* a *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. Fitopatologia Brasileira 32:189-196.

Vasconcelos CFB, Maranhão HML, Batista TM, Carneiro EM, Ferreira F, Costa J, Soares LAL, Sá MDC, Souza TP, Wanderley AG (2011) Hypoglycaemic activity and molecular mechanisms of *Caesalpinia ferrea* Martius bark extract on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. Journal of Ethnopharmacology 137:1533-1541.

Capítulo 3

AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS DE *stryphnodendron adstringens* E *Caesalpinia ferrea* NO CONTROLE DA PINTA BACTERIANA DO TOMATEIRO E NA ATIVIDADE DE ENZIMAS DE DEFESA

RESUMO

CAVALCANTE, Gilcianny Pignata, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2013. **Avaliação dos extratos de *Stryphnodendron adstringens* e *Caesalpinia ferrea* no controle da pinta bacteriana do tomateiro e na atividade de enzimas de defesa.** Orientador: José Rogério de Oliveira. Co-orientadores: João Paulo Viana Leite e Luis Cláudio Vieira da Cunha.

Avaliou-se o efeito das frações de *Stryphnodendron adstringens* “barbatimão”, *Caesalpinia ferrea* “jucá”, e do acibenzolar-S-metil contra a pinta bacteriana do tomateiro e o efeito da fração *S. adstringens* em acetato de etila e do ASM na atividade de enzimas de defesa. A severidade foi avaliada aos 7 dias após a inoculação, sendo que no primeiro experimento, houve redução significativa no número de pintas em 96,5; 81,7 e 80,1% nas plantas tratadas com o ASM, fração de *S. adstringens* em acetato de etila e n-butanol, respectivamente. No segundo experimento, houve redução da doença em 71, 50,8 e 46,9% nas plantas tratadas com a fração *S. adstringens* em acetato de etila seguida pelo ASM e a fração *C. ferrea* em n-butanol. Além disso, ocorreu o aumento na atividade de enzimas de defesa nas plantas tratadas com o ASM e a fração *S. adstringens* em acetato de etila. Nas plantas inoculadas, em determinadas épocas de avaliação, ocorreu o aumento na atividade das enzimas peroxidase, polifenoloxidase, β -1,3-glucanase e fenilalanina amônia-liase nas plantas tratadas com o ASM e a fração *S. adstringens* em acetato de etila, diferindo estatisticamente do controle. Já nas plantas não inoculadas a atividade das enzimas foi menor do que nas plantas inoculadas, porém, em determinadas épocas de avaliação o ASM e a fração *S. adstringens* em acetato de etila apresentaram aumento na atividade das enzimas peroxidase, β -1,3-glucanase e fenilalanina amônia-liase, diferindo do controle.

Palavras-chave: *Solanum lycopersicum*, *Pseudomonas syringe* pv. *tomato*, acibenzolar-S-metil, extratos de plantas.

ABSTRACT

CAVALCANTE, Gilcianny Pignata, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, february, 2013. ***Stryphnodendron adstringens* and *Caesalpinia ferrea* extracts evaluation on the control of tomato bacterial speck and on the activity of defense enzymes.** Adviser: José Rogério de Oliveira. Co-advisers: João Paulo Viana Leite and Luis Cláudio Vieira da Cunha.

The effects of *Stryphnodendron adstringens* “barbatimão”, *Caesalpinia ferrea* “júcá” fractions and acibenzolar-S-methyl against bacterial speck of tomato and the effect of fraction *S. adstringens* in ethyl acetate and the ASM in the defense enzymes activity were evaluated. The severity was assessed 7 days after inoculation. In the first experiment, there was significant reduction in the number of lesions in 96.5, 81.7 and 80.1% in plants treated with ASM, *S. adstringens* fractions in ethyl acetate and n-butanol, respectively. In the second experiment, there was a reduction of the disease in 71, 50.8 and 46.9% in plants treated with *S. adstringens* fraction in ethyl acetate followed by ASM and *C. ferrea* fraction in n-butanol. In addition, there was an increase in the defense enzymes activity in plants treated with ASM and *S. adstringens* fraction in ethyl acetate. In inoculated plants, at certain times of assessment, there was an increase in the activity of peroxidase, polyphenol oxidase, β -1,3-glucanase and phenylalanine ammonia lyase in plants treated with ASM and *S. adstringens* fraction in ethyl acetate, differing of control. In non-inoculated plants the enzyme activity was lower than in inoculated plants, however, at certain times of assessment the ASM and *S. adstringens* fraction in ethyl acetate showed increased activity of peroxidase, β -1,3-glucanase and phenylalanine ammonia lyase, differing control.

Key words: *Solanum lycopersicum*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, acibenzolar-S-methyl, plant extracts.

1. Introdução

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.), originário do continente Sul Americano, pertence à família Solanaceae e é uma das hortaliças mais consumidas mundialmente (Minami & Haag, 1989) principalmente pela versatilidade, valores nutricionais e maior vida útil quando comparado com as outras hortaliças, além da possibilidade de processamento industrial (Tighelaar, 1991). No ranking da produção mundial de tomate (2009/2010), o Brasil ocupa o 9º lugar, sendo a China a maior produtora, seguida dos Estados Unidos e da Índia. Em 2010, foram produzidos no Brasil aproximadamente 4.114 milhões de toneladas, com uma produtividade média de 60,5 kg/ha (IBGE, 2012).

O tomateiro está sujeito a várias doenças que podem limitar a sua produção, dentre elas a pinta bacteriana, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe, 1933); Young et al. 1978, doença mais comum em regiões onde ocorrem temperaturas amenas (18 a 25°C) e alta umidade relativa do ar (acima de 90%). O controle pode ser feito por meio da utilização de sementes de boa qualidade, mudas saudáveis, cultivares resistentes e aplicação de produtos à base de cobre e antibióticos registrados. O tomateiro é uma das culturas mais dependentes das aplicações de produtos químicos, resultando no aumento dos custos de produção, além de contribuir para a seleção de organismos alvo resistentes e serem tóxicos ao homem e ao ambiente (Lopes e Ávila, 2005; Mariconi, 1981).

O Brasil tem uma enorme diversidade de espécies vegetais, sendo que muitas destas apresentam compostos biologicamente ativos contra vários organismos (Almeida, 1993; Morais et al., 2002; Simões et al., 2003). Os compostos derivados do metabolismo secundário não possuem função direta no crescimento e desenvolvimento das plantas, mas conferem atividade de fitoproteção, atração de polinizadores e adaptação ambiental (Taiz & Zeiger, 2004). Dentre estes metabólitos secundários alguns se destacam por apresentarem atividade antimicrobiana como os óleos essenciais, saponinas, flavonoides, cumarinas, fitoalexinas, taninos e alcaloides (Taiz & Zeiger, 2004).

As plantas sintetizam uma ampla gama de produtos naturais, muitos dos quais evoluíram de forma a conferir vantagem contra ataques microbianos, que podem ser ativadas em resposta ao ataque de patógenos em ampla escala (Dixon, 2001). Os mecanismos de defesa das plantas contra fitopatógenos envolvem alterações relacionadas com a atividade de enzimas, como peroxidase, β -1,3-glucanase, quitinase,

fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase (Stangarlin et al. 2011). O tempo em que essas respostas de defesa são ativadas é crítico e pode ser a diferença entre ser capaz de lidar ou sucumbir ao desafio de um patógeno (Vallad & Goodman, 2004). Os indutores de resistência não atuam diretamente sobre o patógeno, agindo como um agente antimicrobiano, mas sensibilizam a planta a ativar seus mecanismos de defesa em resposta à presença de um patógeno (Sequeira, 1983; Conrath et al., 2002). Dentre os indutores abióticos, o acibenzolar-S-metil (ASM), tem apresentado potencial como ativador de resistência sistêmica adquirida, conferindo proteção contra várias doenças bacterianas de plantas. Diversos estudos demonstram a ação do ASM contra doenças causadas por bactérias fitopatogênicas, como *Xanthomonas vesicatoria* (Cavalcanti et al., 2006), *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (Boro et al., 2011), *Ralstonia solanacearum* (Ji et al., 2003; Silva et al., 2007), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Louws et al., 2001; Graves & Alexander, 2002) e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Baysal et al., 2003; Soyulu et al., 2003).

Extratos de plantas também têm sido investigados quanto à indução de resistência em plantas contra diversos patógenos. O extrato de zimmu (*Allium sativum* L. x *Allium cepa* L.) foi estudado contra *X. campestris* pv. *malvacearum* em algodão (Satya et al., 2007) e *Lasiodiplodia theobromae* e *Colletotrichum musae* em banana (Sangeetha et al., 2013). Extratos de *Datura metel* tiveram sua ação investigada contra *Rhizoctonia solani* e *X. oryzae* pv. *oryzae* em arroz (Kagale et al., 2004) e o extrato de *Hedera helix* contra *Erwinia aylovora* em maçã (Baysal & Zeller, 2004).

O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito das frações obtidas a partir dos extratos dos frutos de *Caesalpinia ferrea*, das cascas de *Stryphnodendron adstringens* e do indutor Bion[®] na severidade da pinta bacteriana do tomateiro e na atividade de enzimas de defesa da planta.

2. Materiais e Métodos

O procedimento de obtenção das plantas, fracionamento dos extratos e análises fitoquímicas foram realizadas de acordo com a metodologia descrita no capítulo 1.

2.1. Obtenção do isolado de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

O isolado de *P. syringae* pv. *tomato* (*Pst*) foi obtido a partir de plantas sintomáticas no município de Coimbra, Minas Gerais, Brasil e sendo devidamente identificado e mantido na coleção do Laboratório de Bacteriologia de Plantas da

Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Para a utilização nos ensaios, o isolado foi cultivado em meio 523 de Kado & Heskett (1970) por 48 h na temperatura de 28°C. A concentração da suspensão foi ajustada em espectrofotômetro a 600 nm de absorbância para obter OD = 0,1 que corresponde aproximadamente a $1,0 \times 10^8$ UFC mL⁻¹. O isolado foi preservado em glicerina 30% e armazenado a -80°C.

2.2. Obtenção das mudas de tomateiro

Mudas de tomate da cultivar Santa Clara foram produzidas em substrato organo-mineral inerte (Plantmax[®]), e transplantadas aos 21 dias após a semeadura para vasos plásticos de 2 L contendo substrato. As plantas receberam adubação com solução nutritiva 15 dias após o transplântio, na quantidade de 40 mL/vaso, contendo em g/L 0,192 de KCl, 0,104 de K₂SO₄, 0,150 de MgSO₄.7H₂O, 0,061 de uréia, 0,1 de NH₄NO₃, 0,0003 de (NH₄)₆ Mo₇O₂₄. 4H₂O, 0,002 de H₃BO₃, 0,007 de ZnSO₄, 0,002 de CuSO₄.5H₂O, 0,004 de MnCl₂.4H₂O, 0,004 de FeSO₄.7H₂O e 0,006 de EDTA bisódico.

2.3. Avaliação das frações contra a *Pst*

Utilizou-se os seguintes tratamentos: 1 - fração em n-butanol de *C. ferrea* (CFFB), 2 - fração em acetato de etila de *C. ferrea* (CFFA), 3 - fração aquosa de *C. ferrea* (CFFW), 4 - fração em n-butanol de *S. adstringens* (SAFB), 5 - fração em acetato de etila de *S. adstringens* (SAFA), 6 - fração aquosa de *S. adstringens* (SAFW), 7 - água destilada esterilizada (ADE), 8 - Bion[®].

As frações dos extratos foram diluídas em água na concentração de 0,06 g/L, e o substrato foi regado com 10 mL/vaso, 3 dias antes da inoculação. O acibenzolar-S-metil (Bion[®]) foi pulverizado nas plantas na concentração de 0,05 g/L, 3 dias antes da inoculação. As plantas foram inoculadas aos 15 dias após transplântio, sendo antes mantidas por 24 h em câmara de nevoeiro, inoculadas por atomização e mantidas por mais 24 h na câmara de nevoeiro. A avaliação da severidade foi realizada aos 7 dias após a inoculação (dai), por meio da contagem do número de pintas em todas as folhas da planta (Schneider & Grogan, 1977). Foram realizados dois experimentos, com 8 tratamentos e 3 repetições, sendo utilizado o delineamento inteiramente casualizado. Para a análise estatística dos dados foi realizada a análise de variância (ANOVA), utilizando-se o número de pintas. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan a 1% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software SAS (SAS Institute, Inc., 1989, Cary, NC, EUA) versão 9.1.

2.4. Determinação da atividade Enzimática

Os tratamentos que apresentaram os melhores resultados na redução da severidade da pinta bacteriana foram utilizados para a determinação da atividade de enzimas de defesa. Portanto, plantas inoculadas e não inoculadas com *Pst* foram tratadas com a fração SAFA e com Bion[®], sendo a água destilada esterilizada (ADE) utilizada como controle. O modo de aplicação das frações e do Bion[®] e a inoculação das plantas foi realizado conforme descrito anteriormente. As amostras das folhas de tomateiro foram coletadas aos 3, 6, 9 e 12 dai. As plantas não inoculadas serviram de controle. Para a extração das enzimas, 0,3 g das amostras congeladas foram pesadas e trituradas em nitrogênio (N₂) líquido no almofariz com adição de polivinilpirrolidona (PVP) 1% (p/v) até a obtenção de um pó fino. O pó obtido foi macerado em 2 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,5) contendo 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF). A centrifugação foi realizada a 20000 g por 25 min a 4°C. Posteriormente, uma alíquota do sobrenadante foi utilizada para a determinação da atividade enzimática.

2.4.1. Peroxidases (POX) (EC 1.11.1.7) polifenoloxidasas (PFO) (EC 1.10.3.1)

As atividades da POX e PFO foi determinada conforme o método de Kar & Miashra (1976). Para a atividade da POX, a mistura de 300 µL de água destilada, 250 µL tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8), 200 µL do substrato pirogalol 100 mM e 200 µL de peróxido de hidrogênio 100 mM foi adicionada a 50 µL do extrato. Para a atividade da PFO, a mistura da reação continha 350 µL de água destilada, 350 µL do tampão de reação fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8), 200 µL de pirogalol 100 mM e 100 µL do extrato. A absorbância foi medida a 420 nm em espectrofotômetro a cada 10 seg, durante 1 min, totalizando cinco leituras. Utilizou-se o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ (Chance & Maehley, 1955) para calcular a atividade das duas enzimas e os resultados foram expressos em M. min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

2.4.2. β-1,3-glucanase (GLU) (EC 3.2.1.39) e fenilalanina amônia-liase (FAL) (EC 4.3.1.5)

A atividade da GLU foi determinada conforme método descrito por Lever (1972). A mistura de reação continha 230 µL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0), 250 µL do substrato laminarina na concentração de 4 mg mL⁻¹ e 20 µL do extrato vegetal, sendo incubada a 45°C por 30 min. Após o período de incubação, adicionou-se 500 µL de ácido dinitrosalicílico (DNS) à mistura, em seguida, incubada por 15 min a 100°C. A

reação foi interrompida pelo resfriamento das amostras em banho de gelo até a temperatura de 30°C. Nas amostras controle, a mistura de reação foi igual, exceto que o extrato vegetal e o DNS foram adicionados ao mesmo tempo e incubados a 45°C por 30 min. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 540 nm e a atividade da GLU foi expressa em unidades de absorvância $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

A atividade da FAL foi determinada conforme o método descrito por Cahill & McComb (1992). A mistura da reação que continha 350 μL de tampão Tris-HCl 25 mM (pH 8,8), 550 μL de *L*-fenilalanina 100 mM e 100 μL do extrato vegetal, foi incubada a 40°C durante 3 horas. Nas amostras controle, a mistura da reação continha 900 μL do tampão Tris-HCl e 100 μL da amostra. A reação foi finalizada pela adição de 130 μL de HCl 6 N. A absorvância foi medida em espectrofotômetro a 290 nm e o coeficiente de extinção molar de $10^4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Zucker, 1965) foi utilizado para calcular a atividade da FAL, a qual foi expressa em $\text{M min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

A concentração de proteínas em cada amostra foi determinada de acordo com o método colorimétrico descrito por Bradford (1976). Os dados das atividades das enzimas POX, PFO, FAL e GLU foram submetidos à ANOVA. As análises foram realizadas separadamente para as plantas inoculadas e não inoculadas e para cada época de coleta, utilizando-se o teste Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software SAS (SAS Institute, Inc., 1989, Cary, NC, EUA) versão 9.1.

3. Resultados e Discussão

Severidade da pinta bacteriana do tomateiro

No primeiro experimento, houve redução significativa na severidade da doença em 96,5; 81,7 e 80,1% nos tratamentos com Bion[®] e as frações *S. adstringens* em acetato de etila e n-butanol, respectivamente, quando comparados com as plantas tratadas com água destilada esterilizada (ADE) (Tabela 1). No segundo experimento, houve redução significativa na severidade da doença em 71; 50,8 e 46,9% nas plantas tratadas com a fração *S. adstringens* em acetato de etila, seguido pelo Bion[®] e *C. ferrea* em n-butanol, quando comparadas as plantas tratadas com ADE (Tabela. 2). O aumento da severidade da doença no segundo experimento pode ser explicado pelo aumento da temperatura, sendo que no primeiro experimento a máxima registrada foi de 28,4 °C e no segundo a máxima foi de 34°C (INMET, 2012). A alta temperatura pode ter influenciado na degradação dos produtos aplicados ou nas respostas de defesa da planta.

Apesar de *Pst* ter ótimo crescimento em casa de vegetação sob temperaturas mais amenas, o aumento na expressão dos sintomas pode ser devido a sensibilidade de genes de resistência da planta a altas temperaturas. Wang et al. (2009), em experimento realizado com a bactéria *Pst*, demonstraram a sensibilidade dos genes de resistência de plantas à temperaturas mais elevadas, podendo aumentar a expressão dos sintomas da doença, tendo influência tanto na resposta de resistência basal da planta como na resposta mediada pelo gene *R*.

Foi realizada a prospecção fitoquímica para diversos grupos de metabólitos secundários, como antraquinonas, cumarinas, flavonoides, cardiotônicos, saponinas, alcaloides e taninos, sendo revelada a presença de taninos e saponinas nas frações em acetato de etila e n-butanol de *C. ferrea* e *S. adstringens* (Capítulo 1).

Legenda:

CFFB - *C. ferrea* n-butanol

CFFA - *C. ferrea* acetato de etila

CFFW - *C. ferrea* aquoso

SAFB - *S. adstringens* n-butanol

SAFA - *S. adstringens* acetato de etila

SAFW - *S. adstringens* aquoso

ADE - água destilada esterilizada

Tabela 1- Severidade (Sev) da pinta bacteriana em tomateiro em função de diferentes tratamentos com as frações, Bion[®] e ADE, no primeiro experimento.

Tratamentos	Sev
ADE	998,3 a
CFFB	646,0 b
CFFA	558,0 b
CFFW	548,0 b
SAFW	485,3 bc
SAFB	198,0 cd
SAFA	183,0 cd
Bion [®]	35,3 d

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ($\alpha= 0,01$).

Tabela 2- Severidade (Sev) da pinta bacteriana em tomateiro em função de diferentes tratamentos com as frações, Bion[®] e ADE, no segundo experimento.

Tratamentos	Sev
SAFW	2154,3 a
ADE	1760,0 a
CFFA	1225,0 ab
CFFW	1194,0 ab
SAFB	1182,3 ab
CFFB	684,0 b
Bion [®]	634,0 b
SAFA	373,0 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ($\alpha= 0,01$).

Atividade das enzimas POX, PFO, GLU e FAL

A atividade da POX foi significativamente maior nas plantas inoculadas e tratadas com a fração SAFA e com Bion[®] aos 6 dai, sendo que aos 9 e 12 dai, as plantas tratadas com o Bion[®] apresentaram uma maior atividade enzimática, diferindo estatisticamente do controle e da fração SAFA (Figura 1a). Nas plantas não inoculadas, a atividade da POX só apresentou diferença estatística do controle aos 9 dai nas plantas tratadas com a fração SAFA e com o Bion[®] (Figura 1b).

A atividade da PFO nas plantas inoculadas foi significativamente maior aos 3 dai nas plantas tratadas com o Bion[®], diferindo da fração SAFA e do controle. Já aos 6, 9 e 12 dai, as plantas tratadas com Bion[®] e a fração SAFA apresentaram um aumento significativo na atividade da PFO, diferindo do controle (Figura 2a). Nas plantas não inoculadas não houve diferença estatística entre os tratamentos e a atividade da PFO foi menor do que nas plantas tratadas e inoculadas (Figura 2b).

A atividade da GLU foi maior nas plantas inoculadas e tratadas com o Bion[®] aos 6 dai, diferindo estatisticamente da fração SAFA e do controle (ADE). Já aos 9 dai a atividade da enzima aumentou significativamente nas plantas inoculadas e tratadas com o Bion[®] e a fração SAFA, não diferindo estatisticamente entre si. Portanto, a atividade da GLU aumentou gradativamente ao longo do tempo nas plantas inoculadas, sendo maior aos 12 dai nas plantas tratadas com o Bion[®] e com a fração SAFA, diferindo do controle (Figura 3a). O aumento na atividade da GLU nas plantas não inoculadas foi significativo aos 6 dai, onde as plantas tratadas com o Bion[®] e com a fração SAFA apresentaram uma maior atividade dessa enzima, porém não apresentando diferença estatística entre os tratamentos aos 9 dai. Já aos 12 dai houve um aumento significativo

na atividade dessa enzima nas plantas tratadas com o Bion[®] e a fração SAFA, diferindo do controle (Figura 3b).

A atividade da FAL nas plantas inoculadas foi maior nos tratamentos com Bion[®] e com a fração SAFA, não apresentando diferença estatística, mas diferindo do controle aos 3 e 6 dai; porém aos 9 dai o Bion[®] conferiu uma maior atividade desta enzima e diferiu dos demais tratamentos (Figura 4a). Nas plantas não inoculadas, a atividade da FAL foi maior nas plantas tratadas com Bion[®] e a fração SAFA aos 3 e 6 dai quando comparadas ao controle. Já aos 9 dai as plantas tratadas com a fração SAFA apresentaram uma maior atividade enzimática, diferindo do Bion[®] e do controle (Figura 4b).

Na literatura, diversos estudos mostram o efeito do acibenzolar-S-metil (ASM), produto comercial Bion[®], na indução de resistência contra doenças bacterianas de plantas. Silva et al. (2007), estudaram o efeito do acibenzolar-S-metil (ASM) contra a murcha bacteriana, conferindo aumento na atividade das enzimas quitinase (QUI) e POX aos 5 dai nas plantas inoculadas. Cavalcanti et al. (2006), também estudaram a atividade de enzimas de defesa em plantas tratadas com o ASM e o produto Ecolife[®] em tomateiro contra *Xanthomonas vesicatoria*, onde houve o aumento da atividade das enzimas POX e QUI em plantas inoculadas e tratadas com o ASM e Ecolife[®]. Baysal et al., (2003), estudaram os efeitos do ASM na indução de resistência contra o cancro bacteriano do tomateiro, sendo que as plantas tratadas com o ASM tiveram a severidade reduzida em 76,3%, ocorrendo alterações na atividade da POX aos 5 dai nas plantas tratadas. Baysal & Zeller (2004), investigaram o efeito do extrato das folhas de *Hedera helix* e do ASM na indução de resistência contra a bactéria *Erwinia amylovora* em maçã. O extrato e o ASM reduziram a doença, restringiram a multiplicação da bactéria nos tecidos da planta e conferiram aumento da atividade das enzimas POX e QUI. Satya et al. (2007), estudaram o efeito do extrato das folhas de zimmu (*Allium sativum* L. x *Allium cepa* L.) contra *X. campestris* pv. *malvacearum* na indução de resistência em algodoeiro. Os extratos aquosos reduziram o número de lesões em 73% quando comparado as plantas tratadas com água e ocorreu o aumento na atividade de enzimas de defesa como a FAL, POX e PPO. Portanto, os mecanismos de defesa das plantas contra fitopatógenos envolvem alterações metabólicas que estão ligadas à mudanças na atividade de enzimas associadas ao mecanismo de defesa das plantas, também chamadas de proteínas relacionadas a patogênese (proteínas- PR) que são produzidas em resposta a infecção por patógenos. As enzimas peroxidases e polifenoloxidasas utilizam como

substratos os compostos fenólicos e o produto da oxidação destas enzimas são potentes bactericidas e fungicidas, produzidos rapidamente e se acumulam após a infecção, sendo altamente tóxicos aos patógenos (Mueller & Beckman, 1974). As peroxidases participam também da biossíntese do hormônio vegetal etileno, na oxidação de compostos fenólicos e ácido indol-3-acético (AIA) e na biossíntese de lignina e suberina (Ishige et al., 1993; Cavalcanti et al., 2005; Takahama & Oniki, 1992; Quiroga et al., 2000). As peroxidases são enzimas que fazem parte do processo final de lignificação. A lignina juntamente com os compostos fenólicos reforçam a parede celular, aumentando assim a resistência da planta à degradação enzimática causada pelos patógenos e atuando como barreira física impedindo tanto a entrada de patógenos como a de toxinas (Nicholson & Hammerschmidt, 1992). Já as polifenoloxidasas tem a capacidade de catalisar a oxidação de compostos fenólicos a quinonas, que são compostos altamente tóxicos aos patógenos (Li & Steffens, 2002; Dowd et al., 1997). Estudos realizados mostraram evidências do papel da PPO em tomateiro, onde foi observado que plantas de tomate super-expressando o gene PPO apresentaram alta capacidade de oxidação e promoveram um aumento na resistência das plantas contra a bactéria *Pst* (Li & Steffens, 2002). Já a enzima fenilalanina amônia-liase é responsável pela desaminação da *L*-fenilalanina formando o ácido *trans*-cinâmico e amônia e é importante na síntese de compostos fenólicos em resposta à infecção (Assis et al., 2001; Nicholson & Hammerchmidt, 1992). A enzima β -1,3-glucanase é uma enzima lítica capaz de degradar polissacarídeos encontrados na parede celular de muitos fungos e possui atividade antifúngica quando testada *in vitro*. (Van Loon et al., 2006; Mauch & Staehelin, 1989; Mauch et al., 1988). Porém, a atividade da GLU também tem sido relatada contra bactérias fitopatogênicas como *Erwinia amylovora* e *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, no entanto, não se conhece o papel desta enzima na resistência contra patógenos bacterianos (Brisset et al. 2000; Cavalcanti et al. 2006).

Com base nos resultados obtidos nesse estudo, pode-se afirmar que a fração em acetato de etila obtida a partir dos frutos de *S. adstringens* possui substâncias capazes de agir como elicitoras de respostas de defesa. Portanto, a exploração da atividade biológica de compostos secundários pode, juntamente à indução da resistência, se tornar uma alternativa para o controle da pinta bacteriana do tomateiro.

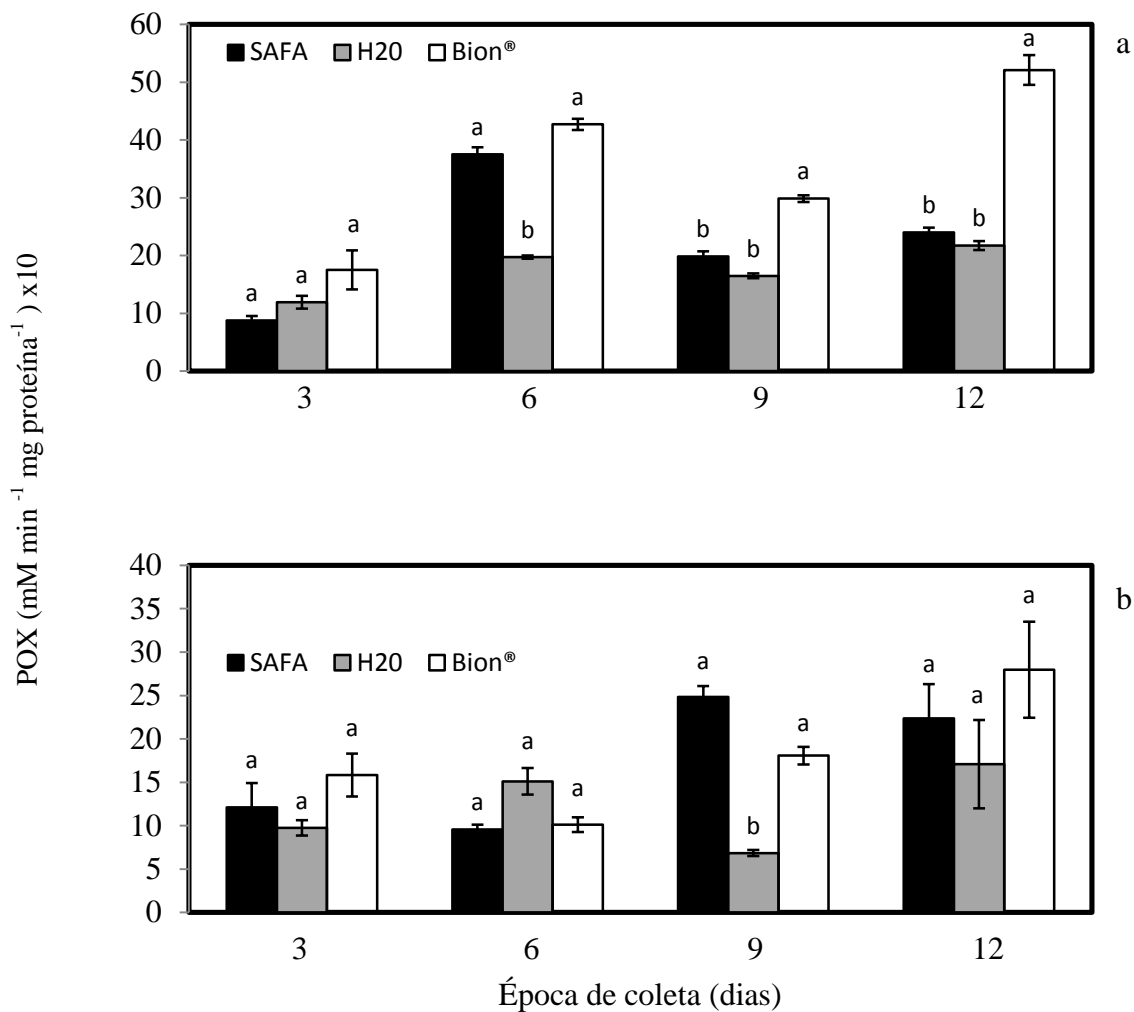


Figura 1. Atividade da peroxidase em tomateiro tratado com a fração SAFA, H₂O e Bion®. As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

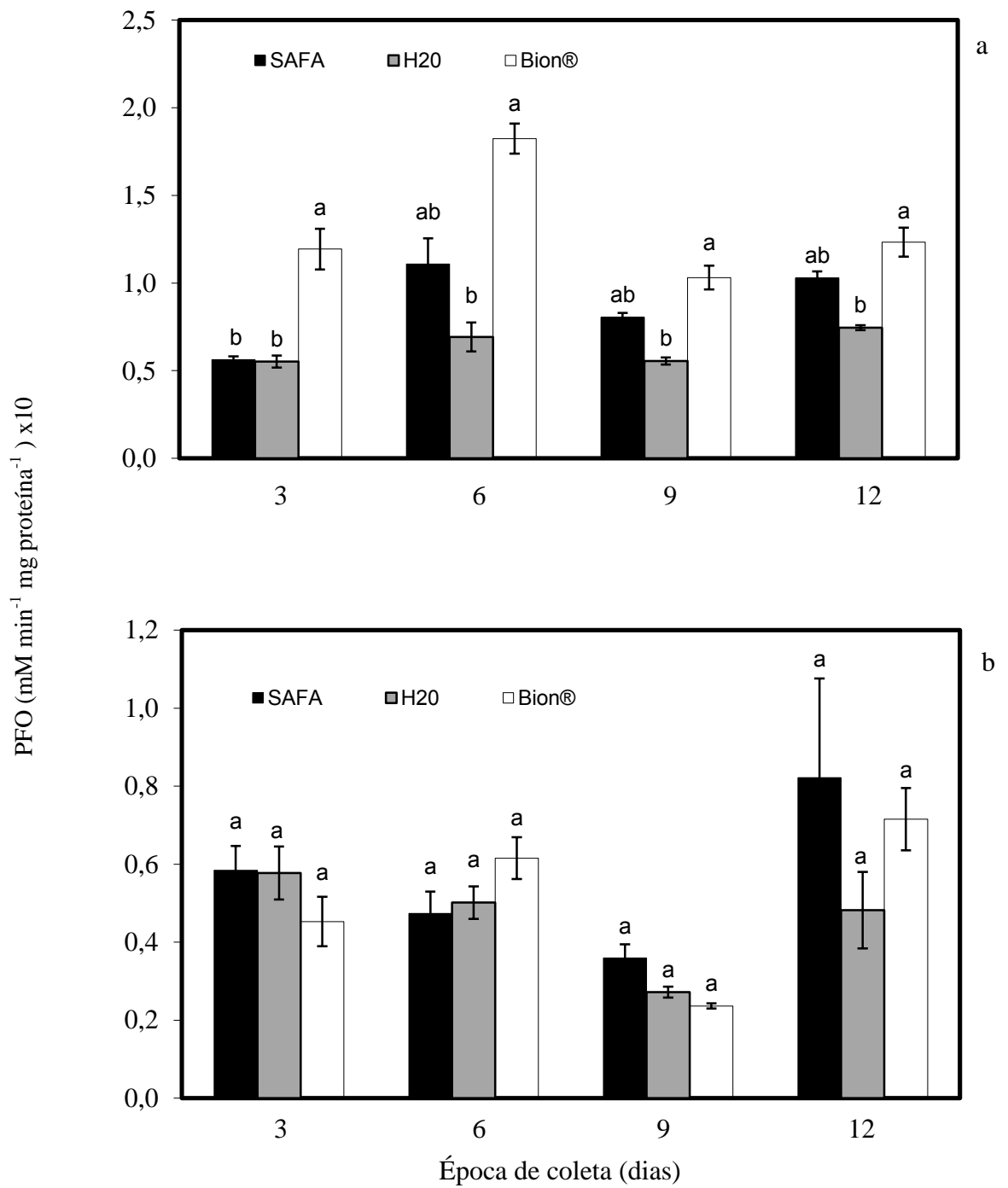


Figura 2. Atividade da polifenoloxidase em tomateiro tratado com a fração SAFA, H₂O e Bion®. As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

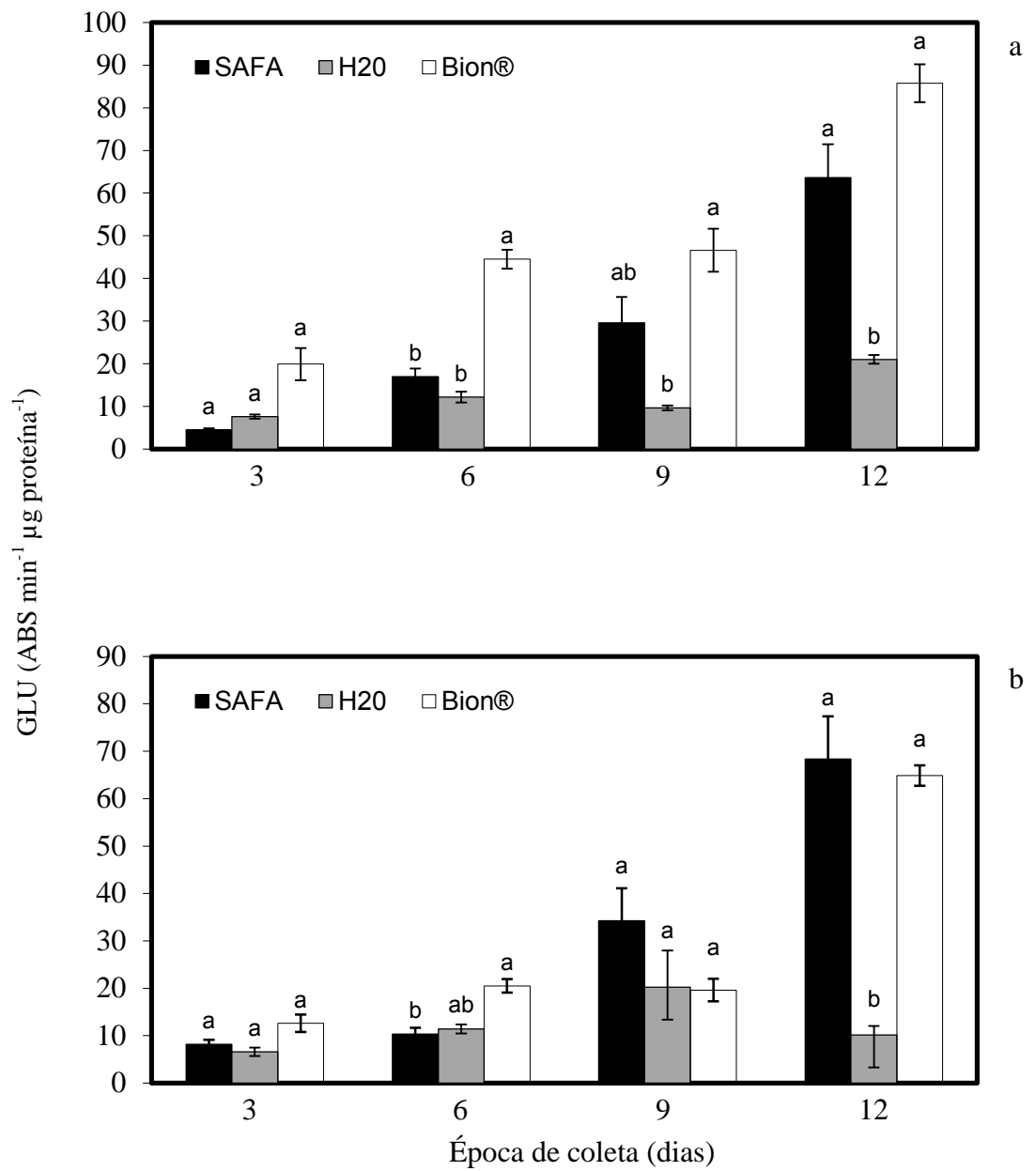


Figura 3. Atividade da β -1,3-glucanase em tomateiro tratado com a fração SAFA, H₂O e Bion®. As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($\alpha= 0,05$).

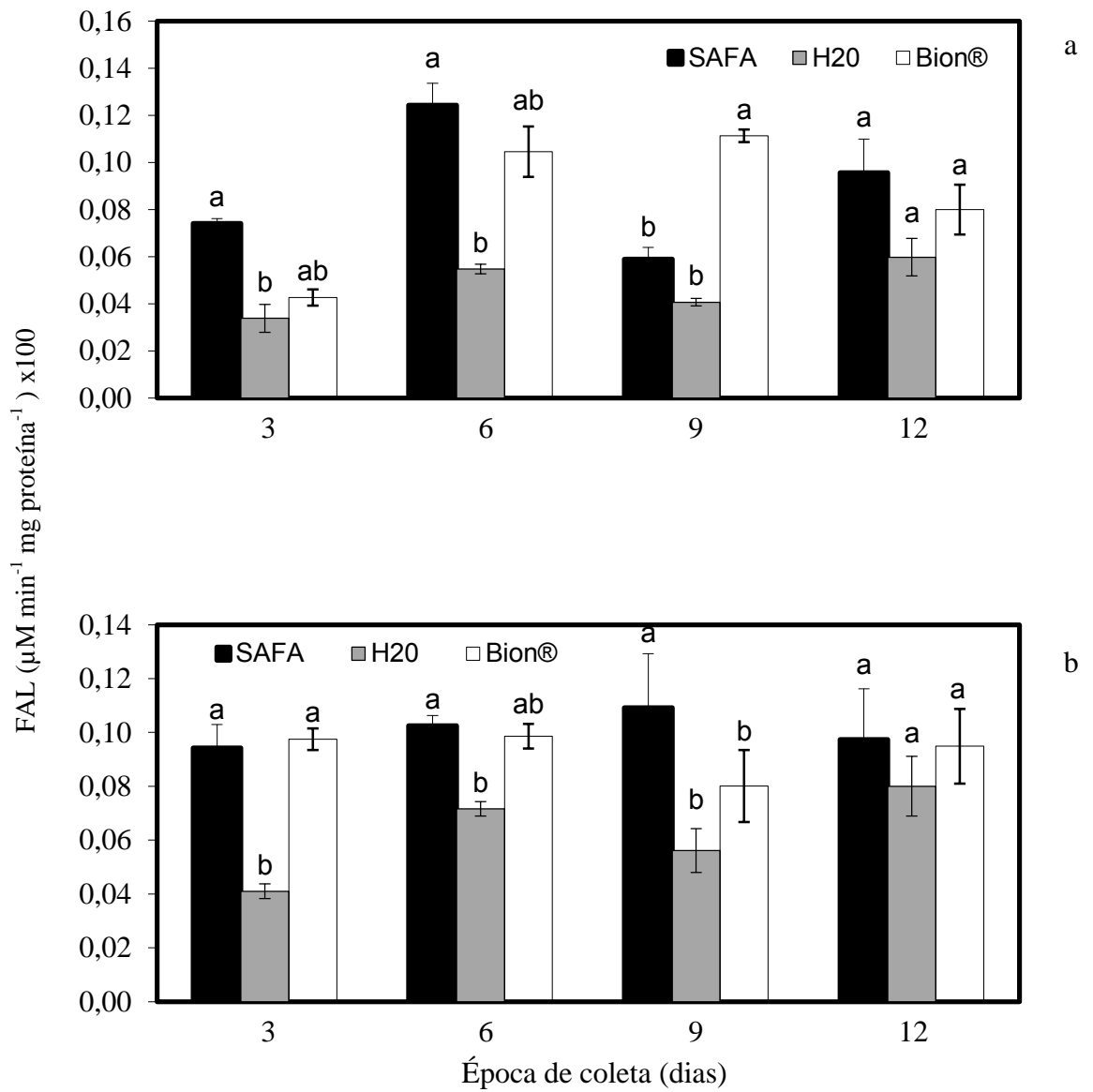


Figura 4. Atividade da fenilalanina amônia-liase em tomateiro tratado com a fração SAFA, H₂O e Bion®. As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

4. Referências Bibliográficas

Almeida ER (1993) Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos. São Paulo, p. 341.

Assis JS, Maldonado R, Muñoz T, Escribano MI, Merodio C (2001). Effect of high carbon dioxide concentration on PAL activity and phenolic contents in ripening cherimoya fruit. *Postharvest Biology and Technology* 23:33-39.

Baysal O, Soylyu EM, Soylyu S (2003) Induction of defence-related enzymes and resistance by plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant Pathology* 52:747-753.

Baysal O, Zeller W (2004) Extract of *Hedera helix* induces resistance on apple rootstock M26 similar to Acibenzolar-S-methyl against fire blight (*Erwinia amylovora*). *Physiological and Molecular Plant Pathology* 65:305-315.

Boro MC, Beriam LOS, Guzzo SD (2011) Induced resistance against *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* in passion fruit plants. *Tropical Plant Pathology* 36: 074-080.

Bradford MN (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.

Brisset MN, Cesbron S, Thomson SV, Paulin JP (2000) Acibenzolar-S-methyl induces the accumulation of defense-related enzymes in apple and protects from fire blight. *European Journal of Plant Pathology* 106:529-536.

Cahill DM, McComb JA (1992) A comparison of changes in phenylalanine ammonia-lyase activity, lignin and phenolic synthesis in the roots of *Eucalyptus calophylla* (field resistant) and *E. marginata* (susceptible) when infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 40:315-332.

Carvalho JCT, Teixeira JRM, Souza PJC, Bastos JK, Filho DS, Sarti SJ (1996) Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. *Journal of Ethnopharmacology* 53:175-178.

Cavalcanti FR, Resende MLV, Pereira RB, Costa JCB, Carvalho CPS (2006) Atividades que quitinase e beta-1,3-glucanase após eliciação das defesas do tomateiro contra a mancha-bacteriana. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41:1721-1730.

Cavalcanti FR, Resende MLV, Zacaroni AB, Ribeiro Júnior PM, Costa JCB, Souza RM (2006) Acibenzolar-S-metil e Ecolife® na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). *Fitopatologia Brasileira* 31:372-380.

Cavalcanti LS, Brunelli KR, Stargarlin JR (2005) Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: Cavalcanti LS, Di Piero RM, Cia P, Pascholati SF, Resende MLV, Romeiro RS (2005) *Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos*. Piracicaba: FEALQ. 263p.

Chance B, Maehley AC (1955) Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology* 2:764-775.

Conrath U, Pieterse CMJ, Mauch-Mani B (2002) Priming in plant-pathogen interactions. *Trends plant science* 7: 210-216.

Cseke LJ, Kirakosyan A, Kaufman PB, Warber SL, Duke JA, Brielmann HL (2006) *Natural products from plants*. 2ª. Ed. 551p.

Dixon RA (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411: 843-847.

Dowd PF, Duvick JP, Rood T (1997) Comparative toxicity of allelochemicals and their enzymatic oxidation products to maize fungal pathogens, emphasizing *Fusarium graminearum*. *Natural Toxins* 5: 180-185.

Farmacopeia Brasileira. (2010) *Substâncias farmacêuticas químicas, vegetais e biológicas*. vol.2. In: *Farmacopeia Brasileira*. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa. 5ª. Ed. pp 669-670.

Gonzalez FG, Barros SBM, Bachi EM (2004) Atividade antioxidante e perfil fitoquímico de *Caesalpinia ferrea* Mart. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 40:79.

Graves AS, Alexander SA. Managing bacterial speck and spot of tomato with acibenzolar-S-methyl in Virginia. Disponível em: <<http://www.plantmanagementnetwork.org/php>>. Acesso em: 12 dez 2012.

Hernandes L, Pereira LMS, Palazzo F, Mello JCP (2010) Wound-healing evaluation of ointment from *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) in rat skin. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences 46:431-436.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Lavoura temporária, 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas>>. Acesso em: 06 dez 2012.

INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/>. Acesso em: 17 dez 2012.

Ishige F, Mori H, Yamazaki K, Imaseki H (1993) Identification of basic glycoprotein induced by ethylene in primary leaves of azuki bean as cationic peroxidase. Plant physiology 101: 193-199.

Ji P, Momol MT, Olson SM, Pradhanang PM, Jones JB (2005) Evaluation of thymol as biofumigant for control bacterial wilt of tomato under field conditions. Plant Disease 89:497-500.

Kado CI, Heskett MG (1970) Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. Phytopathology 60:969-976.

Kagale S, Marimuthu T, Thayumanavan B, Nandakumar R, Samiyappan R (2004) Antimicrobial activity and induction of systemic resistance in rice by leaf extract of *Datura metel* against *Rhizoctonia solani* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Physiological and Molecular Plant Pathology 65: 91-100.

Kar M, Miashra D (1976) Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. Plant Physiology 57:315-319.

Lever M (1972) A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. Analytical Biochemistry 47:273-279.

Li L, Steffens JC (2002) Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. Planta 215: 239-247.

Lima JCS, Martins DTO, Souza Jr, PT (1998) Experimental evaluations of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for antiinflammatory activity. Phytotherapy Research 12:218–220.

- Lima SMA, Araújo LCC, Sitônio MM, Freitas ACC, Moura SL, Correia MTS, Malta DJN, Gonçalves-Silva T (2012) Anti-inflammatory and analgesic potencial of *Caesalpinia ferrea*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 22:169-175.
- Lopes CA, Ávila AC (2005) *Doenças do tomateiro*. Brasília: Embrapa Hortaliças. 151p.
- Louws FJ, Wilson M, Campbell HL, Cuppels DA, Jones JB, Shoemaker PB, Sahin F, Miller SA (2001) Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. *Plant Disease* 85:481-488.
- Mariconi FAM (1981) *Inseticidas e seu emprego no combate às pragas*. Vol. 1. Defensivos. São Paulo. Nobel. 5ª Ed.
- Mauch F, Mauch-Mani B, Boller T (1988) Antifungal hydrolases in pea tissue. II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3-glucanase. *Plant Physiology* 88: 936-942.
- Mauch F, Staehelin A (1989) Functional implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and β -1,3-glucanase in bean leaves. *The Plant Cell* 1: 447-457.
- Minami K, Haag HP (1989) *O tomateiro*. 2ª Ed. Campinas: Fundação Cargill. 397p.
- Morais LAS, Carmo MGF, Viegas EC, Teixeira DF, Barreta AS, Pizarro APB, Gilbert B (2002) Evaluation of Antimicrobial Activity of Extracts of Medicinal Plants on Three Tomato Phytopathogens. *Acta Horticulturae* 87-89.
- Mueller WC, Beckman CH (1974) Ultra structure of the phenol storing cells in roots of banana. *Physiological Plant Pathology* 4:187-190.
- Nicholson RL, Hammerschmidt R (1992) Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 30:369-389.
- Quiroga M, Guerrero C, Botella MA, Barceló A, Amaya I, Medina MI, Alonso FJ, Forchetti MF, Tigier H, Valpuesta V (2000) A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiology* 122: 1119-1127.
- Sangeetha G, Thangavelu R, Usha Rani S, Muthukumar A (2013) Antimicrobial activity of medicinal plants and induction of defense related compounds in banana fruits cv. Robusta against crown rot pathogens. *Biological Control* 64:16-25.

- Satya VK, Gayathiri S, Bhaskaran R, Paranidharan V, Velazhahan R (2007). Induction of systemic resistance to bacterial blight caused by *Xanthomonas campestris* pv. *Malvacearum* in cotton by leaf extract from medicinal plant zimmu (*Allium sativum* L. x *Allium cepa* L.). Archives of Phytopathology and Plant Protection 40:309-322.
- Schneider RW, Grogan RG (1977) Bacterial speck of tomato: sources of inoculum and establishment of a resident population. Phytopathology 67:388-394.
- Sequeira L (1983) Mechanisms of induced resistance in plants. Annual Review of Microbiology 37:51-79.
- Silva RF, Pascholati SF, Bedendo IP (2007) Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. Fitopatologia Brasileira 32:189-196.
- Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G (2003) Farmacognosia: da Planta ao Medicamento. 5ª. Ed. Editora UFRGS.
- Soylu EM, Soylu S, Baysal O (2003) Induction of disease resistance and antioxidant enzymes by acibenzolar-S-methyl against bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) in tomato. Journal of Plant Pathology 85: 175-181.
- Stangarlin JR, Kuhn OJ, Toledo MV, Portz RL, Schwan-Estrada KRF, Pascholati SF (2011) A defesa vegetal contra fitopatógenos. Scientia Agraria Paranaensis 10:18-46.
- Taiz I, Zeiger E (2004) Metabólitos secundários e defesa vegetal. In: Taiz, I. Zeiger, E. (eds.) SANTAREM, et al., (Tradutores). Fisiologia vegetal. 3ª. Ed. Porto Alegre-RS, Editora Artimed. pp.309 - 332.
- Takahama U, Oniki T (1992) Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolics in the apoplast of spinach leaves by ascorbate. Plant and Cell Physiology 33: 379-387.
- Tighelaar EC (1991) Botany and culture. In: Jones, J. B., Jones, J. P., Stall, R. E., Zitter, T. A. Compendium of tomato diseases. St. Paul: APS Press. pp. 2-4.
- Vallad GE, Goodman RM (2004) Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. Crop Science 44:1920-1934.

Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ (2006) Significance on inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44: 135-162.

Vasconcelos CFB, Maranhão HML, Batista TM, Carneiro EM, Ferreira F, Costa J, Soares LAL, Sá MDC, Souza TP, Wanderley AG (2011) Hypoglycaemic activity and molecular mechanisms of *Caesalpinia ferrea* Martius bark extract on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology* 137:1533-1541.

Wang Y, Bao Z, Zhu Y, Hua J (2009) Analysis of temperature modulation of plant defense against biotrophic microbes. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 22:498-506.

Zucher M (1965) Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. *Plant Physiology* 40:779-784.