

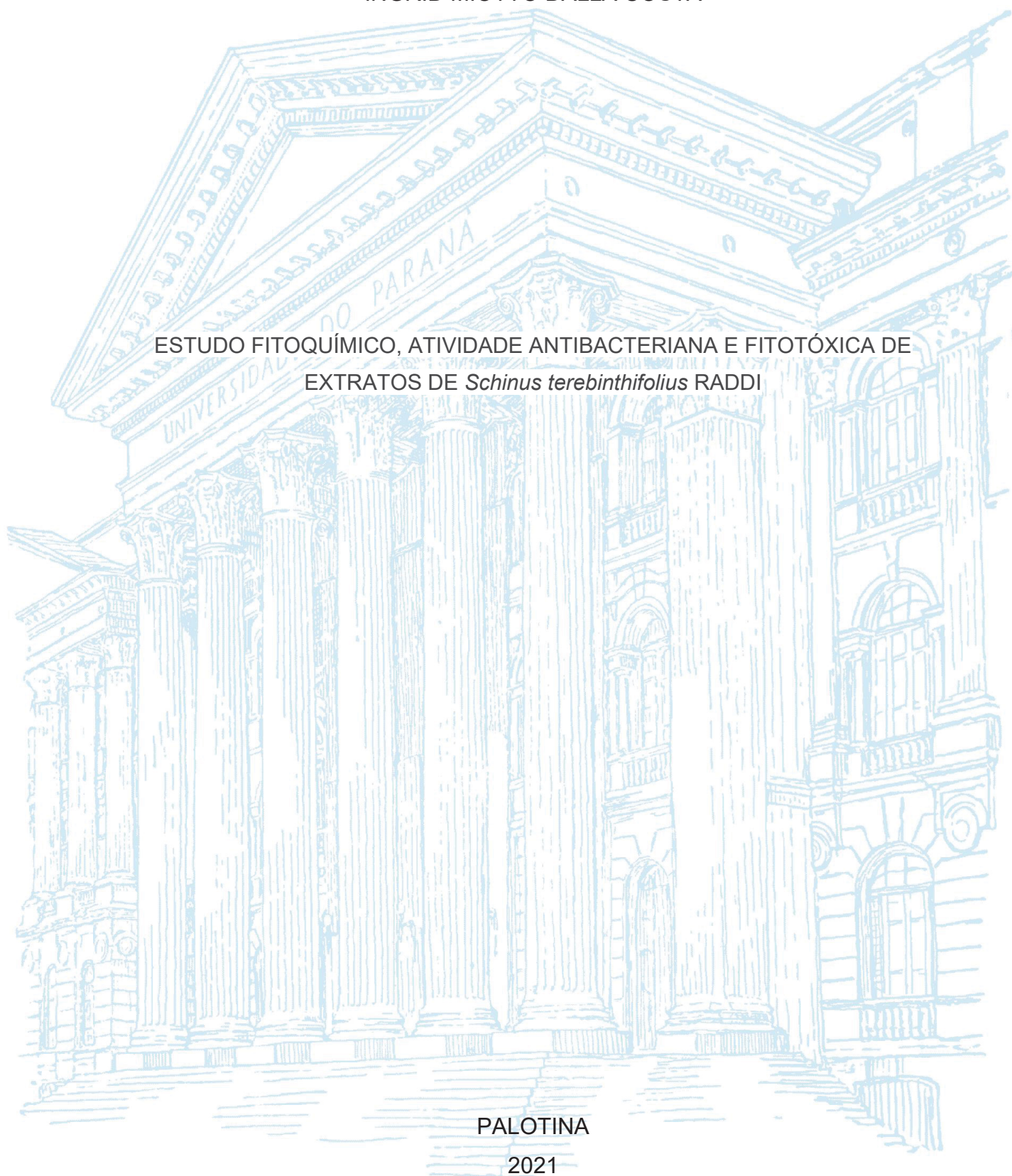
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

INGRID MIOTTO DALLA COSTA

ESTUDO FITOQUÍMICO, ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E FITOTÓXICA DE  
EXTRATOS DE *Schinus terebinthifolius* RADDI

PALOTINA

2021



INGRID MIOTTO DALLA COSTA

ESTUDO FITOQUÍMICO, ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E FITOTÓXICA DE  
EXTRATOS DE *Schinus terebinthifolius* RADDI

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia da Costa Zonetti

Coorientadora: Profa. Dra. Roberta Paulert

PALOTINA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

C837 Costa, Ingrid Miotto Dalla  
Estudo fitoquímico, atividade antibacteriana e fitotóxica de extratos de *Schinus terebinthifolius* Raddi / Ingrid Miotto Dalla Costa – Palotina, 2021.  
60f.

Orientadora: Patricia da Costa Zonetti  
Coorientadora: Roberta Paulert  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia.

1. Aroeira-vermelha. 2. *Xanthomonas vasicola*. 3. Alelopatia.  
I. Zonetti, Patricia da Costa. II. Paulert, Roberta. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDU 606



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR PALOTINA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOTECNOLOGIA -  
40001016083P6

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **INGRID MIOTTO DALLA COSTA** intitulada: **ESTUDO FITOQUÍMICO, ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E FITOTÓXICA DE EXTRATOS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi**, sob orientação da Profa. Dra. PATRICIA DA COSTA ZONETTI, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 21 de Dezembro de 2021.

Assinatura Eletrônica

21/12/2021 16:36:30.0

PATRICIA DA COSTA ZONETTI  
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

21/12/2021 15:17:33.0

ISAC GEORGE ROSSET  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

21/12/2021 15:16:06.0

ELOISA LORENZETTI TARTARO  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ)

## **Agradecimentos**

Aos meus pais pelos incentivos constantes ao meu desenvolvimento pessoal e profissional, além de todo amor que me deram durante a pós-graduação;

Ao meu namorado André pela compreensão nas horas que estive ausente, por estar presente na minha vida, me incentivando e apoiando todos os dias, especialmente nos dias que mais precisei;

Às minhas amigas Poline Wilke, Cassia R. Rambo, Júlia Bavaresco e Karen J. Haselroth, que sempre estiveram comigo, colaborando com os experimentos e me apoiando nos momentos mais difíceis;

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela oportunidade;

À minha orientadora Profa. Dra. Patricia da Costa Zonetti e minha coorientadora Profa. Dra. Roberta Paulert pela oportunidade, apoio e confiança durante o desenvolvimento deste trabalho;

A todos os profissionais da saúde que me auxiliaram a vencer esta etapa; em especial psicóloga Monithielly Regina Zamboni por todo apoio e ajuda profissional, além do incentivo e empatia recebida na terapia.

Ao IAPAR- Londrina pela amostra da bactéria utilizada neste estudo;

À CAPES pelo suporte financeiro;

À todas as pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

## RESUMO

*Schinus terebinthifolius* Raddi é uma espécie arbórea e perene pertencente à família Anacardiaceae; sendo nativa da América do Sul, especialmente Argentina, Brasil, Uruguai e Paraguai. Seu potencial como antibacteriana e antifúngica foi explorado farmacologicamente, mas são poucos os trabalhos com viés agrotecnológico. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi realizar estudo fitoquímico, atividade antibacteriana e fitotóxica de extratos de *Schinus terebinthifolius* Raddi. Foram coletadas amostras de folíolos, frutos e pecíolos+raques. A extração foi realizada pela técnica de maceração a frio com extração sequencial do material vegetal, utilizando-se três solventes por ordem de polaridade: hexano, acetato de etila e etanol. Os extratos foram caracterizados, quanto as principais classes de metabólitos secundários, através de cromatografia em camada delgada. Foram realizados dois testes antibacterianos (difusão em poços e bioautografia indireta pelo método agar-overlay) frente à *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*. Foi também realizado teste de fitotoxicidade, com extratos na concentração de 500 e 1000 ppm, sobre as sementes de *Bidens pilosa* (avaliando germinação e crescimento inicial da plântula). As extrações resultaram em 9 extratos orgânicos. Foi detectada a presença de compostos orgânicos insaturados, cumarinas e esteroides/terpenos em todos os extratos. Nos extratos hexânicos também foi detectada presença de alcaloides enquanto nos demais extratos foi detectada presença de antraquinonas e flavonoides. Nos testes antibacterianos os extratos etanólicos demonstraram maior atividade, em especial o extrato obtido dos folíolos. Nos testes fitotóxicos não foram verificadas diferenças estatísticas nas variáveis de % de germinação, IVG, massa fresca e massa seca das plântulas. A maior redução no comprimento da raiz primária foi de 47,9%, obtida pelo efeito do extrato etanólico de pecíolos+raques na concentração de 500 ppm, enquanto a maior redução do comprimento de parte aérea foi de 18,3%, obtida pelo efeito do extrato de acetato de etila dos folíolos na concentração de 1000 ppm. Os resultados mais promissores foram obtidos com os extratos etanólicos, em especial os extratos de folíolos e frutos. Este trabalho demonstrou que os extratos polares apresentaram melhores efeitos biológicos, evidenciando seu potencial como fonte de moléculas ativas.

Palavras-chave: Aroeira-vermelha. *Xanthomonas vasicola*. Picão-preto. Alelopatia.

## ABSTRACT

*Schinus terebinthifolius* Raddi is arboreal and perennial species belonging to Anacardiaceae family; being native to South America, especially Argentina, Brazil, Uruguay, and Paraguay. Its antibacterial and antifungal activity has been explored pharmacologically, but there are few works with an agronomic focus. Therefore, this work aimed to perform test to assess phytochemical, antibacterial and phytotoxic activities of extracts of *Schinus terebinthifolius* Raddi. Leaflets, fruits and stem+rachis samples were collected. Extraction was performed using cold maceration method with sequential extraction of plant material, using three solvents in order of polarity: hexane, ethyl acetate, and ethanol. Extracts were characterized, looking for different classes of secondary metabolites, through thin layer chromatography. Two antibacterial methods were performed (well diffusion method and indirect bioautography by the agar-overlay method) against *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*. Phytotoxic test was also performed, with concentrations of 500 ppm and 1000 ppm, against the weed *Bidens pilosa* (though measurements of % germination, GSI, radicle length, shoot, fresh weigh, and dry weigh. Extractions resulted in 9 organic extracts. The presence of unsaturated physical compounds, coumarins, and steroids / terpenes was detected in all the extracts. In the hexane extracts presence of alkaloids was also detected, while anthraquinones and flavonoids were detected in hexanic extracts. In antibacterial tests, ethanol extracts showed the greatest activity, especially extract from leaflets. In phytotoxic tests, no statistical differences were verified in % germination, GSI, fresh weight, and dry weight The greatest reduction in radicle length was 47.9%, obtained by effect of stem+rachis ethanol extract at 500 ppm, while the greatest reduction in shoot length was 18.3%, obtained by effect of ethyl acetate extract from leaflets at 1000 ppm. Most promising results were obtained with ethanol extracts, especially leaf and fruit extracts. This work has shown that polar extracts had better biological effects, highlighting their potential as a source of active molecules.

Keywords: Aroeira-vermelha. *Xanthomonas vasicola*. Picão-preto. Allelopathy.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – LESÕES DE <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> EM <i>Zea mays</i> .....	20
FIGURA 2 - DESENVOLVIMENTO DAS LESÕES DE ESTRIA BACTERIANA DO MILHO NO TECIDO FOLIAR DE <i>Zea mays</i> .....	20
FIGURA 3 - COMPOSTOS FENÓLICOS ISOLADOS DE <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi.....	26
FIGURA 4 - COMPOSTOS FENÓLICOS IDENTIFICADOS NOS FRUTOS DE <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi.....	26
FIGURA 5 - COMPOSTOS ENCONTRADOS EM ESPÉCIMES BRASILEIROS DE <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi.....	27
FIGURA 6 - EXEMPLAR DE <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi.....	29
FIGURA 7 – FOLHAS COM FOLÍOLOS DE <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi .....	30
FIGURA 8 - FRASCO CONTENDO FRUTOS DE <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi EM HEXANO.....	31
FIGURA 9 - FLUXOGRAMA DE OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE FOLÍOLOS, FRUTOS E PECÍOLO+RAQUE DE <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi ...	31
FIGURA 10 - DISPOSIÇÃO DOS TRATAMENTO E CONTROLES PARA O TESTE DE DIFUSÃO EM POÇOS.....	35
FIGURA 11 - ETAPAS DA BIOAUTOGRAFIA INDIRETA (AGAR OVERLAY) .....	42
FIGURA 12 - BIOAUTOGRAFIA INDIRETA (AGAR OVERLAY) DE EXTRATOS DE <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi FRENTE A <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> .....	44

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - LOCALIZAÇÃO DOS EXEMPLARES DE <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi ESTUDADOS EM TERRITÓRIO NACIONAL .....	27
QUADRO 2 - TRATAMENTOS UTILIZADOS NOS TESTES ANTIBACTERIANOS E FITOTÓXICO .....	32
QUADRO 3 - REVELADORES UTILIZADOS NA CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA PARA IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA DOS PRINCIPAIS GRUPOS DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS .....	33
QUADRO 4 - GRUPOS DE COMPOSTOS PRESENTE NOS EXTRATOS DE <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi .....	40

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - RENDIMENTO DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS DE DIFERENTES PARTE DE <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi (% M/M).....	38
TABELA 2 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS DE <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM POÇOS ...	42
TABELA 3 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS DE <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi PELO MÉTODO DE BIOAUTOGRAFIA INDIRETA (AGAR OVERLAY).....	43
TABELA 4 - VALORES MÉDIOS DE PARAMETROS DE GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO DE PLANTULA DE <i>Bidens pilosa</i> FRENTE A EXTRATOS DE DIFERENTES PARTE DE <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi NA CONCENTRAÇÃO DE 500 PPM.....	47
TABELA 5 - VALORES MÉDIOS DE PARAMETROS DE GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO DE PLANTULA DE <i>Bidens pilosa</i> FRENTE A EXTRATOS DE DIFERENTES PARTE DE <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi NA CONCENTRAÇÃO DE 1000 PPM.....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ANOVA	- Análise de variância
CCD	- Cromatografia em Camada Delgada
CV	- Coeficiente de Variação
DMSO	- Dimetilsulfóxido
IAPAR	- Instituto Agrônômico do Paraná
IVG	- Índice de Velocidade de Germinação
ppm	- Partes Por Milhão
RAS	- Regras de Análise de Sementes
RFLP	- <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SEAB	- Secretaria da Agricultura e Abastecimento
UFC	- Unidade Formadora de Colônia
UV	- Ultravioleta
Xvv	- <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> Cobb 1984

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>19</b>
3.1 <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> COBB 1894 .....	22
3.2 <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi .....	25
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
4.1 COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL .....	29
4.2 EXTRAÇÃO .....	30
4.3 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS DE <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA .....	32
4.4 TESTE ANTIBACTERIANO .....	34
4.4.1 Difusão por poços .....	34
4.4.2 Bioautografia indireta ( <i>agar-overlay</i> ) .....	35
4.5 TESTE DE FITOTOXICIDADE EM SEMENTES DE <i>Bidens pilosa</i> L. ....	36
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>38</b>
5.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS .....	38
5.2 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS DE <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA .....	39
5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA .....	41
5.3.1 Difusão em poços .....	41
5.3.2 Bioautografia indireta ( <i>agar-overlay</i> ) .....	42
5.4 TESTE DE FITOTOXICIDADE EM SEMENTES DE <i>Bidens pilosa</i> L. ....	46
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>50</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>52</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um país que se destaca na produção de alimentos, apresentando sempre necessidade de produtos inovadores, para que assim possa produzir em quantidade e qualidade suficiente para manter tanto o mercado interno quanto as exportações (CAMPOS *et al.*, 2011). Pragas e doenças podem afetar a produtividade de forma negativa, afetando o mercado interno e o externo.

Em especial a estria bacteriana do milho (*Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* Cobb) apresenta dados preocupantes quanto a severidade e incidência (BRODERS, 2017; ORTIZ-CASTRO *et al.*, 2020). Identificada no Brasil em 2016, trata-se de uma doença foliar, iniciando em lesão e progredindo para um necrose da área foliar; essa necrose pode diminuir a produção por reduzir diretamente a capacidade fotossintética (LEITE JR, 2018).

Plantas daninhas também têm afetado a agricultura, e estima-se que a perda na produção associada e essas plantas indesejadas possa ser superior a 80% em casos onde não há nenhum tipo de controle (VARGAS; ROMAN, 2006; EMBRAPA, s. d.).

O intensivo uso de agrotóxicos para o controle de doenças, pragas e plantas invasoras tem causado diversos danos de ordem ambiental, como a contaminação de alimentos, do solo e da água, resistência de plantas e patógenos a certos princípios ativos, desequilíbrio biológico e redução da biodiversidade (BETTIOL; MORANDI, 2009).

Uma alternativa aos agrotóxicos sintéticos são produtos naturais que, em sua maioria, não oferecem ameaça ao ambiente e à saúde humana. Produtos naturais podem ser aplicados diretamente na forma de extratos ou como substâncias puras extraídas de plantas, microrganismos e animais (MORAES *et al.*, 2016). Outra vantagem dos defensivos naturais sobre os sintéticos é que algumas moléculas apresentam estrutura química bastante complexa, o que torna mais difícil o organismo alvo demonstrar resistência sobre as mesmas (MORAIS; MARINHO-PRADO, 2016).

Além destes benefícios, utilizar fontes naturais para obter novos pesticidas trata de investigar inúmeros compostos ativos ainda não explorados. Vários desses compostos são produzidos por plantas, microrganismos e animais em decorrência da coevolução dos organismos produtores e suas pragas (MORAES *et al.*, 2016).

A utilização de extratos de plantas medicinais tem se demonstrado como uma importante alternativa no controle de doenças fitopatogênicas de interesse agrônômico (LIBERALLI; FRANZENER, 2013).

A alelopatia faz referência às interações químicas benéficas ou prejudiciais entre plantas. O conceito envolvido trata de que biomoléculas, classificadas como aleloquímicos, possam ser transmitidas ao meio ambiente próximo e posteriormente influenciar, tanto crescimento quanto desenvolvimento, de plantas vizinhas (RIZVI *et al.*, 1992).

Visto que, torna-se necessária à investigação de novos herbicidas que não causem tantos danos ao meio ambiente, pode-se utilizar extratos e substâncias isoladas de plantas na busca por agentes inibidores da germinação e crescimento inicial de plantas daninhas.

Os aleloquímicos provém, em sua maioria, do metabolismo secundário das plantas, que ao evoluir apresentaram efeitos inibitórios em insetos, microrganismos, vírus e outros predadores; essas substâncias têm sido utilizadas como substitutos aos herbicidas, inseticidas e nematicidas (FERREIRA; AGUILA, 2000).

A aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi) espécie arbórea e perene que tem os frutos apreciados pela culinária (pimenta-rosa) encontra-se por quase toda a América do Sul, especialmente Argentina, Brasil, Uruguai e Paraguai (DEGÁSPARI *et al.*, 2005). Seu potencial como antibacteriana e antifúngica foi explorado farmacologicamente, mas são poucos os trabalhos com viés agrônômico.

Dessa forma, podemos constatar que um estudo analisando o potencial antibacteriano, frente a um fitopatógeno, e potencial alelopático de extratos de *S. terebinthifolius* são de suma importância.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar um estudo fitoquímico, avaliar a atividade antibacteriana e fitotóxica de extratos de *Schinus terebinthifolius* Raddi.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a presença, por meio de CCD, de compostos secundários das classes: alcaloides, antraquinonas, compostos fenólicos, esteroides e taninos nos extratos de *S. terebinthifolius*;
- Verificar a atividade antibacteriana dos extratos brutos obtidos por maceração dos folíolos, pecíolos+raques e frutos de aroeira vermelha por teste de difusão de poços e bioautografia indireta (agar overlay) frente à *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*;
- Avaliar possíveis efeitos fitotóxicos dos extratos de aroeira-vermelha obtidos frente às sementes da planta daninha *Bidens pilosa* L.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

O Brasil é um país com alto poder produtivo, sendo o milho uma das principais commodities. Seu alto consumo se distribui em alimentação humana, alimentação animal e uso para produção de combustível. A produção brasileira do grão na safra de 2019/2020 foi histórica superando os 100 milhões de toneladas. De acordo com a Secretaria da Agricultura e Abastecimento – SEAB (2020) a produção mundial de milho (safra 2020/2021) será de 1,15 bilhões de toneladas, sendo a maior produção dos Estados Unidos, seguidos da China e em terceiro lugar o Brasil, com produção estimada de 105 milhões de toneladas. O Paraná ocupa lugar de destaque na produção nacional do grão ficando atrás apenas do Mato Grosso; a produção paranaense em 2020 foi de 15,2 milhões de toneladas com expectativa de produção de 18 milhões de toneladas para 2021 (SEAB, 2020).

A cultura do milho pode ser acometida por diversas doenças, em especial no Brasil as doenças foliares que mais atingem este plantio são: antracnose, cercosporiose, ferrugens, helmintosporiose, mancha-branca e mancha-de-diplodia (COTA *et al.*, 2013; CONTINI *et al.*, 2019). Em 2016 os pesquisadores do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) constataram em lavouras de milho a presença da *Xanthomons vasicola* pv. *vasculorum* (Xvv) causadora da estria bacteriana (Bacterial Leaf Streak) (LEITE JR *et al.*, 2018b).

A estria bacteriana do milho é caracterizada por infecção foliar, causando lesões estreitas de tamanho variável e com bordas onduladas (FIGURA 1a). As primeiras lesões costumemente apresentam-se próximas à nervura central das folhas e tendem a se desenvolver entre as nervuras secundárias.

Inicia em pequenas pontuações nas folhas, posteriormente progredindo para lesões alongadas e estreitas circundadas por halos de cor amarela a marrom (FIGURA 2) podendo também estar presentes nas brácteas das espigas (FIGURA 1b) (LEITE JR *et al.*, 2018a). As lesões coalescem e formam uma extensa área necrótica. Em híbridos suscetíveis estas lesões podem atingir grande extensão foliar.

Os bordos das lesões são ondulados e bem definidos, auxiliando na distinção desta frente à outras doenças de sintomas semelhantes (LEITE JR *et al.*, 2018a; ROBAINA *et al.*, 2020). Quando analisadas contra a luz as lesões causadas

pela *Xvv* apresentam coloração amarela intensa (SIVITS *et al.*, 2018). Os sintomas, nos campos de cultivo, podem iniciar em plantas jovens, sendo relatado o aparecimento nos estágios V4 e V7 (estágio vegetativo onde surge a quarta e a sétima folha, respectivamente), porém em casa de vegetação foi constatada a infecção artificial imediatamente após a emergência (BRODERS, 2017; LEITE JR *et al.*, 2018a; ORTIZ-CASTRO *et al.*, 2020).

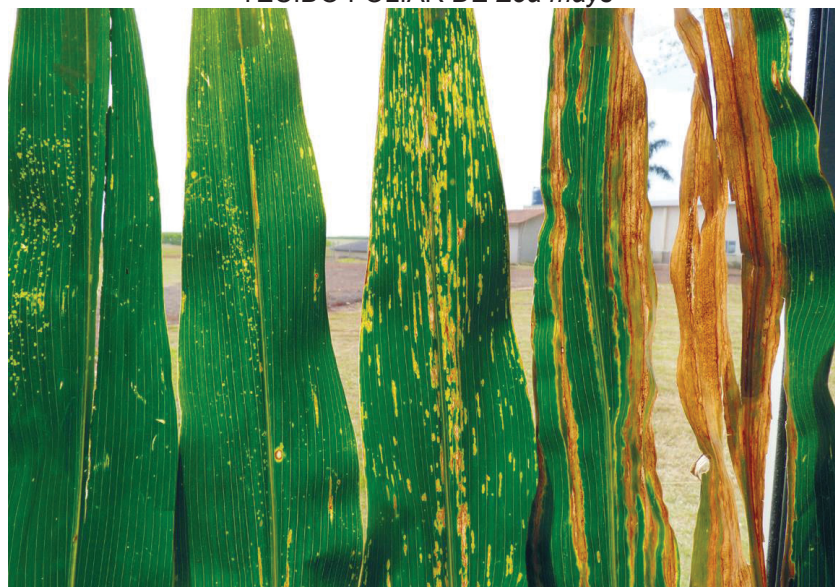
FIGURA 1 – LESÕES DE *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* EM *Zea mays*



FONTE: Leite Jr *et al.* (2018b)

LEGENDA: a) Lesões em tecido foliar; b) Lesões em brácteas

FIGURA 2 - DESENVOLVIMENTO DAS LESÕES DE ESTRIA BACTERIANA DO MILHO NO TECIDO FOLIAR DE *Zea mays*



Fonte: Leite Jr *et al.* (2018a)

A doença pode ser disseminada pela água e vento, tendo a dispersão facilitada em campos onde há irrigação (BRODERS, 2017; HARTMAN *et al.*, 2020a) situação pouco comum no Brasil, porém bastante presente nos Estados Unidos (BRODERS, 2017). Com base nos mecanismos de sobrevivência de outras bactérias do gênero *Xanthomonas*, é provável que esta bactéria sobreviva também no solo e em hospedeiros alternativos (ORTIZ-CASTRO *et al.*, 2020). Estudos desenvolvidos por Hartman e colaboradores (2020b) demonstraram que *Xv*v pode infectar, com ou sem sintomas, cerca de 18 espécies; entre elas arroz (*Oryza sativa*), aveia (*Avena sativa*), capim-massambará (*Sorghum halepense*) e junça (*Cyperus esculentus*).

Além disso “[...] exsudados bacterianos na superfície de folhas infectadas certamente servem como inóculo secundário para o desenvolvimento de doenças durante o ciclo da cultura” (LEITE JR *et al.*, 2018a, p. 13). A *Xv*v sobrevive também nos restos culturais infectados e sendo o milho plantado com frequência, estes restos tornam mais provável o desenvolvimento desta doença onde a cultura é plantada com mais frequência (HARTMAN *et al.*, 2020a).

A entrada nos tecidos é realizada através de aberturas naturais, como os estômatos, ou ferimentos (LEITE JR *et al.*, 2018a) sendo que, no milho, a bactéria permanece circundando as células no apoplasto, não se movendo por tecidos vasculares (ORTIZ-CASTRO, 2019). Não há evidências de infecção sistêmica, murcha ou morte prematura de plantas de milho causadas pela *Xv*v (SIVITS *et al.*, 2018).

Os estudos sobre incidência e severidade ainda são escassos; foi observado, nos estados americanos, em variedades suscetíveis e principalmente em campos onde há irrigação por pivô-central, incidência acima de 90% tendo a severidade atingido mais de 50% da folha (BRODERS, 2017; ORTIZ-CASTRO *et al.*, 2020). Leite Jr e colaboradores (2018a) também confirmaram no Brasil que em híbridos de milho suscetíveis as lesões podem atingir grande extensão da área foliar. Esta perda por necrose da área foliar pode diminuir a produção por reduzir a diretamente a capacidade fotossintética (LEITE JR, 2018). Alterações na qualidade do grão não foram relatadas.

Existem poucas informações sobre prevenção e controle para a estria bacteriana do milho (BRODERS, 2017), sendo atualmente recomendados métodos

padrões para controle de doenças bacterianas, como: rotação para uma cultura não hospedeira, preparo do solo, destruição de restos culturais, manejo de plantas daninhas e colheita das regiões mais infectadas por último associado à desinfestação de equipamentos (LEITE JR *et al.*, 2018a; ORTIZ-CASTRO *et al.*, 2020).

### 3.1 *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* COBB 1894

O gênero *Xanthomonas* contém bactérias gram-negativas patógenas de uma série de culturas agronômicas e espécies de plantas selvagens, porém cepas individuais geralmente causam doenças em uma gama estreita de plantas e são altamente adaptadas a seus hospedeiros (JACQUES *et al.*, 2016).

A *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (*Xvv*) é causadora da estria bacteriana no milho, doença foliar que tem preocupado agricultores, agrônomos e técnicos envolvidos com a cultura; em especial no estado do Paraná, primeiro estado brasileiro que confirmou a presença desta bactéria. Apresenta-se em forma de bastonete, gram-negativa, móvel, não fluorescente e não fermentativa (KORUS *et al.*, 2017; LEITE JR *et al.*, 2018b). Ao ser plaqueada em meio Ágar Nutriente a *Xvv* apresenta coloração amarela, típica do gênero *Xanthomonas*.

Inicialmente classificada como *X. campestris* pv. *vasculorum* por Dye no compilado de Young e colaboradores (1978) sofreu várias reclassificações. Em estudo realizado por Qhobela e Claffin (1992) foram obtidos isolados da África do Sul e África Ocidental provindos de cana-de-açúcar, palmeira e grama, ao serem testados, todos apresentaram patogenicidade para milho, sorgo e cana-de-açúcar. Entretanto Qhobela e colaboradores (1990) analisaram isolados desta bactéria provindos da África do sul que ao serem testados apresentaram patogenicidade apenas para milho e não para sorgo e cana-de-açúcar. Foi percebido assim a necessidade de distinguir estes isolados, que inicialmente aparentavam-se tratar da mesma bactéria.

Com a técnica de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), através da análise de fragmentos de restrição, foi possível distinguir este isolados da estria bacteriana do milho provindos da África do Sul dos isolados de *X. campestris* pv. *holcicola* (agente causador da estria bacteriana em sorgo) e dos isolados de *X.*

*campestris* pv. *vasculorum* da cana-de-açúcar. Foi proposta então a renomeação dos isolados de milho para *X. campestris* pv. *zeae* (QHOBELA *et al.*, 1990).

Posteriormente, a espécie *X. vasicola* foi proposta para reunir os patovares *X. campestris* pv. *holcicola*, *X. campestris* pv. *zeae* e *X. campestris* pv. *vasculorum*, com alguns isolados de cana-de-açúcar sendo classificados como *X. axonopodis* (VAUTERIN *et al.*, 1995; DOOKUN *et al.*, 2000).

Como a classificação não demonstrava ser satisfatória e sendo constatado que em milho esta espécie causava a estria bacteriana e em cana-de-açúcar a mesma espécie causava a gomose, estudos mais recentes propuseram a atual classificação de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (RADEMAKER *et al.*, 2005; ARITUA *et al.*, 2008; STUDHOLME *et al.*, 2010; HARRISON; STUDHOLME, 2014; WASUKIRA *et al.*, 2014; COUTINHO *et al.*, 2015; KARAMURA *et al.*, 2015; LANG, *et al.*, 2017). Atualmente sabe-se que existem duas estirpes de *Xvv*, uma que causa doença em cana-de-açúcar e milho e outra que causa doença apenas em milho; a estirpe brasileira, como sua semelhante africana, causa doença apenas na cultura do milho.

A espécie teve seu primeiro relato na cultura do milho (*Zea mays* L.) na África do Sul em 1949 (DYER, 1949). A partir de 2016 a *Xvv*, causando a estria bacteriana no milho, foi identificada nos Estados Unidos (estados de Nebraska, Kansas, Colorado, Iowa, Illinois, Texas, Minnesota, Dakota do Sul, Oklahoma e Wisconsin) (KORUS *et al.*, 2017; GROVES *et al.*, 2020) e na Argentina (províncias de Córdoba, Buenos Aires, Santa Fe, San Luis, Entre Ríos, Santiago del Estero, Corrientes, Chaco, Tucumán e Salta) (PLAZAS *et al.*, 2018). Recentemente foi constatada no Brasil no estado do Paraná – nas regiões Oeste: Cafelândia, Cascavel, Corbélia, Nova Aurora, Palotina, Santa Tereza do Oeste, Toledo e Ubatã, Centro-Oeste: Campo Mourão e Floresta e Norte: Assaí, Londrina, Rolândia, Sertãozinho e Mandaguari (LEITE JR *et al.*, 2018a).

A confirmação da presença de *Xvv* foi através da análise de sequências gênicas amplificadas por PCR da região 16S do rDNA (LEITE JR *et al.*, 2018a). Leite Jr e colaboradores (2018b) utilizaram os iniciadores universais fD1 e rD1 e a amostra coletada revelou 99% de similaridade genética com *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* estirpe SAM 119 (NCCPB No. 4614), isolada de milho na África do Sul.

Ainda que a introdução do patógeno na América do Norte e do Sul não esteja clara (ORTIZ-CASTRO *et al.*, 2020), estudos demonstram haver transmissão através de *Xvv* por sementes (ARIAS *et al.*, 2018; ARIAS *et al.*, 2020), o que explicaria a disseminação desta doença entre continentes.

Através de observações em campo e em casa de vegetação Ortiz-Castro e colaboradores (2020) constataram que todos os híbridos de milho comerciais são suscetíveis à estria bacteriana, porém com grande variação na severidade; já Robaina e colaboradores (2020) testaram 45 híbridos de milho tendo a severidade sido constatada entre 0.3 e 40% - 13 híbridos apresentaram severidade abaixo de 5% e foram considerados resistentes. Estudos mais precisos fazem-se necessários.

A maior parte das informações técnicas e acadêmica atuais sobre *Xvv* provém de estudos realizados nos Estados Unidos, entretanto esta doença é uma preocupação também brasileira. O clima encontrado em algumas regiões da Argentina, Estados Unidos e África do Sul onde *Xvv* foi identificada é classificado (Köppen-Geiger) como semi-árido frio (BSk) enquanto outras regiões da Argentina e nas regiões confirmadas no Brasil, o clima, é classificado como subtropical úmido (Cfa). Estas observações denotam uma adaptação climática de *Xvv*; sendo que apresentando bom desenvolvimento em clima quente e seco – com vento e chuvas periódicos (BRODERS, 2017) há o risco de se tornar rapidamente uma doença epidêmica no Paraná.

Estudos indicam que a aplicação de herbicidas contendo glifosato pode estar relacionada positivamente com o desenvolvimento da estria bacteriana do milho, como também a irrigação, baixa rotação de cultura e data do plantio (HARTMAN *et al.*, 2020a). Estudos também demonstraram que para híbridos suscetíveis, a produção pode diminuir em cerca de 50% quando afetado pela estria bacteriana.

Em fitobacterioses, um dos métodos de controle é o controle químico, utilizando-se frequentemente o uso de pulverizações foliares com compostos cúpricos (MICHEREFF, 2016). Estudos demonstram que entre alguns produtos químicos testados, os que apresentaram maiores inibições em teste *in vitro* e maiores controles *in vivo* foram os produtos cúpricos (HARTMAN, 2018; LONGHI *et al.*, 2019). Porém o cobre apresenta toxicidade, em milho, para concentrações cúpricas de 10 $\mu$ M, em especial nas folhas do estágio V3 e V4 (MOCQUOT *et al.*, 1996).

Na procura por produtos que possam ser utilizados contra essa nova ameaça ao milho brasileiro faz-se necessário explorar as práticas alternativas de controle, como o uso de substâncias providas de plantas medicinais. Óleos essenciais e extratos tem apresentado resultados promissores no controle de doenças fitopatogênicas de interesse agrônômico (BENINI *et al.*, 2010; MOURA *et al.*, 2014).

### 3.2 *Schinus terebinthifolius* Raddi

Popularmente conhecida como aroeira-vermelha, aroeira-pimenteira, pimenta brasileira, apresenta variações de nomes devido à aparência dos frutos, que lembram uma pequena pimenta rosa avermelhada (CARVALHO; JESUS, 2013).

*Schinus terebinthifolius* Raddi é uma espécie nativa da América do Sul (DEGÁSPARI *et al.*, 2005), que no Brasil está presente em toda a floresta Atlântica sendo encontrada em diferentes formações vegetais (LORENZI; MATOS, 2021).

Árvore de porte médio com 5-10 metros de altura, perenifólia, dioica de copa larga e tronco com 30-60 centímetros de diâmetro; folhas compostas imparipinadas, com 3 a 10 pares de folíolos aromáticos (com 3 a 5 centímetros de comprimento por 2 a 3 de largura) (LORENZI; MATOS, 2021). Os frutos da aroeira também são bastante apreciados na culinária, principalmente por seu sabor picante suave, o que o torna muito empregado como condimento.

Na medicina popular é utilizada como anti-inflamatório, cicatrizante, analgésico, depurativa e no tratamento de úlceras, feridas e febre (BACHI, 1986; CAVALHER-MACHADO *et al.*, 2008; LORENZI; MATOS, 2021). O uso das cascas como anti-inflamatório e cicatrizante ginecológico é relatado no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2011).

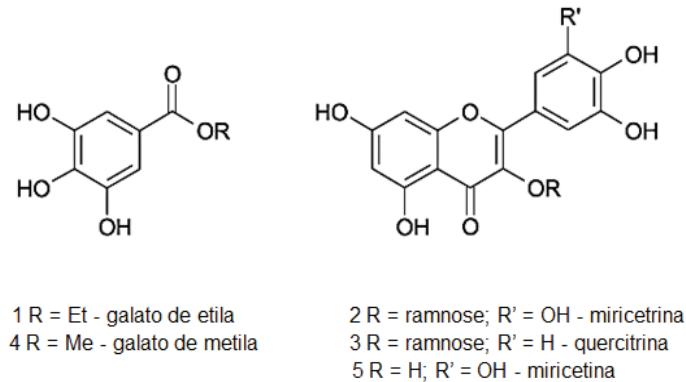
Análises fitoquímicas revelam a presença de saponinas, compostos fenólicos, taninos, antocianinas, flavonoides e triterpenos nos frutos e compostos fenólicos, flavonas e esteróides nas folhas (COSTA *et al.*, 2015; TLILI *et al.*, 2018).

Esta espécie contém óleo essencial amplamente distribuído nas suas partes vegetais, como folhas, frutos e tronco. Nos frutos e folhas foi constatado 5% de óleo essencial formado por mono e sequiterpenos (LORENZI; MATOS, 2021).

Ceruks *et al.* (2007) indicaram a presença de terpenos, terpenóides, ácidos graxos e constituintes fenólicos a partir das folhas de *S. terebinthifolius*, este estudo

conduziu o isolamento das substâncias: galato de etila e galato de metila, além dos flavonóides miricetrina, quercitrina e miricetina relatadas pelos autores como substâncias citadas pela primeira vez no gênero (FIGURA 3). A existência de compostos fenólicos, além de responsáveis pelas propriedades medicinais pode explicar a alelopatia sobre diferentes espécies vegetais.

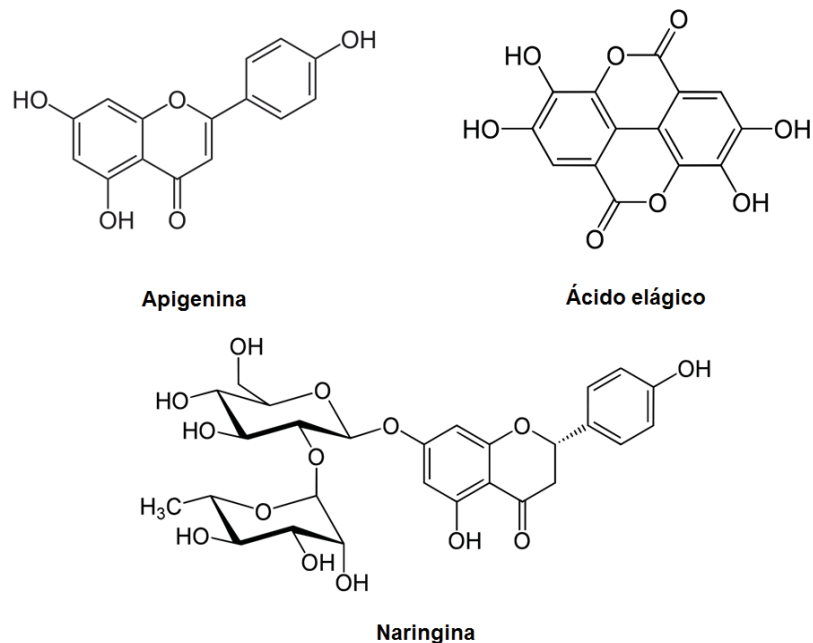
FIGURA 3 - COMPOSTOS FENÓLICOS ISOLADOS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi



FONTE: A autora (2021).

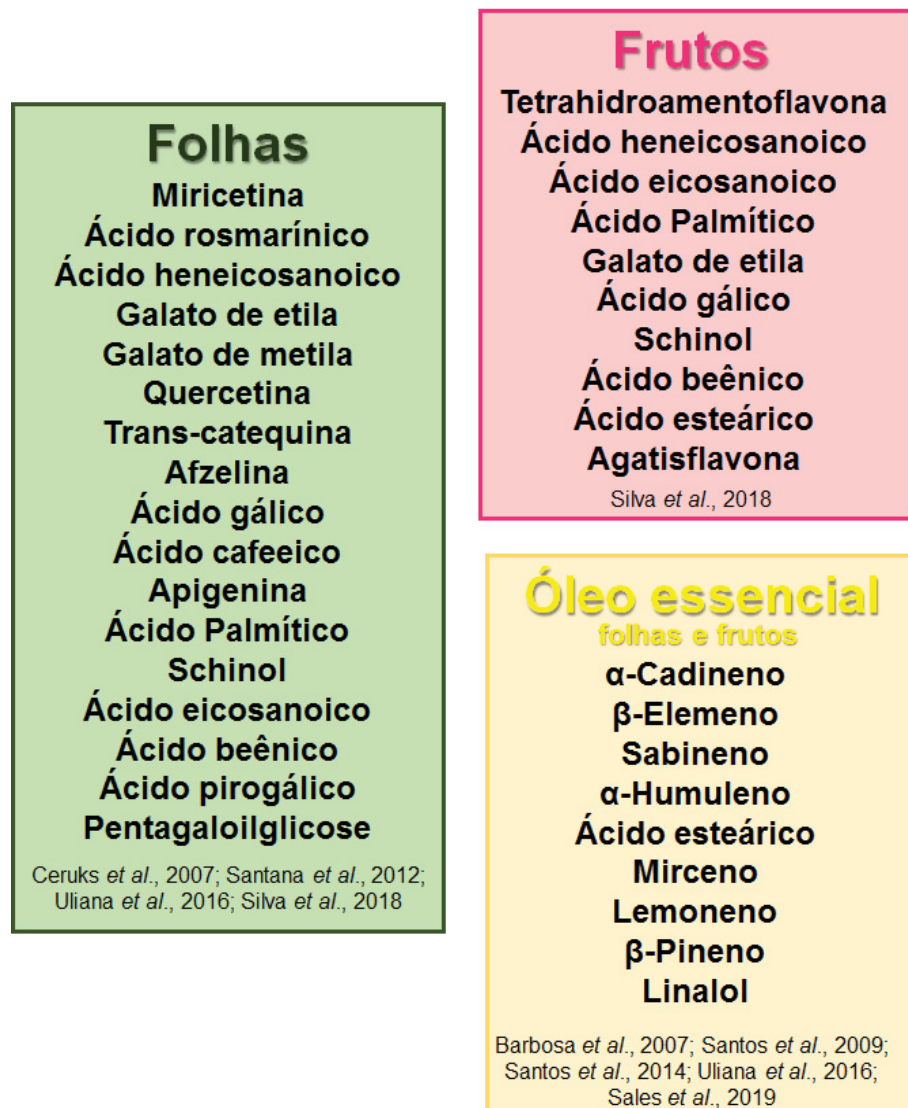
Degáspari *et al.* (2005) demonstraram haver baixo teor de flavonoides nos frutos da aroeira-vermelha quando comparado a outros vegetais estudados; no extrato etanólico foi possível identificar flavona apigenina e ácido eláfico, enquanto no extrato aquoso foi identificada flavona naringina (FIGURA 4).

FIGURA 4 - COMPOSTOS FENÓLICOS IDENTIFICADOS NOS FRUTOS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi



FONTE: A autora (2021).

FIGURA 5 - COMPOSTOS ENCONTRADOS EM ESPÉCIMES BRASILEIROS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi.



FONTE: A autora (2021).

QUADRO 1 - LOCALIZAÇÃO DOS EXEMPLARES DE *Schinus terebinthifolius* Raddi ESTUDADOS EM TERRITÓRIO NACIONAL

Referência	Cidade	Estado
Barbosa <i>et al.</i> , 2007	Viçosa	Minas Gerais
Ceruks <i>et al.</i> , 2007	São Paulo	São Paulo
Santos <i>et al.</i> , 2009	São Lourenço do Sul	Rio Grande do Sul
Santana <i>et al.</i> , 2012	Mogi-Guaçú	São Paulo
Santos <i>et al.</i> , 2014	São Cristovão	Sergipe
Uliana <i>et al.</i> , 2016	Vitória	Espírito Santo
Silva <i>et al.</i> , 2018	Vitória	Espírito Santo
Sales <i>et al.</i> , 2019	Pedro Canário	Espírito Santo

FONTE: A Autora (2021).

O óleo essencial de *S. terebinthifolius* tem sido amplamente testado frente à fungos fitopatogênicos. Apresentou atividade antifúngica contra *Alternaria alternata*, *A. solani*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Septoria lycopersici*, *Stemphylium solani* (BADAWY; ABDELGALEIL, 2014; SANTOS *et al.*, 2014; TOMAZONI *et al.*, 2017). Já o seu potencial contra bactérias fitopatogênicas foi pouco explorado, limitando-se a estudos frente à *Agrobacterium tumefaciens*, *Clavibacter michiganensis*, *Erwinia carotovora* var. *carotovora*, *Pseudomonas savastanoi*, *P. syringae* pv. *phaseolicola* e *Xanthomonas campestris* – apresentando atividade antibacteriana apenas contra *C. michiganensis*, *E. carotovora* var. *carotovora* e *X. campestris* (BADAWY; ABDELGALEIL, 2014; ELSHAFIE *et al.*, 2016).

Alguns estudos da atividade alelopática foram desenvolvidos utilizando *S. terebinthifolius* Raddi, porém restringiram-se ao uso dos extratos aquosos ou orgânicos das folhas e flores, e em sua maioria utilizando sementes de alface como planta-teste (MORGAN; OVERHOLT, 2005; FONSECA *et al.*, 2016; NUNES *et al.*, 2019; BITENCOURT *et al.*, 2021).

A maior parte dos trabalhos publicados da planta *S. terebinthifolius* são dedicados aos estudos com óleo essencial e suas atividades biológicas. Assim percebe-se que *S. terebinthifolius* foi pouco explorada no meio agrônômico, sendo necessário avaliar propriedades fitoquímicas e biológicas de extratos de diferentes partes desta espécie.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fisiologia e Nutrição de Plantas, no Laboratório de Micologia e Plantas Medicinais e no Laboratório de Química Orgânica da Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina.

### 4.1 COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL

As folhas e os frutos foram coletados, durante os meses de outubro e novembro de 2019, de uma única planta (FIGURAS 6 e 7) de aroeira-vermelha localizada na Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, na cidade de Palotina (PR), latitude -24.294253 (S), longitude -53.843064 (O). O material vegetal foi coletado no início da manhã ou final da tarde, quando a planta se encontrava com frutos maduros. A cidade de Palotina possui clima subtropical úmido (Cfa - classificação climática de Köppen) (NITSCHKE *et al.*, 2019).

FIGURA 6 - EXEMPLAR DE *Schinus terebinthifolius* Raddi



FONTE: A autora (2021).

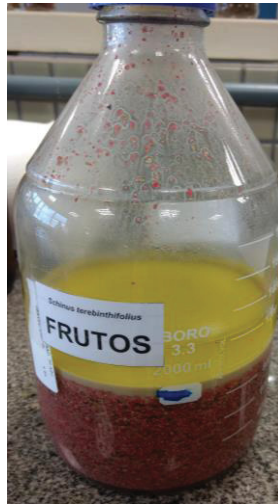
FIGURA 7 – FOLHAS COM FOLÍOLOS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi

FONTE: A autora (2021).

Os folíolos foram separados e os pecíolos foram mantidos com as raques, desta forma, os materiais vegetais ficaram divididos em: folíolos (Fo), frutos (Fr) e pecíolos+raques (PR). Os materiais vegetais foram secos à 40°C por 5 dias em estufa com circulação forçada de ar. Após a secagem, os frutos foram diretamente armazenados enquanto os folíolos e pecíolos+raques foram previamente triturados até a obtenção de um pó fino e armazenados em local seco protegido da luz.

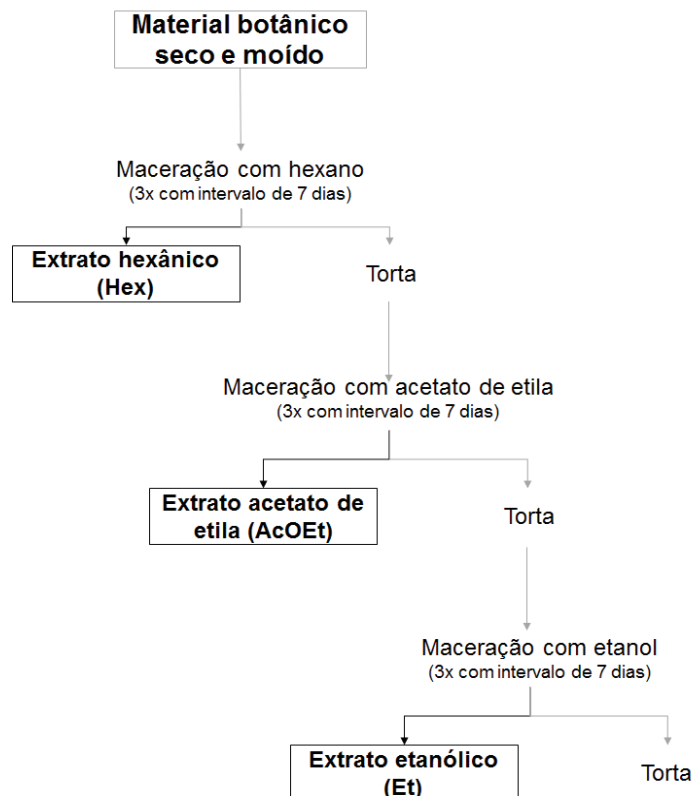
#### 4.2 EXTRAÇÃO

As amostras secas e trituradas de folíolos, pecíolos+raques e frutos foram utilizadas para a extração com solventes orgânicos, sendo utilizados 916,973 g de folíolos, 555,431 g de frutos e 289,278 g de pecíolos+raques. Os materiais vegetais foram acondicionados em frascos de vidro com tampa, o solvente foi adicionado até a cobertura total e permaneceu em local protegido da luz com agitação manual diária (FIGURA 8). A extração foi realizada pela técnica de maceração a frio com extração sequencial do material vegetal (FIGURA 9). Foram utilizados três solventes por ordem de polaridade: hexano, acetato de etila e etanol, sendo a polaridade relativa de 0,009, 0,228 e 0,654 respectivamente. O solvente foi renovado a cada sete dias, totalizando 21 dias de maceração. A torta remanescente da extração com cada solvente foi usada para a extração subsequente com outro solvente (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

FIGURA 8 - FRASCO CONTENDO FRUTOS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi EM HEXANO

FONTE: A autora (2021).

Ao final do período de maceração, o material vegetal foi filtrado e o solvente foi removido em rotaevaporador sob vácuo com a temperatura de 45°C. O extrato obtido permaneceu em dessecador por 5 dias e posteriormente foi congelado, em freezer comum, até o uso.

FIGURA 9 - FLUXOGRAMA DE OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE FOLÍOLOS, FRUTOS E PECÍOLO+RAQUE DE *Schinus terebinthifolius* Raddi

FONTE: A autora (2021).

Foram obtidos nove extratos (três de cada parte da planta) que constituíram os tratamentos (T1 a T9) para os testes biológicos como descritos no QUADRO 2:

QUADRO 2 - TRATAMENTOS UTILIZADOS NOS TESTES ANTIBACTERIANOS E FITOTÓXICO

Tratamentos		Solvente utilizado na extração	Parte vegetal
T1	Hex – Fo	Hexano	Folíolos
T2	Hex – PR		Pecíolos + Raques
T3	Hex – Fr		Frutos
T4	AcOEt – Fo	Acetato de Etila	Folíolos
T5	AcOEt – PR		Pecíolos + Raques
T6	AcOEt – Fr		Frutos
T7	Et – Fo	Etanol	Folíolos
T8	Et – PR		Pecíolos + Raques
T9	Et – Fr		Frutos
T10	Água destilada(controle)	-	-

FONTE: A autora (2021).

O rendimento de cada extrato foi calculado pela razão entre o peso do extrato e o peso da massa utilizada no início do processo de extração.

#### 4.3 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi POR CROMATOGRÁFIA EM CAMADA DELGADA

Com o objetivo de identificar os grupos de metabólitos secundários presentes nos extratos que demonstraram atividade alelopática foi realizada a técnica de cromatografia em camada delgada (CCD).

Foram pesados 50 mg de cada um dos extratos e dissolvidos em 500 µL do solvente utilizado na extração. Foram usadas cromatoplasas de alumínio revestidas com sílica gel com indicador fluorescente (Macherey Nagel® UV<sub>254</sub>), cortadas em retângulos de 5 cm de largura por 7,5 cm de altura. Os extratos foram aplicados com auxílio de capilar de vidro a 1 cm das bordas da placa e com 1,5 cm entre os pontos de aplicação.

A fase móvel foi colocada no fundo da cuba cromatográfica por tempo suficiente para a saturação da atmosfera interior. A fase móvel foi colocada no fundo da cuba cromatográfica por tempo suficiente para a saturação da atmosfera interior. As fases móveis foram escolhidas conforme a polaridade dos extratos e preliminarmente foram testadas para confirmar a separação dos compostos. Para os extratos hexânicos foi utilizado hexano:acetato de etila (1:1), para os extratos de

acetato de etila foi usada a mistura de acetato de etila:hexano (9:1) e para os extratos etanólicos utilizou-se acetona:etanol (1:1).

Após a aplicação dos extratos na cromatoplaça, e secagem do solvente, as placas foram colocadas de forma vertical na cuba cromatográfica contendo a fase móvel. A corrida cromatográfica foi desenvolvida até que a fase móvel atingisse aproximadamente 6,5 cm de altura. A placa foi então retirada da cuba e deixada em circulação de ar para evaporação completa da fase móvel.

Para a visualização dos grupos de compostos secundários foram utilizados reveladores específicos, descritos no QUADRO 3.

QUADRO 3 - REVELADORES UTILIZADOS NA CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA PARA IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA DOS PRINCIPAIS GRUPOS DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

GRUPO DE MOLÉCULAS	REVELADOR	RESULTADO
Alcaloides	Reagente de Dragendorff	Manchas alaranjado forte
Antraquinonas	Hidróxido de potássio 5% (m/v) em etanol	Manchas vermelhas
Compostos Orgânicos Insaturados	Vapores de iodo	Manchas marrons
Cumarinas	Hidróxido de potássio 1% (m/v) em etanol	Manchas azuis ou verdes (UV)
Esteroides/Terpenos	Anisaldeído sulfúrico	Manchas rosas ou violetas
Flavonoides	Cloreto férrico 5% (m/v) em água destilada	Fluorescência (UV)
Taninos	Cloreto férrico 2% (m/v) em etanol	Manchas azuis para taninos hidrolisáveis, manchas verdes para taninos condensados e manchas marrons para compostos fenólicos.

FONTE: adaptado de SWIECH (2018) e NEGRI e DUARTE-ALMEIDA (2011).

#### 4.4 TESTE ANTIBACTERIANO

O teste de inibição de crescimento microbiano foi realizado pelas metodologias: difusão em ágar por poços e bioautografia indireta adaptadas de Valgas *et al.* (2007).

O microrganismo testado foi *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (X.v.v.). Culturas puras de X.v.v. foram obtidas do Laboratório de Bacteriologia e Diagnóstico em Fitossanidade do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) de Londrina-PR. O isolado bacteriano foi mantido em solução salina estéril (0,9% m/v), refrigerada à 4°C, até o início dos experimentos.

Ao início dos testes antibacterianos o isolado de X.v.v. foi incubado em caldo nutriente a 28°C por 48 horas. Após o crescimento, as suspensões dos microrganismos foram transferidas para placas com meio ágar nutriente e incubadas nas mesmas condições anteriores. O inóculo foi preparado através do método de suspensão direta de colônias em solução salina estéril (0,9% m/v) na concentração de 108 UFC/mL (turbidez medida por comparação ao tubo 0,5 da escala McFarland).

##### 4.4.1 Difusão por poços

O teste de difusão foi realizado com o objetivo de avaliar alguma ação antibacteriana dos extratos de *Schinus terebinthifolius* Raddi frente a bactéria fitopatogênica *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*.

Para realização do teste foi utilizado o meio de cultura ágar nutriente (caldo nutriente (KASVI) e ágar bacteriológico (Dinâmica)), devidamente preparado conforme as recomendações do fabricante.

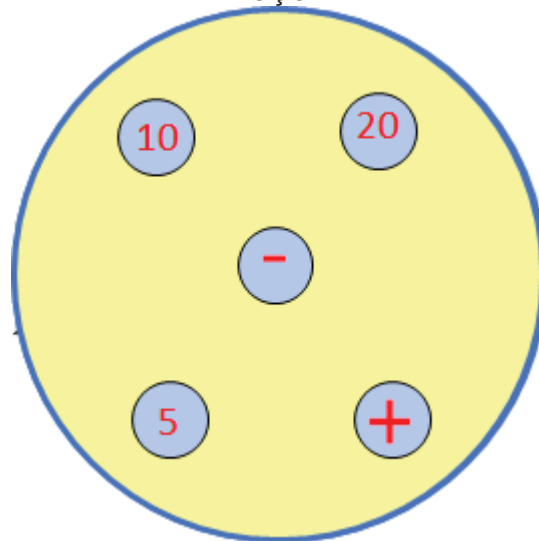
O inóculo foi aplicado sobre toda a superfície do meio solidificado com auxílio de swab estéril; as placas foram mantidas abertas até a secagem do inóculo e após, foram perfurados cinco poços com 10 mm de diâmetro em cada placa.

Foram pesados 20 mg de cada um dos extratos e diluídos em 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e cada solução foi acrescida de água destilada até completar 1 mL. A partir da solução inicial de 20 mg.mL<sup>-1</sup> foi realizada a diluição seriada obtendo as soluções de concentrações 10 mg.mL<sup>-1</sup> e 5 mg.mL<sup>-1</sup>.

Para o controle positivo foi utilizada gentamicina (Vansil®) na concentração de  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  (diluída em água destilada) e para controle negativo foi utilizado o mesmo diluente dos extratos (DMSO:água destilada 1:4).

Cada poço da placa recebeu  $40 \mu\text{L}$  das diluições dos extratos, além de  $40 \mu\text{L}$  do controle positivo e  $40 \mu\text{L}$  do controle. A disposição dos tratamentos e controle podem ser visualizados na FIGURA 10. O experimento foi conduzido em quadruplicata e mantido em estufa bacteriológica à  $28^\circ\text{C}$ .

FIGURA 10 - DISPOSIÇÃO DOS TRATAMENTO E CONTROLES PARA O TESTE DE DIFUSÃO EM POÇOS



Fonte: A autora (2021).

Após 48 horas de incubação, foram analisados os halos de inibição com o auxílio de régua milimetrada e a medida foi realizada a partir do ponto onde o crescimento da bactéria diminuía abruptamente (VALGAS *et al.*, 2007).

#### 4.4.2 Bioautografia indireta (agar-*overlay*)

Para uma detecção mais sensível da atividade antibacteriana dos extratos e seus constituintes foi realizada a bioautografia indireta pela técnica de agar-*overlay* (também chamada de ágar-difusão). Foram utilizadas placas de CCD onde realizou-se a cromatografia em camada delgada conforme descrito no ítem 4.3 sem a aplicação de reveladores. Também foram utilizadas placas de CCD onde os extratos foram aplicados ( $5 \times 5 \text{ cm}$ ), mas a corrida cromatografia não foi realizada com solventes.

A metodologia seguiu os procedimentos descritos por Valle-Jr e colaboradores (2016) com modificações. O inóculo foi preparado conforme item 4.4 e foi utilizado um mL do inóculo para cada 9 mL do ágar nutriente.

As cromatoplasmas contendo os extratos foram colocadas dentro de placas de Petri estéreis e sobre as mesmas foi aplicado 10 mL do meio de cultura contendo a bactéria (“*pour-plate*”). As placas ficaram abertas até a solidificação do meio e posteriormente incubadas em estufa a 28°C por 48 h. Para a visualização das áreas com inibição do crescimento bacteriano foi aspergido sobre as placas uma solução de azul de nitrotetrazólio 2,5 mg.mL<sup>-1</sup> diluído em etanol absoluto (ROSENBERGER, 2018). As placas foram novamente incubadas a 28°C por 3 h até a visualização de cor azul intenso.

Nas placas sem desenvolvimento da cromatografia, o halo de inibição foi considerado como a média de cinco medições em diferentes ângulos, partindo-se da borda do ponto de aplicação do extrato, até o ponto onde havia a mudança de coloração produzida pela presença do revelador.

#### 4.5 TESTE DE FITOTOXICIDADE EM SEMENTES DE *Bidens pilosa* L.

Foi avaliado o potencial dos extratos em inibir a germinação e o crescimento inicial de plântulas de picão-preto (*Bidens pilosa* L.). As sementes foram adquiridas comercialmente da empresa Agro Cosmos e armazenadas em geladeira até o uso.

Os extratos foram avaliados nas concentrações de 500 e 1000ppm. A concentração de 500 ppm foi obtida pesando, separadamente, 25 mg de cada extrato em um becker e o mesmo foi solubilizada com 25 mL de metanol e distribuído 5 mL em cada repetição (placa gerbox). A concentração de 1000 ppm foi obtida pesando, separadamente, 50 mg de cada extrato em um becker e o mesmo foi solubilizado com 25 mL de metanol, distribuindo-se posteriormente 5 mL em cada repetição.

Como unidade experimental foram utilizadas caixas transparentes do tipo gerbox, onde foram colocadas 2 folhas de papel germitest. Após a adição de 5 mL de cada tratamento correspondente, estas foram mantidas abertas até a evaporação do solvente por 24 horas. Como controle foi utilizado 5 mL de água destilada.

Em seguida foi adicionado 10 mL de água destilada em cada caixa gerbox e distribuídas 50 sementes de *Bidens pilosa*, previamente desinfestadas hipoclorito de sódio e lavadas em água corrente.

O experimento foi conduzido em estufa de crescimento vegetal tipo B.O.D. com regime fotoperiódico de 8 horas de luz a 30°C e 16 horas de escuro a 20°C. Os experimentos foram realizados em quintuplicata.

Após instalado o teste as sementes germinadas foram quantificadas a cada 24 horas e após 4 dias foi obtida a porcentagem de germinação (%G) e o índice de velocidade de germinação (IVG). Também no 4º dia foram medidos para avaliação de crescimento: comprimento de parte aérea, comprimento de raiz primária com auxílio de régua, massa fresca da plântula em balança analítica. Após as avaliações as plântulas foram secas em estufa com circulação de ar a 45°C por 48 horas e após resfriadas foram pesadas para obter-se o valor de massa seca.

A %G foi obtida de acordo com as Regras de Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009) através da razão entre a somatória do número de sementes germinadas e o total de sementes em cada caixa; o IVG foi obtido de acordo com Maguire (1962) utilizando-se da equação:

$$IVG = \frac{G_1}{N_1} + \frac{G_2}{N_2} + \dots + \frac{G_n}{N_n}$$

onde:

IVG: Índice de Velocidade de Germinação

$G_1, G_2, \dots, G_n$ : Número de sementes germinadas a cada dia

$N_1, N_2, \dots, N_n$ : Número de dias desde o início do teste

Os dados de IVG, porcentagem de germinação, comprimento da raiz primária, comprimento de parte aérea, massa fresca e massa seca por plântula foram submetidos análise de variância (ANOVA) e teste de agrupamento de médias Scott-Knott (SCOTT; KNOTT, 1974) a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ), através do software Sisvar (FERREIRA, 2014).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

A extração tem por objetivo retirar as substâncias contidas na droga vegetal, da forma mais seletiva e completa possível, utilizando um líquido ou mistura de líquidos apropriados (NEGRÍ; DUARTE-ALMEIDA, 2011). Foram escolhidos três solventes com diferentes polaridades: hexano (apolar), acetato de etila (média polaridade) e etanol (maior polaridade). Este aumento sequencial da polaridade permitiu aumentar o poder de arraste de substâncias apolares. A extração sequencial também possibilitou obter um perfil químico mais completo de cada parte da planta estudada, já que um único solvente não é capaz de extrair todas as classes de compostos secundários.

As extrações resultaram em nove extratos, três para cada parte da planta. As amostras de folíolos resultaram em extratos de coloração verde intensa, característica para alta concentração de clorofila, e de textura viscosa. Os extratos hexânicos e etanólicos de pecíolos+raque apresentaram semelhança com os extratos de folíolos: coloração verde escura intensa e textura viscosa. Já o extrato de acetato de etila de pecíolos+raque apresentou aspecto opaco, de cor verde clara e textura sólida quebradiça. Todos os extratos de frutos apresentaram-se oleosos com odor similar, forte e característico, especialmente o extrato hexânico; os extratos de acetato de etila e etanol apresentaram coloração levemente avermelhada enquanto o extrato hexânico apresentou coloração mais amarelada. Todos os extratos etanólicos apresentaram textura de pasta semissólida. Os rendimentos dos extratos obtidos podem ser observados na TABELA 1.

TABELA 1 - RENDIMENTO DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS DE DIFERENTES PARTE DE *Schinus terebinthifolius* Raddi (% m/m)

Solvente	Partes da planta		
	Folíolos	Pecíolos+Raque	Frutos
Hexano	<b>7,41%</b> (67,99 g)	<b>5,87%</b> (16,98 g)	<b>19,58%</b> (108,78 g)
Acetato de Etila	<b>6,31%</b> (57,84 g)	<b>3,14%</b> (10,09 g)	<b>6,61%</b> (36,71 g)
Etanol	<b>8,84%</b> (81,06 g)	<b>12,40%</b> (35,88 g)	<b>9,12%</b> (50,64 g)
Total	<b>22,56%</b> (206,89 g)	<b>21,41%</b> (62,95%)	<b>35,31%</b> (124,51 g)

FONTE: A autora (2021).

O solvente com maior poder extrativo dos materiais vegetais constituídos de folíolos e pecíolos+raques foi o etanol. Para os frutos, a maior fração extraída foi obtida com hexano, solvente capaz de extrair óleos, ceras, esteróis, pigmentos e outras substâncias polares (ZUANAZZI; MONTANHA; ZUCOLOTTO, 2017).

O maior rendimento foi obtido no extrato dos frutos (19,58% com hexano). O rendimento da extração com etanol foi diferentemente observado por Costa e colaboradores (2015), os quais conseguiram maior massa obtida, por maceração, nas folhas que nos frutos; sendo que apenas no presente trabalho a raque foi separada dos folíolos, o que influenciou na diferença entre os estudos. Também é válido citar que o perfil fitoquímico pode variar conforme o espécime analisado, época do ano, condições do cultivo e fatores ambientais (NESELLO *et al.*, 2005).

## 5.2 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Extratos brutos obtidos através de matéria-prima vegetal são preparações complexas derivadas do metabolismo primário e secundário. A prospecção fitoquímica é essencial na separação dos constituintes químicos de extratos vegetais, podendo ser empregada também na identificação de grupos de metabólitos secundários.

Após o desenvolvimento da CCD foram visíveis, a olho nu, manchas coloridas, sendo que todos os extratos de folíolos e pecíolos+raques apresentaram manchas amarelas e verdes. O extrato hexânico dos frutos não apresentou mancha visível, já os demais extratos apresentaram manchas amareladas. Todas as manchas foram visíveis na luz UV e o extrato hexânico dos frutos que anteriormente não apresentava manchas apresentou uma mancha quando visualizado na luz UV.

A análise fitoquímica por CCD dos extratos demonstrou a presença de alguns grupos de substâncias derivadas do metabolismo secundário, em especial: cumarinas e esteroides/terpenos. As composições dos extratos de *S. terebinthifolius* Raddi, variaram com relação à parte vegetal e solvente utilizado. Os resultados obtidos estão demonstrados no QUADRO 4.

Para a visualização de alcaloides foi utilizado o teste de Dragendorff e pelo menos uma das partes da planta, em cada tipo de extrato, evidenciou a presença desta classe de composto secundário.

Apenas os extratos etanólicos demonstraram presença de antraquinonas. A visualização deste composto depende da reação de Bornträger onde a alcalinização das antraquinonas resulta na coloração vermelha ou rosa. Este resultado diverge com o obtido por Scheid (2014) que visualizou antraquinonas em todas as frações obtidas as folhas de *S. terebinthifolius* Raddi (extrato hexânico, de diclorometano, de acetato de etila e metanólico).

Em todos os extratos mostraram-se presentes as cumarinas, uma classe de composto fenólico, detectada sob luz UV após aplicação de solução alcalina. A função das cumarinas está relacionada com o mecanismo de defesa das plantas contra herbívoros e microrganismos (MATOS *et al.*, 2014).

Flavonoides estavam presentes em quase todos os extratos, com exceção dos extratos hexânicos e de acetato de etila dos frutos. Várias funções podem ser atribuídas aos flavonoides como: proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias, e atração de animais com finalidade de polinização. Flavonoides como rutina, ácido elágico, apigenina e quercetina já foram identificados nesta espécie (BERNARDES, 2010).

QUADRO 4 - GRUPOS DE COMPOSTOS PRESENTE NOS EXTRATOS DE *Schinus terebinthifolius* RADDI.

Extrato		ALC	ANT	INS	CF	CUM	E/T	FLA	TC	TH
<b>Hexano</b>	Fo	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	PR	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	Fr	+	-	+	-	+	+	-	-	-
<b>Acetato de Etila</b>	Fo	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	PR	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	Fr	+	-	+	+	+	+	-	-	-
<b>Etanol</b>	Fo	-	+	+	+	+	+	+	-	+
	PR	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	Fr	-	+	+	+	+	+	+	-	+

FONTE: A autora (2021).

LEGENDA: ALC: Alcaloides, ANT: Antraquinonas, INS: Compostos Orgânicos Insaturados, CF: Compostos Fenólicos, CUM: Cumarinas, E/T: Esteroides e Terpenos, FLA: Flavonoides e TC: Taninos Condensados, TH: Taninos Hidrolisáveis, Fo: Folíolos, PR: Pecíolos+Raques e Fr: Frutos. (+) presença do metabólito e (-) ausência do metabólito.

Taninos, uma das classes de compostos fenólicos, estavam presentes na maioria dos extratos, sendo apenas os extratos hexânicos e de acetato de etila dos frutos que não apresentarem ao menos um destes compostos.

Todos os extratos apresentaram compostos insaturados, esteroides e terpenos. Os compostos insaturados são revelados através da incubação das placas em câmara saturada com vapores de iodo. O iodo é um revelador geral, forma manchas marrons com todo tipo de compostos insaturados.

Os resultados obtidos de todos os extratos de folíolos e pecíolo+raque foram semelhantes, diferindo apenas em alcaloides e compostos fenólicos.

Os perfis dos extratos hexânicos e de acetato de etila dos frutos foram semelhantes, diferindo apenas em compostos fenólicos.

Os extratos etanólicos apresentaram a maior quantidade de grupos de metabólitos secundários. o que pode estar relacionado com as características do solvente de extração. O extrato que apresentou menor quantidade de grupos de metabólitos secundários foi o extrato hexânico dos frutos.

O perfil fitoquímico obtido do extrato etanólico também foi observado por Bitencourt e colaboradores (2021), onde foi possível observar uma alta concentração de flavonoides, terpenos, taninos, antocianinas e heterosídeos cardioativos. Costa e colaboradores (2015) também observaram no extrato etanólico de *S. terebinthifolius* a presença de compostos fenólicos e ausência total de taninos condensados, porém não observaram flavonoides.

### 5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

#### 5.3.1 Difusão em poços

A avaliação do método de difusão em poços é comparativa frente a um controle positivo e a zona ou o halo de inibição de crescimento é medida partindo-se da circunferência do disco ou poço, até a margem onde há crescimento de microrganismos. Como controle positivo, empregou-se a gentamicina (um quimioterápico padrão), e como controle negativo o solvente utilizado para a dissolução dos extratos.

A avaliação da inibição do crescimento de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* frente a diferentes concentrações dos extratos obtidos de diferentes partes de *Schinus terebinthifolius* está exposta na TABELA 2:

TABELA 2 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM POÇOS

Extratos		Concentração			Gentamicina 0,1 mg.mL <sup>-1</sup>
		5 mg.mL <sup>-1</sup>	10 mg.mL <sup>-1</sup>	20 mg.mL <sup>-1</sup>	
Hexano	Fo	-	-	-	8
	PR	-	-	-	8
	Fr	-	-	-	7
Acetato de etila	Fo	-	-	-	7
	PR	-	-	-	7
	Fr	-	-	-	9
Etanol	Fo	-	2	5	8
	PR	-	-	-	9
	Fr	-	-	-	8

FONTE: A autora (2021).

LEGENDA: - não houve formação de halo ou a visualização do mesmo foi dificultada pela coloração do extrato;

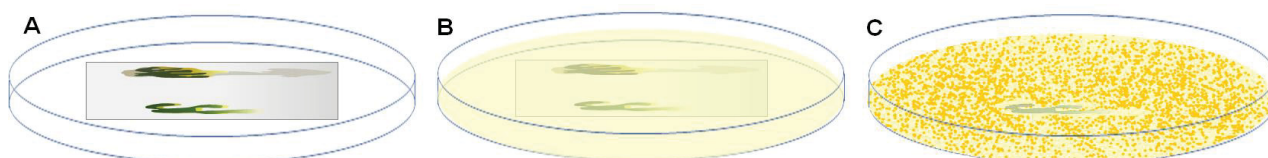
Valores expressos em milímetros.

Nenhum dos três extratos hexânicos e de acetato de etila foram efetivos frente a bactéria *X.v.v.* Apenas o extrato etanólico dos folíolos demonstrou fraca atividade em duas, das três, concentrações testadas.

### 5.3.2 Bioautografia indireta (agar-overlay)

A bioautografia indireta é caracterizada pela incubação do ágar inoculado sobre a placa de CCD, mesmo sendo dependente da difusão dos compostos pelo ágar, é uma técnica mais sensível que a difusão em poços e também é muito popular para triagem de compostos antimicrobianos (MÓRICZ; OTT, 2016). O uso do revelador evidencia, as áreas de crescimento bacteriano (FIGURA 11).

FIGURA 11 - ETAPAS DA BIOAUTOGRAFIA INDIRETA (AGAR OVERLAY)



FONTE: A autora (2021).

LEGENDA: A, B – Ágar inoculado é distribuído sobre a placa de cromatografia. C – Após a incubação, manchas onde não houve o crescimento bacteriano indicam a localização de substâncias antibacterianas.

A bioautografia indireta se mostrou mais eficaz em demonstrar o potencial antibacteriano dos extratos do que o método de difusão em poços (TABELA 3).

TABELA 3 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi PELO MÉTODO DE BIOAUTOGRAFIA INDIRETA (AGAR OVERLAY).

Tratamento		Halo de Inibição (mm)
	Fo	2
Hexano	PR	4
	Fr	2
Acetato de Etila	Fo	-
	PR	3
	Fr	-
Etanol	Fo	6
	PR	6
	Fr	7

FONTE: A autora (2021).

LEGENDA: - não houve formação de halo ou a visualização do mesmo foi dificultada pela coloração do extrato.

Todos os extratos hexânicos e etanólicos demonstraram inibição no crescimento da bactéria testada. Os maiores halos foram obtidos com os extratos etanólicos (único tipo de extrato a demonstrar inibição pelo método de difusão em poços).

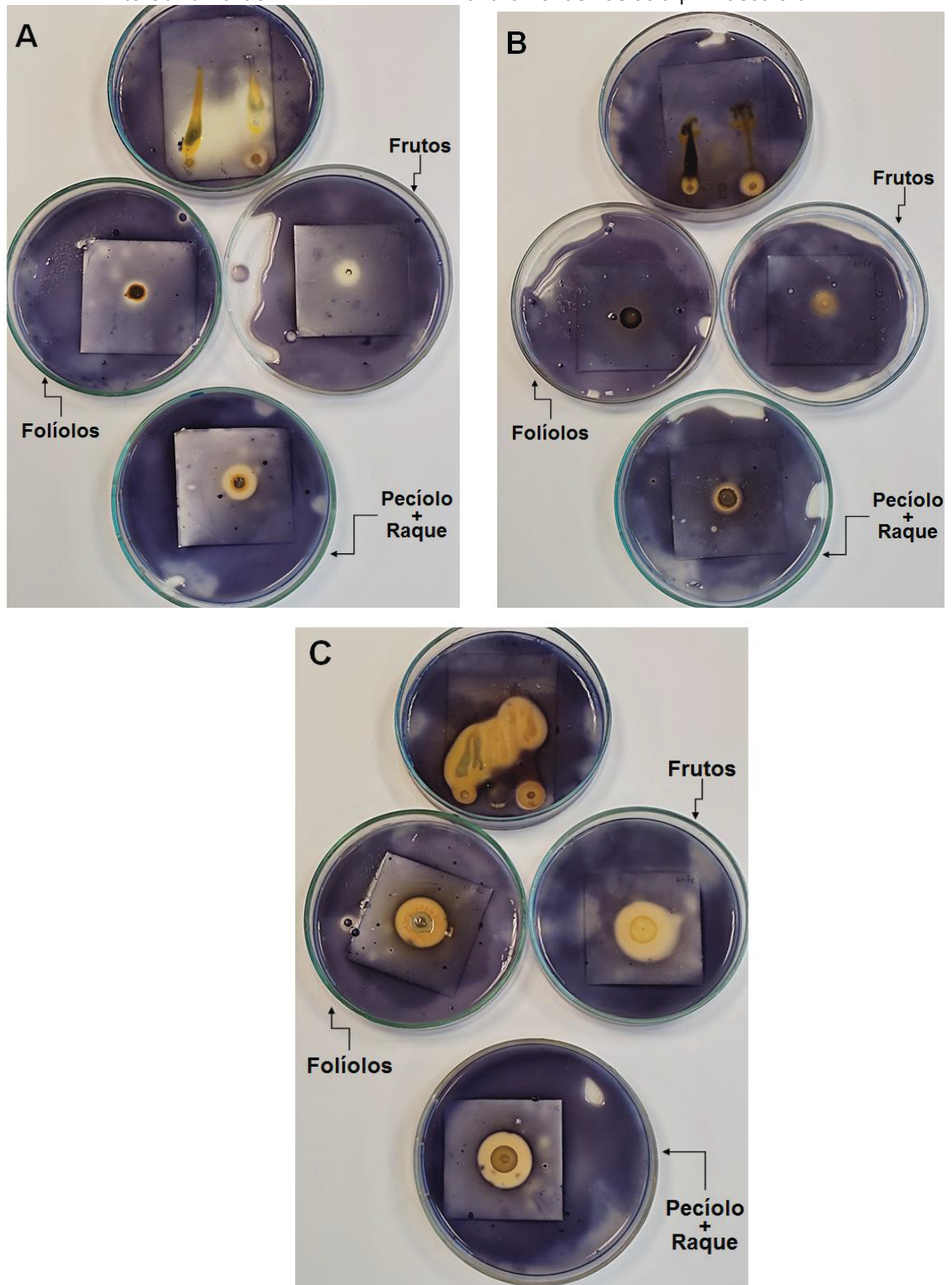
Em um comparativo entre as partes vegetais utilizadas, o extrato obtido de pecíolos+raques foi o único a apresentar formação de halo em todos os extratos, demonstrando-se como promissores.

Ao analisarmos a bioautografia realizada com as placas de CCD após corrida cromatográfica (FIGURA 12B) é possível observar a formação de halo no ponto de aplicação do extrato de acetato de etila dos folíolos. Indica também que as substâncias mais polares deste extrato são as responsáveis por essa inibição.

Todos os pontos de aplicação dos extratos de pecíolos+raques, nas placas em que houve o desenvolvimento da cromatografia, demonstraram inibição no crescimento da bactéria testada.

A atividade antibacteriana, principalmente de extratos etanólicos e do óleo essencial dos frutos e folhas de *S. terebinthifolius* já foi amplamente testada em bactérias de interesse farmacológico, sendo demonstrada atividade contra: *E. coli*,

FIGURA 12 - BIOAUTOGRAFIA INDIRETA (AGAR OVERLAY) DE EXTRATOS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi FRENTE A *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*



FONTE: A autora (2021).

LEGENDA: A: Extratos hexânicos, B: Extratos de Acetato de Etila, C: Extratos etanólicos. Nas placas de CCD onde houve a corrida cromatografia, o ponto de aplicação à esquerda corresponde ao extrato dos folíolos, o ponto de aplicação do centro corresponde ao extrato dos frutos e o ponto de aplicação à direita corresponde ao extrato de pecíolos+raques.

*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* (GUERRA *et al.*, 2000). O potencial do extrato metanólico dos frutos de *S. terebinthifolius* também foi demonstrada em estudos desenvolvidos por Muhs e colaboradores (2017), onde uma das frações apresentou ação inibitória contra os alelos do gene *agr* de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA).

Os constituintes principais dos óleos essenciais de *S. terebinthifolius* Raddi são limoneno, germacrene D,  $\delta$ -cadineno,  $\alpha$ -copaeno,  $\alpha$ -pineno,  $\alpha$ -felandreno, sabineno e  $\beta$ -pineno (para folhas) e mirceno, limoneno, germacrene D,  $\alpha$ -pineno,  $\alpha$ -felandreno,  $\alpha$ -copaeno, sabineno,  $\delta$ -cadineno, sabineno e  $\beta$ -pineno (para os frutos) (SANTOS *et al.*, 2009). Porém os compostos presentes em *S. terebinthifolius* e associados à atividade antibacteriana são: sabineno, miricetina,  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno (POMBO, 2011; SILVA *et al.*, 2012; TAHERI *et al.*, 2020).

(S)-limoneno,  $\alpha$ -pineno e (R)-limoneno, detectados por cromatografia a gás, de plantas de arroz contaminadas com *X. oryzae* pv. *oryzae* apresentaram inibição no crescimento da mesma bactéria testada (LEE *et al.*, 2015), indicando que os compostos estão associados a atividade antibacteriana frente ao gênero *Xanthomonas*.

Elshafie e colaboradores (2016) analisaram a atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas e frutos de *S. terebinthifolius*, obtendo fraca atividade contra *Xanthomonas campestris* e nenhuma atividade contra *Pseudomonas savastanoi* e *P. syringae* pv. *phaseolicola*. A fraca atividade, ou ausência da mesma, podem estar relacionadas com os lipossacarídeos na membrana externa, já que todas são bactérias gram-negativas.

Extratos etanólicos dos frutos e folhas da aroeira-vermelha demonstraram atividade anti-*Escherichia coli*, sendo esta atividade associada aos ácidos graxos: palmítico, eicosanóico, heneicosanóico e beenico. Ácidos graxos livres podem resultar na inibição de atividade enzimática, comprometimento da absorção de nutrientes e lisa direta das células bacterianas (DESBOIS; SMITH, 2010).

Baptista e colaboradores (2020) demonstraram efeito antibacteriano de extratos de folhas de *S. fasciculatus* frente às bactérias *P. corrugata*, *P. syringae* pv. *tomato*, *E. carotovora* var. *carotovora*, *A. tumefaciens* e *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatora*. O extrato a apresentar os melhores resultados foi o extrato de acetato de etila (obtido após maceração e extração com diclometano). As substâncias

responsáveis pela atividade foram isoladas e identificadas: kaempferol, agatisflavona (um dímero de apigenina) e quercetina.

Rhouma e colaboradores (2009) demonstraram o potencial dos extratos aquoso e metanólico de folhas de *S. terebinthifolius* frente à bactéria fitopatogênica *A. tumefaciens* pelo método de difusão em poços, entretanto o extrato hexânico não apresentou nenhuma atividade. Os dados do extrato hexânico corroboram com o presente trabalho, que pela mesma técnica, também não apresentou atividade antibacteriana.

#### 5.4 TESTE DE FITOTOXICIDADE EM SEMENTES DE *Bidens pilosa* L.

Todos os extratos de *S. terebinthifolius* Raddi testados alteraram pelo menos um dos parâmetros avaliados de crescimento inicial das plântulas de picão-preto. Embora a germinação tenha sofrido influência dos tratamentos, não houve diferença estatística no percentual de germinação de sementes nem no Índice de Velocidade de Germinação (IVG). Os resultados obtidos podem ser observados na TABELA 4 para a concentração de 500 ppm e TABELA 5 para 1000 ppm.

Morgan e Overholt (2005) também não obtiveram diferença estatística na porcentagem de germinação ao avaliar a influência do extrato aquoso da mesma espécie, aroeira-vermelha, sobre sementes de *Rivina humilis*. Alves *et al.* (2021) não obtiveram efeito biológico na germinação de sementes de *Bidens pilosa* tratadas com diferentes concentrações (25%, 50%, 75% e 100%) do extrato aquoso de *Prosopis juliflora* (Sw.). Este evento pode demonstrar que a germinação de *Bidens pilosa* foi mais afetada pelos aleloquímicos do que o desenvolvimento inicial de plântula, ou seja, a germinação é menos sensível aos aleloquímicos do que o desenvolvimento da plântula (COMITTO, 2006). A germinação é caracterizada pela embebição de semente, sendo considerada completa quando há a protusão da radícula. Na etapa de embebição há o alongamento celular, porém não há divisão; sendo esse processo presente a partir do desenvolvimento inicial. Os aleloquímicos presentes nos extratos de *S. terebinthifolius* podem ter afetado o processo de divisão celular, inibindo assim o crescimento inicial das plântulas, mas sem respostas expressivas para a germinação.

TABELA 4 - VALORES MÉDIOS DE PARAMETROS DE GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO DE PLANTULA DE *Bidens pilosa* FRENTE A EXTRATOS DE DIFERENTES PARTE DE *Schinus terebintifolius* Raddi NA CONCENTRAÇÃO DE 500 ppm

	<b>IVG</b>	<b>%G</b>	<b>CR</b>	<b>CPA</b>	<b>MF</b>	<b>MS</b>
<b>Controle</b>	29,550 <sup>a</sup>	95 <sup>a</sup>	19,34 <sup>b</sup>	26,48 <sup>a</sup>	0,00838 <sup>a</sup>	0,00114 <sup>a</sup>
<b>Hex-Fo</b>	22,582 <sup>a</sup>	90 <sup>a</sup>	19,26 <sup>b</sup>	21,69 <sup>c</sup>	0,00668 <sup>a</sup>	0,00102 <sup>a</sup>
<b>Hex-PR</b>	24,700 <sup>a</sup>	90 <sup>a</sup>	22,04 <sup>a</sup>	24,08 <sup>b</sup>	0,00768 <sup>a</sup>	0,00106 <sup>a</sup>
<b>Hex-Fr</b>	25,064 <sup>a</sup>	89 <sup>a</sup>	18,80 <sup>b</sup>	22,24 <sup>c</sup>	0,00752 <sup>a</sup>	0,00102 <sup>a</sup>
<b>AcEt-Fo</b>	25,352 <sup>a</sup>	95 <sup>a</sup>	22,20 <sup>a</sup>	21,62 <sup>c</sup>	0,00678 <sup>a</sup>	0,00094 <sup>a</sup>
<b>AcEt-PR</b>	26,082 <sup>a</sup>	91 <sup>a</sup>	19,66 <sup>b</sup>	22,29 <sup>c</sup>	0,00670 <sup>a</sup>	0,00100 <sup>a</sup>
<b>AcEt-Fr</b>	26,584 <sup>a</sup>	92 <sup>a</sup>	17,24 <sup>c</sup>	23,21 <sup>c</sup>	0,00724 <sup>a</sup>	0,00104 <sup>a</sup>
<b>Et-Fo</b>	26,600 <sup>a</sup>	94 <sup>a</sup>	17,52 <sup>c</sup>	23,24 <sup>c</sup>	0,00704 <sup>a</sup>	0,00104 <sup>a</sup>
<b>Et-PR</b>	27,002 <sup>a</sup>	89 <sup>a</sup>	19,68 <sup>b</sup>	23,99 <sup>b</sup>	0,00686 <sup>a</sup>	0,00114 <sup>a</sup>
<b>Et-Fr</b>	28,302 <sup>a</sup>	91 <sup>a</sup>	14,90 <sup>d</sup>	22,30 <sup>c</sup>	0,00634 <sup>a</sup>	0,00108 <sup>a</sup>
<b>CV(%)</b>	10,61	5,92	7,60	8,10	13,90	16,22

FONTE: A Autora (2021).

LEGENDA: IVG: Índice de velocidade de germinação; %G: Porcentagem de germinação; CR: Comprimento da raiz primária (mm); CPA: Comprimento de parte aérea (mm); MF: Massa fresca por plântula (g); MS: Massa seca por plântula (g). Letras diferentes representam agrupamento entre as médias, de acordo com o teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Tabela 5 - VALORES MÉDIOS DE PARAMETROS DE GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO DE PLANTULA DE *Bidens pilosa* FRENTE A EXTRATOS DE DIFERENTES PARTE DE *Schinus terebintifolius* Raddi NA CONCENTRAÇÃO DE 1000 ppm

	<b>IVG</b>	<b>%G</b>	<b>CR</b>	<b>CPA</b>	<b>MF</b>	<b>MS</b>
<b>Controle</b>	26,550 <sup>a</sup>	93 <sup>a</sup>	15,110 <sup>a</sup>	21,630 <sup>a</sup>	0,00774 <sup>a</sup>	0,00098 <sup>a</sup>
<b>Hex-Fo</b>	26,400 <sup>a</sup>	88 <sup>a</sup>	9,072 <sup>b</sup>	17,806 <sup>b</sup>	0,00518 <sup>a</sup>	0,00096 <sup>a</sup>
<b>Hex-PR</b>	26,434 <sup>a</sup>	88 <sup>a</sup>	13,612 <sup>a</sup>	18,880 <sup>b</sup>	0,00624 <sup>a</sup>	0,00106 <sup>a</sup>
<b>Hex-Fr</b>	28,300 <sup>a</sup>	91 <sup>a</sup>	10,976 <sup>b</sup>	18,912 <sup>b</sup>	0,00638 <sup>a</sup>	0,00108 <sup>a</sup>
<b>AcEt-Fo</b>	29,748 <sup>a</sup>	91 <sup>a</sup>	9,462 <sup>b</sup>	20,458 <sup>a</sup>	0,00592 <sup>a</sup>	0,00106 <sup>a</sup>
<b>AcEt-PR</b>	27,300 <sup>a</sup>	92 <sup>a</sup>	13,192 <sup>a</sup>	20,092 <sup>a</sup>	0,00626 <sup>a</sup>	0,00104 <sup>a</sup>
<b>AcEt-Fr</b>	27,232 <sup>a</sup>	88 <sup>a</sup>	11,560 <sup>b</sup>	18,174 <sup>b</sup>	0,00670 <sup>a</sup>	0,00106 <sup>a</sup>
<b>Et-Fo</b>	26,518 <sup>a</sup>	87 <sup>a</sup>	10,022 <sup>b</sup>	19,282 <sup>b</sup>	0,00644 <sup>a</sup>	0,00110 <sup>a</sup>
<b>Et-PR</b>	26,400 <sup>a</sup>	88 <sup>a</sup>	7,864 <sup>b</sup>	21,436 <sup>a</sup>	0,00678 <sup>a</sup>	0,00100 <sup>a</sup>
<b>Et-Fr</b>	25,332 <sup>a</sup>	90 <sup>a</sup>	10,242 <sup>b</sup>	18,926 <sup>b</sup>	0,00632 <sup>a</sup>	0,00104 <sup>a</sup>
<b>CV(%)</b>	7,99	5,55	16,88	9,63	12,38	8,45

FONTE: A Autora (2021).

LEGENDA: IVG: Índice de velocidade de germinação; %G: Porcentagem de germinação; CR: Comprimento da raiz primária (mm); CPA: Comprimento de parte aérea (mm); MF: Massa fresca por plântula (g); MS: Massa seca por plântula (g). Letras diferentes representam agrupamento entre as médias, de acordo com o teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Nas TABELAS 4 e 5 observa-se o efeito dos extratos sobre o crescimento dos órgãos vegetativos, raiz primária e parte aérea indicando variação nas respostas alguns extratos, alguns induziram aumento no comprimento e outros inibiram. Os resultados mais expressivos foram observados na concentração de 1000 ppm; onde o tratamento Et-PR inibiu o crescimento de raiz primária em 47,9% e o tratamento Hex-Fo inibiu o crescimento de parte aérea em 17,7%. Isso pode indicar que os compostos presentes nos extratos afetaram o desenvolvimento das plântulas. Nessa concentração apenas três extratos não tiveram efeito sobre o comprimento da raiz. Este é um resultado representativo, já que, para o estudo alelopático, a inibição do desenvolvimento da raiz é um dos melhores indicadores, já que esta é a parte vegetal mais sensível (FILHO *et al.*, 1997; FIORESI *et al.*, 2021), uma vez que é por onde haverá majoritariamente a absorção dos compostos pelas plantas. Estudos semelhantes apresentam resultados onde os extratos utilizados afetaram mais a parte radicular que aérea (VIVEIROS; ANDRADE, 2013; FONSECA *et al.*, 2016) isso pode se dar pelo maior contato das raízes com o papel germitest tratado (CHUNG; AHN; YUN, 2001).

Na concentração de 500 ppm, todos os extratos reduziram o comprimento de parte aérea; o tratamento mais eficaz foi AcEt-Fo (18,3% de redução). Quanto ao comprimento da raiz primária, quatro extratos não apresentaram efeitos biológicos, dois extratos promoveram o crescimento e outros três extratos inibiram; tendo a maior inibição em 22,9% do extrato Et-Fr.

Quanto a massa fresca e massa seca nenhum dos extratos, em ambas as concentrações não afetaram significativamente estas variáveis. Esses dados corroboram com o estudo de Santos (2009) que não encontrou diferença estatística para biomassa seca e fresca de plântulas de *B. pilosa* tratadas com extratos obtidos de *S. terebinthifolius* Raddi. Santos (2009) posteriormente realizou experimento, similar ao primeiro, com decocto obtido da aroeira-vermelha em diferentes concentrações e constatou que a menor concentração (12,5%) promoveu efeito estimulatório na biomassa, corroborando com o presente estudo. A atividade biológica dos extratos vegetais depende tanto da concentração do aleloquímico, quanto do limite da resposta da espécie afetada, intimamente relacionada à sua sensibilidade.

Santos (2013) demonstrou que o decocto de folhas de *S. terebinthifolius* em baixas concentrações teve efeito estimulatório na biomassa seca e fresca em teste

alelopático frente ao picão-preto, enquanto concentrações maiores apresentaram efeito inibitório. Em extratos aquosos, concentrações acima de 50% apresentaram mais efeito (FONSECA *et al.*, 2016; BITENCOURT *et al.*, 2021).

Viveiros e Andrade (2013) também constataram alterações no crescimento de parte aérea de plântulas de *Pilosocereus arrabidae*, *Cereus fermambucensis* e *Erythroxylum ovalifolium* tratadas com extratos aquosos de aroeira-vermelha. Rizzardi *et al.* (2008) testando diversas variedades de canola sobre a germinação e crescimento inicial de *Bidens pilosa* L. também constataram que em determinadas concentrações houve a estimulação do crescimento da radícula, quando comparado ao controle.

Os efeitos de extratos sobre germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas são frequentemente explicados pelos principais constituintes ou por classes químicas presentes. Todavia, o extrato é composto de diversas substâncias em proporções variadas e frequentemente não se sabe como ocorre, e se ocorre, a interação dessas substâncias para promover um efeito sobre outros organismos. Valido também ressaltar que a composição desses extratos, podendo ser afetados pelas condições ambientais, disponibilidade de nutrientes e idade da planta (SANTOS *et al.*, 2009).

Para os efeitos inibitórios de CR e CPA (1000 ppm) e CR (500 ppm), ao analisarmos o QUADRO 4, composto fenólicos e terpenos podem ter sido os responsáveis, já que apresentam diversas atividades biológicas e podem servir como aleloquímicos (MIZUTANI, 1999).

De um modo geral os parâmetros que apresentam diferença ao controle foram crescimento de raiz primária e crescimento de parte aérea, sendo que CPA foi mais afetado pelos tratamentos na concentração de 500 ppm enquanto CR foi mais afetado pelos tratamentos na concentração de 1000 ppm.

Os extratos de acetato de etila-frutos, etanol-folíolos e etanol-frutos foram os únicos a inibiram o crescimento de parte aérea e de raiz principal em ambas as concentrações testadas. Ainda assim foram os extratos mais expressivos do experimento; num comparativo entre os perfis fitoquímico destes extratos, os compostos secundários mútuos são: terpenos e compostos fenólicos (QUADRO 4).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apenas um extrato demonstrou atividade pelo método de difusão em poços (etanol-folíolos) e os extratos etanólicos foram os mais expressivos no teste de bioautografia indireta (média de 6,5 mm de halo). No teste de fitotoxicidade apenas os extratos de acetato de etila-frutos, etanol-folíolos e etanol-frutos afetaram negativamente o crescimento de parte aérea e raiz primária em ambas as concentrações testadas (500 ppm e 1000 ppm). Entre estes três extratos, dois deles eram dos frutos, sugerindo que há uma quantidade de aleloquímicos presentes na planta que se concentram nos frutos.

Conjuntamente, os resultados de prospecção fitoquímica, atividade antibacteriana (difusão em poços e bioautografia indireta) e teste de fitotoxicidade pode-se perceber que os extratos de *S. terebinthifolius* Raddi que apresentaram os melhores resultados foram os obtidos com etanol, indicando assim que os compostos a apresentarem as melhores atividades são polares. Isso reforça os trabalhos que apresentaram bons resultados com extratos aquosos de aroeira-vermelha, sendo a proximidade da polaridade desses solventes (etanol e água) um fator importante para a redução de custo para a extração. Se extratos aquosos apresentam bons resultados e são mais fáceis de serem preparados podem ser facilmente utilizados também na agricultura familiar. Por outro lado, extratos etanólicos são mais facilmente armazenados.

Todos os extratos etanólicos demonstraram a presença de antraquinonas, compostos orgânicos insaturados, compostos fenólicos, cumarinas, terpenos/esteroides, flavonoides e taninos hidrolisáveis. Estes compostos podem ter sido os responsáveis pelas atividades demonstradas neste trabalho, no entanto se faz necessário explorar fitoquimicamente ainda mais estes extratos, possibilitando o isolamento e aplicação de moléculas presentes.

## 7 CONCLUSÕES

Os extratos brutos etanólicos de *S. terebinthifolius* Raddi apresentaram efeito antibacteriano frente a *Xanthomonas vasicola* pv. *Vasculorum*, sendo o método de bioautografia indireta (ágar-overlay) mais sensível que o método de difusão de poços.

O extrato etanólico de pecíolos-raques a 1000 ppm foi o mais promissor em inibir o comprimento da raiz primária, sendo essa redução de quase 50%. Na concentração de 500 ppm a maior inibição de crescimento de raiz primária foi observada com o extrato etanólico dos frutos (22,9%). Os frutos e folíolos foram as partes vegetais que mais apresentam atividade biológica, com destaque para a fitotoxicidade.

Em se tratando de trabalhos futuros, sugere-se continuidade com os extratos etanólicos, em especial, utilizando folíolos ou frutos.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, R. J. R. *et al.* Potencial alelopático do extrato aquoso de *Prosopis juliflora* (Sw.) DC sobre a germinação de *Bidens pilosa* L. **Diversitas Journal**, Santana do Ipanema (AL), v. 6, n. 1, p. 172-181, 2021.
- ARIAS, S. L. *et al.* Potential for seed transmission of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* on maize collected from fields in the United States. In: INTERNACIONAL CONGRESS OF PLANT PATOLOGY: PLANT HEALTH IN A GLOBAL ECONOMY, 11., 2018, Boston. **Plant health in a global economy**. Boston: ICPP, 2018.
- ARIAS, S. L. *et al.* Occurrence in seeds and potential seed transmission of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* in maize in the United States. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 110, n. 6, p. 1139-1146, 2020.
- ARITUA, V. *et al.* Characterization of the *Xanthomonas* sp. causing wilt of enset and banana and its proposed reclassification as a strain of *X. vasicola*. **Plant Pathology**, Londres, v. 51, n. 1, p. 170-177, 2008.
- BACHI, E. F. Ação anti-úlceras e cicatrizante de algumas plantas brasileiras. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 1, n.1, p. 93-100, 1986.
- BADAWY, M. E.I.; ABDELGALEIL, S. A.M. Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi. **Industrial Crops And Products**, [S.I.], v. 52, p.776-782, 2014.
- BAPTISTA, Z. P. T. *et al.* Antibacterial activity of native plants from Northwest Argentina against phytopathogenic bacteria. **Natural Products Research**, [S.I.], v. 34, n. 12, p. 1782-1785, 2020.
- BARBOSA, L. C. A. *et al.* Seasonal variation in the composition of volatile oil from *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1959-1965, 2007.
- BENINI, P. C. *et al.* Efeito *in vitro* do óleo essencial e extrato aquoso de *Ocimum gratissimum* colhido nas quatro estações do ano sobre fitopatógenos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 4, p. 677-683, 2010.
- BERNARDES, N. R. **Estudo da composição química e dos efeitos imunofarmacológicos do extrato dos frutos da Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi)**. 131 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes (RJ), 2010.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil. In:\_\_\_\_\_. **Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009.

BITENCOURT, G. A. *et al.* Fitoquímica e Alelopatia da Aroeira-Vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na Germinação de Sementes. **Ensaio e Ciência**, [S.l.], v. 25, n. 1, p.02-08, 2021.

BRASIL. Formulário de fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2011. 126 p.

BRASIL. Regras para análise de sementes / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399 p.

BRODERS, K. Status of bacterial leaf streak of corn in the United States. In: INTEGRATED CROP MANAGEMENT CONFERENCE – IOWA STATE UNIVERSITY, 29., 2017, Iowa. **Proceedings...** Iowa: ICM, 2017.

CARVALHO, S. V. V.; JESUS, N. B. Uma breve apresentação. In: GOMES, L. J. *et al.* **Pensando a Biodiversidade: Aroeira** (*Schinus terebinthifolius* Raddi). São Cristóvan: Editora UFS, p.17-19, 2013.

CAVALHER-MACHADO, S. C. *et al.* The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. **International Immunopharmacology**, [S.l.], v. 8, n. 11, p. 1552-1560, 2008.

CAMPOS, M. S. T. *et al.* Estudo Fitoquímico e biológico do extrato etanólico de *Solanum cernuum* Vell (Solanaceae). **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v. 7, n. 13, p. 1336-1344, 2011.

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

CERUKS, M. *et al.* Constituintes fenólicos polares de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 597-599, 2007.

CHUNG, I. M.; ANH, J. K.; YUN, S. J. Assessment of allelopathic potential of barnyard grass (*Echinochloa crus-galli*) on rize (*Oryza sativa* L.) cultivars. **Crop Protection**, v. 20, n.10, p.921-928, 2001.

COMIOTTO, A. **Potencial alelopático de diferentes espécies de plantas sobre a qualidade fisiológica de sementes de arroz e aquênios de alface e crescimento de plântulas de arroz e alface**. 2006. 42 f. Dissertação (Mestrado em Ciências, Instituto Biologia, Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas (RS). 2006

CONTINI, E. *et al.* Milho – Caracterização e Desafios Técnicos. **Série Desafios do Agronegócio Brasileiro (NT2)**, Embrapa, 2019. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/195075/1/Milho-caracterizacao.pdf>>. Acesso em: 07 fev. 2020.

- COSTA, C. O. D.'S. *et al.* Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of extracts prepared from different tissues of *Schinus terebinthifolius* Raddi that occurs in the coast of Bahia, Brazil. **Pharmacognosy Magazine**, [S.I.], v. 11, n. 43, p. 607-614, 2015.
- COTA, L. V. *et al.* Histórico e perspectivas das doenças na cultura do milho. **Circular técnica**, EMBRAPA, 2013. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/975363/1/circ193.pdf>>. Acesso em 03 fev. 2021.
- COUTINHO, T. A. *et al.* Significant host jump of *Xanthomonas vasicola* from sugarcane to a *Eucalyptus grandis* clone in South Africa. **Plant Pathology**, Londres, v. 64, n. 1, p. 576-581, 2015.
- DEGÁSPARI, C. H. *et al.* Atividade antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Ciênc. Agrotec**, Lavras, v. 29, n. 3, p. 617-622, 2005.
- DESBOIS, A. P.; SMITH, V. J. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. **Appl Microbiol Biotechnol**, [S.I.], v. 85, p. 1629-1642, 2010.
- DOOKUN, A. *et al.* Variation among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vasculorum* from Mauritius and other countries based on fatty acid analysis. **Systematic and Applied Microbiology**, [S.I.], v. 23, n. 1, p. 148-155, 2000.
- DYER, R. A. Botanical surveys and control of plant diseases. **Farming in South Africa**, [S.I.], v. 24, n. 275, p. 119-121, 1949.
- ELSHAFIE, H, S. *et al.* An *in vitro* attempt for controlling severe phytopathogens and human pathogens using essential oils from mediterranean plants of genus *Schinus*. **Journal Of Medicinal Food**, [S.I.], v. 19, n. 3, p. 266-273, 2016.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Weeds: About the theme. s. d. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/tema-plantas-daninhas/sobre-o-tema>. Acesso em: 13 out. 2021.
- FERREIA, D. F. Sisvar: a guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.
- FERREIRA, A. G.; AGUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da Ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, [S.I.], v. 12, n. especial, p. 175-204, 2000.
- FILHO, A. P. S. S. Potencial Alelopático de forrageiras tropicais: efeitos sobre invasoras de pastagens. **Planta Daninha**, [S.I.], v. 15, n.1, 1997.
- FIORESI, R. S. Efeito alelopático de *Solanum pimpinellifolium* L. sobre germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* e *Bidens pilosa*. **Scientia Plena**, [S.I.], v. 17, n. 6, p. 01-10, 2021.

FONSECA, V. B. *et al.* Allelopathic potential of leaves and flowers extracts of *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Científica**, Jaboticabal, v. 44, n. 1, p. 35-39, 2016.

GROVES, C. L. *et al.* First report of bacterial leaf streak of corn caused by *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* in Wisconsin. **Plant Disease** (Disease Notes), Saint Paul, v. 104, n. 11, p. 3055, 2020.

GUERRA M. J. M. *et al.* Actividad Antimicrobiana de um extracto fluido al 80% de *Schinus terebinthifolius* Raddi (COPAL). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 5, n. 1, p. 23-25, 2000.

HARTMAN, T. M. **Investigation of alternative hosts and agronomic factors affecting *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, causal agent of bacterial leaf streak of corn.** 2018. 116 f. Tese (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Nebraska-Lincoln, Lincoln (NE), 2018. Disponível em: <[https://digitalcommons.unl.edu/agronhortdiss/152/?utm\\_source=digitalcommons.unl.edu%2Fagronhortdiss%2F152&utm\\_medium=PDF&utm\\_campaign=PDFCoverPages](https://digitalcommons.unl.edu/agronhortdiss/152/?utm_source=digitalcommons.unl.edu%2Fagronhortdiss%2F152&utm_medium=PDF&utm_campaign=PDFCoverPages)>. Acesso em: 13 jun. 2020.

HARTMAN, T. M. *et al.* Agronomic factors associated with bacterial leaf streak development caused by *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* in corn. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 110, n. 6, p. 1132-1138, 2020a.

HARTMAN, T. M. *et al.* A. Alternative Hosts in the Families Poaceae and Cyperaceae for *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, Causal Agent of Bacterial Leaf Streak of Corn. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 110, n. 6, p. 1147-1152, 2020b.

HARRISON, J.; STUDHOLME, D. J. Draft genome sequence of *Xanthomonas axonopodis* pathovar *vasculorum* NCPPB 900. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 360, n. 2, p. 113-116, 2014.

JACQUES, M. A. *et al.* Using ecology, physiology, and genomics to understand host specificity in *Xanthomonas*. **Annual Review of Phytopathology**, California, v. 54, p. 163-187, 2016.

KARAMURA, G. *et al.* Comparative pathogenicity studies of the *Xanthomonas vasicola* species on maize, sugarcane and banana. **African Journal of Plant Science**, Nigeria, v. 9, n. 9, p. 385-400, 2015.

KORUS, K. *et al.* First report of *Xanthomonas vasicola* causing bacterial leaf streak on corn in the United States. **Plant Disease** (Disease Notes), Saint Paul, v. 101, n. 6, p.1030, 2017.

LANG, J. M. *et al.* Detection and characterization of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (Cobb 1984) comb. nov. causing bacterial leaf streak of corn in the United States. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 107, n. 11, p. 1312-1321, 2017.

LEE, G. W. *et al.* Direct suppression of a rice bacterial blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) by monoterpene (S)-limonene. **Protoplasma**, v. 253, n. 3, p.683-690, 2015.

LEITE JR, R. P. **Entenda a nova doença chamada estria bacteriana que preocupa produtores de milho**. 2018. Entrevista em vídeo. Disponível em: <<https://globoplay.globo.com/v/6885446>>. Acesso em: 02 mai. 2020.

LEITE JR, R. P. *et al.* **Estria bacteriana do milho no Paraná**. Londrina: IAPAR, 2018a. Informe da Pesquisa nº 160.

LEITE JR, R. P. *et al.* First report of the occurrence of bacterial leaf streak of corn caused of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* in Brazil. **Plant Disease** (Disease Notes), Saint Paul, v. 103, n. 1, p. 145, 25 out. 2018b.

LIBERALLI, L.; FRANZENER, G. Extrato aquoso de plantas medicinais no controle alternativo da ferrugem branca da rúcula. In: Seminário de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFFS, 3., 2013, Laranjeiras do Sul. **Anais...** Laranjeiras do Sul: Universidade Federal da Fronteira Sul, 2013.

LONGHI, T. V. *et al.* Avaliação de produtos químicos comerciais na sensibilidade *in vitro* de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* e no controle da estria bacteriana do milho. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 51., 2019, Recife. **Anais...** Recife: UFRPE – Programa de Pós Graduação em Fitopatologia, 2019. p. 296.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. de A. **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. 3. ed. Nova Odessa: Jardim Botânico Plantarium, 2021.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for speedling emergence and vigor. **Crop Science**, [S.I.], v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.

MATOS, M. J. *et al.* Coumarins – An important class of phytochemicals. In: RAO, V. **Phytochemicals** - Isolation, Characterisation and Role in Human Health. BoD – Books, on Demand, 2005. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/48076>. Acesso em: 20 nov. 2021

MICHEREFF, S. Bactérias como agentes de doenças de plantas. In: MICHEREFF, S. **Fundamentos em Fitopatologia**. Pernambuco: UFRPE, 2016.

MIZUTANI, J. Selected Allelochemicals. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 18, n. 5, p. 653-671, 1999.

MOCQUOT, B. *et al.* Copper toxicity in young maize (*Zea mays* L.) plants: effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and enzyme activities. **Plant and soil**, v. 182, p. 287-300, 1996.

MORAES, R. M. Pesticidas Naturais e Derivados de Plantas: Descobertas e Usos. In: HALFELD-VIEIRA, B. A. *et al.* **Defensivos Agrícolas Naturais: Uso e Perspectivas**, Brasília: EMBRAPA, 2016. p. 505-541.

MORAIS, L. A. S. de; MARINHO-PRADO, J. S. Plantas com Atividade Inseticida. In: HALFELD-VIEIRA, B. A. *et al.* **Defensivos Agrícolas Naturais: Uso e Perspectivas**, Brasília: EMBRAPA, 2016. p. 542-593.

MÓRICZ, Á. M.; OTT, P. G. Chapter 6 – Convention and modern bioassays – detection, isolation, identification. In: TYIHÁK, E. **Forced-Flow Layer Chromatography**, Elsevier. 2016 p. 347-395.

MORGAN, E. C.; OVERHOLT, W. A. Potential allelopathic effects of Brazilian pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae) aqueous extract on germination and growth of selected Florida native plants. **Journal of the Torrey Botanical Society**, v. 132, n. 1, p. 11-15, 2005.

MOURA, G. S. *et al.* F. Atividade antimicrobiana e indutora de fitoalexinas do hidrolato de carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) Dc.] **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 16, n. 2, supl. I, p. 309-315, 2014.

MUHS, A. *et al.* Virulence inhibitors from Brazilian Peppertree block Quorum sensing and Abate dermonecrosis in skin infections models. **Scientific Reports**, v. 7, n. 42275, p. 1-15, 2017.

NEGRI, G.; SUARTE-ALMEIDA, J. M. Ensaio fitoquímico em Plantas Mediciniais: Propriedades, Extração, Caracterização e Quantificação de Princípios Ativos. In: CARLINI, E. A.; MENDES, F. R. **Protocolos em Psicofarmacologia Comportamental**. São Paulo: Editora Fap-Unifesp, 2011, p. 65-105.

NESELLO, M. A. *et al.* Quantificação de flavonóides totais em três espécimes de *Schinus terebinthifolius* Raddi. XIII Encontro de Jovens Pesquisadores - Ciências da Vida. 2005.

NUNES, G. L. *et al.* Potencial de extratos foliares de *Schinus terebinthifolius* Raddi para redução da germinação de plantas daninhas. **Journal of Agronomic Sciences**, Umuarama, v. 8, n. 1, p. 136-144, 2019.

ORTIZ-CASTRO, M. **Understanding the disease ecology of the corn bacterial leaf streak pathogen *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum***. 2019. 90 f. Tese (Mestrado em Ciências) – Departamento de Ciências Bioagropecuárias e Manejo de Pragas, Colorado State University, Fort Collins, 2019. Disponível em: <<https://mountainscholar.org/handle/10217/197391>>. Acesso em: 25 jan. 2021.

ORTIZ-CASTRO, M. *et al.* Current understanding of the history, global spread, ecology, evolution, and management of the corn bacterial leaf streak pathogen, *Xanthomonas vasicola* pv. *Vasculorum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 110, n. 6, p. 1124-1131, 2020.

PLAZAS, M. C. *et al.* First report of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* causing bacteria leaf streak of maize (*Zea mays*) in Argentina. **Plant Disease** (Disease Notes), Saint Paul, v. 102, n. 5, p. 1026, 2018.

POMBO, E. B. **Estudo da atividade antibacteriana de óleos essenciais *Schinus molle***. 2011. 109 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Ciências Sociais e Humanas, Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2011.

QHOBELA, M.; CLAFLIN, L. E. Eastern and southern African strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vasculorum* are distinguishable by restriction fragment length polymorphism of DNA and polyacrylamide gel electrophoresis of membrane proteins. **Plant Pathology**, Londres, v. 41, p. 113-121, 1992.

QHOBELA, M. *et al.* Evidence that *Xanthomonas campestris* pv. *zeae* can be distinguished from others pathovars capable of infecting maize by restriction fragment length polymorphism of genomic DNA. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 2, n. 2, p. 183-186, 1990.

RADEMAKER, J. L. W. *et al.* A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 95, n. 5, p. 1098-1111, 2005.

RHOUMA, A. *et al.* Antimicrobial activities of leaf extracts of *Pistacia* and *Schinus* species against some plant pathogenic fungi and bacteria. **Journal of Plant Pathology**, v. 91, n. 2, p. 339-345, 2009.

RIZVI, S. J. H. *et al.* A discipline called allelopathy. In: RIZVI, S. J. H.; RIZVI, V. **Allelopathy**, Dordrecht: Springer, 1992, p. 01-10.

RIZZARDI, A. *et al.* Potencial Alelopático de Extratos Aquosos de Genótipos de Canola sobre *Bidens pilosa*. **Planta daninha**, Viçosa(MG), v. 26, n. 4, p. 717-724, 2008.

ROBAINA, R. R. *et al.* Development of a protocol and a diagrammatic scale for quantification of a bacterial leaf streak disease on young plants of maize. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 104, n. 11, p. 2921-2927, 2020.

ROSENBERGER, M. G. **Atividade antimicrobiana de cogumelos (agaricales) nativos da floresta estacional do oeste do Paraná**. 101 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Palotina, 2018.

SANTANA, J. S. *et al.* Isolamento e avaliação do potencial citotóxico de derivados fenólicos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 15, n. 11, p. 2245-2248, 2012.

SANTOS, A. C. A. *et al.* Chemical Composition of the Essential Oils from Leaves and Fruits of *Schinus mole* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi from Southern Brazil. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 16-25, 2009.

SANTOS, L. M. **Avaliação dos constituintes químicos polares e da atividade alelopática de *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae)**. 2009. 153 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Centro de Ciências Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes (RJ), 2009.

SANTOS, I. T. B. F. *et al.* Óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi como controle alternativo de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Lasiodiplodia theobromae*,

fungos fitopatogênicos de pós-colheita. **GEINTEC**, São Cristovão, v. 4, n. 4, p. 1409-1417, 2014.

SALES, M. D. C. *et al.* Plantas Medicinais e Aromáticas do Espírito Santo: O óleo essencial de folhas e frutos da espécie *Schinus terebinthifolia* RADDI (Aroeira Vermelha). In: SANTOS, C. C. **Pesquisa na cadeia de suprimentos de Plantas Aromáticas**. Ponta Grossa: Atena Editora, 2019, p. 25-36.

SEAB – SECRETARIA DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. **Prognóstico cultura MILHO – Dezembro de 2020**. Curitiba: DERAL, 2020. Disponível em: <[http://www.agricultura.pr.gov.br/sites/default/arquivos\\_restritos/files/documento/2020-12/Progn%C3%B3stico%20Milho%20-%202021.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2020-12/Progn%C3%B3stico%20Milho%20-%202021.pdf)>. Acesso em: 04 fev. 2021.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, [S.l.], v. 30, n. 3, p. 507-512, 1974.

SHEID, T. **Efeitos da administração de uma fração antioxidante de *Schinus terebinthifolius* sobre parâmetros nociceptivos e de estresse oxidativo em sistema nervoso central de ratos submetidos a um modelo de dor neuropática. 2014. 113 f. Tese (Doutorado em Fisiologia)** – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (RS), 2014. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/101642>. Acesso em: 20 nov. 2021.

SILVA, A. C. R. da. *et al.* Biological activities of  $\alpha$ -pinene and  $\beta$ -pinene enantiomers. **Molecules**, v. 17, p. 6305-6316, 2012.

SILVA, J. H. S. *et al.* Anti-*Escherichia coli* activity of extracts from *Schinus terebinthifolius* fruits and leaves. **Natural Product Research**, [S.l.], v. 32, n. 11, p. 1365-1368, 2018.

SIVITS, S. A *et al.* Bacterial Leaf Streak Disease of Corn. **Nebraska Extension**, 2018. Disponível em: <<https://extensionpublications.unl.edu/assets/pdf/ec3034.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2020.

STULDHOME, D. J. *et al.* Genome-wide sequencing data reveals virulence factors implicated in banana *Xanthomonas* wilt. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 310, n. 2, p. 182-192, 2010.

SWIECH, J. N. D. **Avaliação química e biológica de *Philodendron meridionale* Buturi & Sakur (Araceae)**. 171 f. Teses (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

TLILI, N. *et al.* *Schinus terebinthifolius* vs *Schinus molle*: A comparative study of the effects of species and location on the phytochemical content of fruits. **Industrial Crops & Products**, [S.l.], v. 122, p. 559-565, 2018.

TOMAZONI, E. Z. *et al.* Potencial fungitóxico dos óleos essenciais de *Schinus molle* L. e *Schinus terebinthifolius* Raddi contra fungos patogênicos do tomateiro. **Revista Brasileira de Agroecologia**, [S.l.], v. 12, n. 2, n. paginado, 2017.

ULIANA, M. P. *et al.* Composition and biological activity of Brazilian rose pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) leaves. **Industrial Crops and products**, [S.l.], v. 83, s. n., p. 235-240, 2016.

USDA – UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Grain: World Markets and Trade. 2021. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/grain.pdf>>. Acesso em: 03 fev. 2021

VALLE-JR, D. L. *et al.* Thin Layer Chromatography-Bioautography and Gas Chromatography-Mass Spectrometry of Antimicrobial Leaf Extracts from Philippine *Piper betle* L. against Multidrug-Resistant Bacteria. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [S.l.], v. 2016, p. 01-07, 2016.

VALGAS, C. *et al.* Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, [S.l.], v. 38, n. 2, p. 369-380, 2007.

VARGAS, L.; ROMAN, E. S. **Manejo e controle de plantas daninhas na cultura da soja**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2006. 23 p. Documento online. Disponível em: [http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p\\_do62.pdf](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do62.pdf). Acesso em: 06 dez. 2021

VAUTERIN, L. *et al.* Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 45, n. 3, p. 472-489, 1995.

VIVEIROS, A. B. R.; ANDRADE, A. C. Efeito alelopático e autotóxico de extratos aquosos de folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi. In: Congresso Nacional de Botânica, 64, 2013. **Anais...**, Belo Horizonte, 2013.

WASUKIRA, A. *et al.* Genome sequencing of *Xanthomonas vasciola* pathovar *vasculorum* reveals variation in plasmids and genes encoding lipopolysaccharide synthesis, Type-IV Pilus and Type-III secretion effectors. **Pathogens**, [S.l.], v. 3, n. 1, p. 211-237, 2014.

YOUNG, J. M. *et al.* A proposed nomenclature and classification plant pathogenic bacteria. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Aotearoa, v. 21, n. 1, p.153-177, 1978.

ZUANAZZI, J. Â. S.; MONTANHA, J. A.; ZUCOLOTTO, S. M. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017, p. 209-233.