

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS MARECHAL CÂNDIDO RONDON

TATIANE PRISCILA CHIAPETTI

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS FOLIARES DE
Maytenus* spp. SOBRE *Cylindrocladium clavatum

MARECHAL CÂNDIDO RONDON – PARANÁ

2018

TATIANE PRISCILA CHIAPETTI

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS FOLIARES DE
Maytenus spp. SOBRE *Cylindrocladium clavatum***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do título de Magister Scientiae.

Orientador: Ubirajara Contro Malavasi

Coorientadores: Gilberto Costa Braga e Marlene de Matos Malavasi

MARECHAL CÂNDIDO RONDON – PARANÁ

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C532a

Chiapetti, Tatiane Priscila

Atividade antioxidante e antifúngica de extratos foliares de *Maytenus spp.* sobre *Cylindrocladium clavatum*. / Tatiane Priscila Chiapetti. Marechal Cândido Rondon, 2018.
68 f.

Orientador: Prof. Dr. Ubirajara Contro Malavasi

Coorientador: Prof. Dr. Gilberto Costa Braga

Coorientadora: Marlene de Matos Malavasi

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná,
Campus de Marechal Cândido Rondon, 2018
Programa de Pós-Graduação em Agronomia

1. Eucalipto – Doenças e pragas. I. Malavasi, Ubirajara Contro. II. Braga, Gilberto Costa. III. Malavasi, Marlene de Matos. IV. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. V. Título.

CDD 20.ed. 634.97342

CIP-NBR 12899



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46

Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>

Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000

Marechal Cândido Rondon - PR.



PARANÁ

GOVERNO DO ESTADO

TATIANE PRISCILA CHIAPETTI

Atividade antioxidante e antifúngica de extratos foliares de *Maytenus* spp. sobre
Cylindrocladium clavatum

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestra em Agronomia, área de concentração Produção Vegetal, linha de pesquisa Manejo de Culturas, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:


Orientador(a) - Ubirajara Contro Malavasi

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon (UNIOESTE)


Gilberto Costa Braga

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon (UNIOESTE)


Danielle Acco Cadorin de Fraga

Faculdade de Ensino Superior de São Miguel do Iguazu (FAESI)


Odair José Kuhn

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon (UNIOESTE)

Marechal Cândido Rondon, 28 de fevereiro de 2018

AGRADECIMENTOS

- ♥ *À Deus, pela capacidade, pelas oportunidades, pelas pessoas, pela paciência, pela ida.*
- ♥ *Aos meus pais, Dilva e Benito Chiapetti, pelo amor, compreensão, por serem meus pilares, minha base forte. Por todas as lágrimas secadas, pelos abraços de conforto e por sofrerem comigo. Por todo amor e carinho. Por ficarem felizes com a minha felicidade. Vocês fazem parte dessa conquista. Eu amo vocês.*
- ♥ *Patricia e Bruno Chiapetti, obrigada pelo amor de irmãos, conversas, apoio, risadas, por serem os melhores amigos/irmãos do mundo. Eu amo vocês.*
 - ♥ *A todos os meus amigos que estiveram durante esses anos comigo.*
- ♥ *Às minhas amigas, Luanna, Jaqueline, Eunice, Mayra, pelas horas de distração, pelas conversas e desabafo e principalmente pelas risadas. Obrigada também pela ajuda na elaboração deste trabalho, pelo carinho, dedicação e paciência comigo. Agradeço pela parceria na elaboração dos artigos e pelo companheirismo na viagem incrível no congresso de Fortaleza-CE.*
- ♥ *Às minhas amigas Maria Cristina e Daiane Luckmann, obrigada por todo o suporte, projetos, conversas e amizade.*
- ♥ *Aos professores Ubirajara Contro Malavassi, Gilberto Costa Braga, José Renato Stangarlin, Odair José Kuhn, Claudio Yuji Tsutsumi e todos os professores que me auxiliaram de todas as formas, seja com trabalhos ou com conversas, minha gratidão.*
 - ♥ *Essa conquista não teria acontecido sem vocês.*
 - ♥ *Espero de todo meu coração ter vocês comigo durante toda minha vida.*

“Cada um de nós compõe a sua história
Cada ser em si
Carrega o dom de ser capaz
E ser feliz”

(Almir Sater e Renato Teixeira)

RESUMO

CHIAPETTI, Tatiane, P. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, fevereiro de 2017. **ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS FOLIARES DE *Maytenus* spp. SOBRE *Cylindrocladium clavatum***. Orientador: Ubirajara Contro Malavasi. Coorientadores: Gilberto Costa Braga e Marlene de Matos Malavasi.

As folhas da árvore chamada popularmente de espinheira-santa possuem compostos benéficos à saúde, e esses benefícios são comprovados cientificamente. A planta possui atividade antioxidante, atividade antifúngica e diversas outras características. Se faz muito importante o desenvolvimento de estudos acerca de vegetais que possam substituir o uso de remédios e também de agrotóxicos, pois é crescente o número de intoxicações, doenças e mesmo da resistência de microrganismos pelo excesso do uso de compostos químicos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar as propriedades antioxidantes de duas espécies de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* e *Maytenus aquifolium*) sob diferentes métodos de extração e posterior separação cromatográfica e também a avaliação de sua atividade antifúngica contra o fungo *Cylindrocladium clavatum* em eucalipto. Os métodos de extração para o primeiro trabalho foram percolação à temperatura de 28 °C por 7 dias e ultrassom com diferentes temperaturas (50 °C, 60 °C e 70°C), por 15 minutos. Os solventes de separação cromatográfica foram hexano, clorofórmio e metanol. A atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP. Para a avaliação da atividade antifúngica foi feito um conjunto de análises para que se pudesse verificar a eficácia dos extratos das espécies da espinheira-santa de diferentes modos. Primeiramente analisando os extratos aplicados no fungo de forma incorporada em meio de cultura em concentração fixada de 2000 mg L⁻¹, seguido da avaliação da concentração inibitória mínima em 5 e 15 dias, da esporulação em 15 dias e pôr fim a avaliação em folhas de eucalipto. O extrato da espinheira-santa teve resultados semelhantes para as duas espécies analisadas. Foram encontrados elevados teores de atividade antioxidante para todos os testes feitos e isso ocorreu principalmente em extração com menor temperatura. Os extratos que mais se destacaram em atividade antioxidante foram os extratos bruto e o extratos obtido com solvente metanol na cromatografia, para todos os métodos de avaliação da atividade antioxidante. Nas avaliações da atividade antifúngica foi observado que todos os extratos em concentrações fixada de 2000 mg L⁻¹ e posteriormente de 500 mg L⁻¹ se faziam efetivos no controle do fungo. Na avaliação da concentração inibitória mínima o extrato obtido com solvente clorofórmio foi o que se destacou na eficácia do controle. O extrato também inibiu a esporulação gradativamente de acordo com a

concentração aplicada, isso é, quanto maior a concentração do extrato aplicado, maior a inibição da esporulação. Para as avaliações nas folhas de eucalipto, os extratos também tiveram eficácia, e essa foi de acordo com a concentração utilizada, sendo as maiores concentrações as mais efetivas. E isso ocorreu principalmente para o extrato bruto e o metanólico. Foi notável também o efeito de retardamento do crescimento das colônias e esporulação com a aplicação dos extratos.

Palavras-chave: Evaporador. Espectrofotômetro. Coluna.

ABSTRACT

CHIAPETTI, Tatiane, P. State University of Western Paraná, in February 2018. **ANTIOXIDANT AND ANTIFUNGAL ACTIVITY OF FOLIAR EXTRACTS OF *Maytenus* spp. APPLIED ON *Cylindrocladium clavatum***. Advisor: Ubirajara Contro Malavasi. Co-Advisores: Gilberto Costa Braga e Marlene de Matos Malavasi.

The leaves of the tree popularly called espinheira-santa have beneficial compounds, and these benefits are scientifically proven. The plant has antioxidant activity, antifungal activity and several other characteristics. It is very important to develop studies on vegetables that can replace the use of medicines and also pesticides, as the number of intoxications, diseases and even the resistance of microorganisms by the excessive use of drugs is increasing. The objective of the present work was to evaluate the antioxidant properties of two species of spine-santa (*Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium*) under different methods of extraction and subsequent chromatographic separation and also the evaluation of its antifungal activity against the fungus *Cylindrocladium clavatum* in eucalyptus. The extraction methods for the first work were percolation at 28 ° C for 7 days and ultrasound at different temperatures (50 ° C, 60 ° C and 70 ° C) for 15 minutes. Chromatographic separation solvents were hexane, chloroform and methanol. The antioxidant activity was evaluated by the DPPH, ABTS and FRAP methods. For the evaluation of the antifungal activity, a set of analyzes was done to verify the effectiveness of extracts of the espinheira-santa species in different ways. Firstly, the extracts applied to the fungus were incorporated in culture medium at a fixed concentration of 2000mg L⁻¹, followed by the evaluation of the minimum inhibitory concentration in 5 and 15 days, sporulation in 15 days, and the end of evaluation in eucalyptus leaves. The extract of the espinheira-santa had similar results for the two species analyzed. High levels of antioxidant activity were found for all the tests performed and this occurred mainly in extraction with lower temperature. The extracts that stood out most in antioxidant activity were the crude extracts and extracts obtained with solvent methanol in the chromatography, for all the methods of evaluation of the antioxidant activity. In the evaluations of the antifungal activity it was observed that all the extracts in fixed concentrations of 2000 mg L⁻¹ and later of 500 mg L⁻¹ were effective in controlling the fungus. In the evaluation of the minimum inhibitory concentration the extract obtained with chloroform solvent was the one that stood out in the effectiveness of the control. The extract also inhibited sporulation gradually according to the concentration applied, that is, the higher the concentration of the extract applied, the greater the inhibition of sporulation. For the evaluations in the eucalyptus leaves, the extracts were also effective, and this was according

to the concentration used, with the highest concentrations being the most effective. And this occurred mainly for the crude extract and the methanolic. It was also noticeable the effect of delay of the growth of the colonies and sporulation with the application of the extracts.

Keywords: Evaporator. Spectrophotometer. Column.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1– ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DPPH DE FRAÇÕES EXTRAÍDAS DE FOLHAS DAS ESPÉCIES <i>M. ILICIFOLIA</i> (A) E <i>M. AQUIFOLIUM</i> (B) POR DIFERENTES MÉTODOS.....	22
FIGURA 2– ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ABTS DE FRAÇÕES EXTRAÍDAS DE FOLHAS DAS ESPÉCIES <i>M. ILICIFOLIA</i> (A) E <i>M. AQUIFOLIUM</i> (B) POR DIFERENTES MÉTODOS.....	25
FIGURA 3 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE FRAP DE FRAÇÕES EXTRAÍDAS DE FOLHAS DAS ESPÉCIES <i>M. ILICIFOLIA</i> (A) E <i>M. AQUIFOLIUM</i> (B) POR DIFERENTES MÉTODOS.....	26
FIGURA 4 – DIÂMETRO DO TAMANHO DA COLÔNIA (MM) DE <i>CYLINDROCLADIUM CLAVATUM</i> APÓS 5 DIAS DE INCUBAÇÃO PARA OS EXTRATOS E SUAS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES TESTADAS. ...	39
FIGURA 5 – TAMANHO DA COLÔNIA (MM) DE <i>CYLINDROCLADIUM CLAVATUM</i> APÓS 15 DIAS DE INCUBAÇÃO PARA OS EXTRATOS E SUAS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES TESTADAS.	41
FIGURA 6 – MÉTODO DE AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PARA AS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE UM EXTRATO JUNTAMENTE COM A TESTEMUNHA (5 DIAS).....	42
FIGURA 7 – ESPOROS ENCONTRADOS NAS COLÔNIAS DE <i>CYLINDROCLADIUM CLAVATUM</i> APÓS 15 DIAS DE INCUBAÇÃO PARA OS EXTRATOS E SUAS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES TESTADAS. ...	44
FIGURA 8 – ÁREA FOLIAR LESIONADA (%) CAUSADA POR <i>CYLINDROCLADIUM CLAVATUM</i> APÓS 5 DIAS DE INCUBAÇÃO PARA OS EXTRATOS E SUAS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES TESTADAS..	46
FIGURA 9 – FOLHAS APÓS INCUBAÇÃO.	47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – QUANTIDADE DE MATÉRIA RESULTANTE DE CADA MÉTODO DE EXTRAÇÃO E DOS SEUS RESPECTIVOS EXTRATOS CROMATOGRÁFICOS.....	20
TABELA 2 - EQUAÇÕES PARA AS CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS APLICADOS SOB O FUNGO CYLINDROCLADIUM CLAVATUM PARA AS DUAS ESPÉCIES TESTADAS NA AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E INCUBAÇÃO EM 5 DIAS.	40
TABELA 3 - EQUAÇÕES PARA AS CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS APLICADOS SOB O FUNGO CYLINDROCLADIUM CLAVATUM PARA AS DUAS ESPÉCIES TESTADAS NA AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E INCUBAÇÃO EM 15 DIAS.	42
TABELA 4 – EQUAÇÕES DE REGRESSÃO LINEAR PARA AS CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS APLICADOS SOB O FUNGO CYLINDROCLADIUM CLAVATUM PARA AS DUAS ESPÉCIES TESTADAS NA AVALIAÇÃO DA ESPORULAÇÃO E INCUBAÇÃO EM 15 DIAS.	45
TABELA 5 – EQUAÇÕES DE REGRESSÃO LINEAR PARA AS CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS APLICADOS SOB O FUNGO CYLINDROCLADIUM CLAVATUM PARA AS DUAS ESPÉCIES TESTADAS NA AVALIAÇÃO DO CONTROLE EM FOLHAS DE EUCALIPTO, AVALIADAS EM 15 DIAS.	47

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Espinheira-santa.....	3
2.2 Fitoquímica.....	4
2.3 Compostos fenólicos e a atividade antioxidante.....	5
2.3.1 Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) ou Radicais Livres	6
2.4 Fungos	6
2.5 <i>Cylindrocladium</i> spp.	7
2.6 Eucalipto.....	8
2.7 Dados de doenças de eucalipto em viveiros	9
2.8 Doenças causadas por <i>cylindrocladium</i> spp. em eucalipto.....	10
2.9 Agrotóxico e controle aleternativo	11
2.9.1 Uso de Extratos Vegetais no Controle de Fungos	12
2.9.2 Uso de Espinheira-santa no Controle de Fungos.....	13
ARTIGO 1 – MÉTODO DE EXTRAÇÃO E DO SOLVENTE DE SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ESPINHEIRA-SANTA ..	15
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
2.1 Material vegetal.....	18
2.2 Extração	18
2.3 Separação e purificação em cromatografia de coluna aberta	18
2.4 Captura do radical livre abts ⁺	19
2.5 Captura do radical livre dpsh	19
2.6 Método de redução do ferro (frap)	19
2.7 Análise estatística	20
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4. CONCLUSÕES	28
REFERÊNCIAS	29
ARTIGO 2 - CONTROLE DE <i>Cylindrocladium clavatum</i> EM EUCALIPTO COM EXTRATOS DE FOLHAS DE ESPINEHIRA SANTA	31
1. INTRODUÇÃO.....	33

2. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
2.1 Material vegetal.....	34
2.2 Extração.....	34
2.3 Cromatografia em coluna aberta.....	34
2.4 Avaliação da atividade antifúngica dos extratos sob <i>Cylindrocladium clavatum</i>	35
2.5 Avaliação da concentração inibitória mínima.....	35
2.6 Avaliação da esporulação.....	35
2.7 Avaliação do controle de <i>cylindrocladium clavatum</i> em folhas de eucalipto.....	36
2.8 Análise estatística.....	36
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
3.1 Avaliação da atividade antifúngica sob <i>Cylindrocladium clavatum</i>	37
3.2 Avaliação da concentração inibitória mínima.....	37
2.4 Avaliação do controle de <i>cylindrocladium clavatum</i> em folhas de eucalipto.....	45
4. CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS.....	49
CONCLUSÕES GERAIS.....	51
REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO GERAL

O uso popular de plantas tem sido referência para a descoberta de novos princípios ativos de interesse farmacológico e agrônômico, tanto para o uso natural, como industrial para a síntese de moléculas análogas. Substâncias como a digoxina, reserpina e efedrina são exemplos de fármacos bem estabelecidos a partir de vegetais (KROGH, 1996).

As plantas medicinais são uma fonte importantíssima de substâncias fungicidas e fungitóxicas, que quando comparadas com produtos sintéticos são consideradas propostas ecológicas e praticamente inofensivas ao meio ambiente (STANGARLIN et al., 1999), o que pode ser uma alternativa ao uso desenfreado de químicos que tem causado agressão ao meio ambiente por desequilíbrio ecológico em diversas regiões.

Essas preocupações elevam o número de pesquisas acerca de alternativas responsáveis, viáveis e seguras no controle de pragas e doenças que atacam plantas de interesse comercial (CUNICO et al., 2002). Com isso os métodos naturais voltam à tona para que se possa contornar os estragos já causados ao meio ambiente.

Mesmo depois de muitos anos de pesquisas existem inúmeras famílias de plantas ainda sendo descobertas quanto às suas propriedades químicas, botânicas, farmacológicas e outros. Da família *Calastraceae*, o gênero *Maytenus* possui cerca de 80 espécies no Brasil. Entre elas *Maytenus ilicifolia* (Mart. ex Reissek) e *M. aquifolium* (Mart.), também conhecidas por espinheira-santa, cancorosa e cancorosa-de-sete-espinhos estão entre as mais populares, e são quimicamente caracterizadas pela presença de triterpenos, alcaloides, taninos e flavonoides (JORGE et al., 2004), com potenciais propriedades farmacêuticas.

Segundo os autores Shaidi e Naczki (1995), não há método de extração com utilização de solventes que seja satisfatório para todos as moléculas de antioxidantes presentes no vegetal, e isso é devido a vários fatores. A natureza desse composto dentro dos alimentos varia muito e suas quantidades também. Alguns desses complexos, assim como alguns fenólicos com alto peso molecular, são altamente insolúveis em água. No entanto, os extratos sempre têm mistura de substâncias fenólicas de diferentes classes que são solubilizadas no solvente do sistema escolhido. Estágios adicionais podem ser necessários para purificar o isolado e remover substâncias fenólicas e não-fenólicas indesejáveis. Os solventes mais utilizados para a extração destes compostos são metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila, propanol, dimetilformaldeído e suas combinações.

Dentro das propriedades da espinheira-santa engloba-se as atividades medicinais e antimicrobianas. No uso popular, acredita-se que ela possa combater diversas doenças como gastrites e dispepsias. Essas espécies também possuem ação tônica, analgésica, antisséptica, cicatrizante, dentre outras (SANTOS-OLIVEIRA; COULAUD-CUNHA; COLAÇO, 2009).

As propriedades antifúngicas da espinheira-santa já são conhecidas e amplamente utilizadas como fármacos para seres humanos. No entanto, é importante o estudo acerca de sua utilização na proteção de plantas cultivadas contra fitopatógenos (NEGRI, et al., 2009).

Dentre tantas as doenças causadas por inúmeros patógenos, que se modificam pela resistência adquirida aos já utilizados agrotóxicos, o fungo *Cylindrocladium clavatum* é um importante patógeno responsável por inúmeras doenças em espécies florestais, como o Eucalipto. As doenças causadas são “Damping-off”, podridões de raiz, podridões de estacas e manchas foliares (KRUGNER, 1997).

Para o controle de doenças em geral, principalmente as fúngicas, é comum que se tome medidas culturais. Essas medidas incluem práticas como manejo das condições do solo, ar, temperatura, umidade, condições do solo como a fertilidade, pH e textura, para que desfavoreça o patógeno e aumente a resistências das plantas. No entanto, as doenças não possuem as mesmas características e o que não é bom para uma, pode ser bom para outra. Porém generalizações podem ser feitas. Por exemplo, ao selecionar os fungos, umidade alta do solo ou alta umidade relativa do ar são os fatores que mais causam o desenvolvimento desses microrganismos. Sendo assim, é necessário um cuidado maior no que diz respeito essas variáveis (KRUGNER, 1976). Apesar desses cuidados, a doença muitas vezes ocorre e então são necessárias outras medidas de controle.

Os controles feitos em *Cylindrocladium* spp. são utilizados desde antigamente, já que esse é um fungo que causa as mais diversas doenças e perdas significantes nas produções de espécies florestais. Acerca do controle químico, podem ser feitos com fumegantes do solo ou fungicidas específicos (KRUGNER, 1976). Os princípios ativos utilizados para o controle desse fungo são azoxystrobin, triadimenol, boscalid, pyraclostrobin, dentre outros (FERREIRA; ALFENAS; MAFFIA; MAFIA, 2006).

Devido ao uso excessivo de agrotóxico e sabendo do mal que este causa para o meio ambiente e seus efeitos colaterais, e os benefícios da espinheira-santa, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antioxidante de *Maytenus ilicifolia* a *Maytenus aquifolium*, sob diferentes métodos de extração e solventes de separação em cromatografia de coluna aberta e também avaliar a atividade antifúngica dos extratos obtidos a partir da separação cromatográfica sob o fungo *Cylindrocladium clavatum*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESPINHEIRA-SANTA

A espinheira-santa, com nome científico *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss e *Maytenus aquifolium* Mart. é uma árvore ramificada desde a sua base e tem em média 5 m de altura em plantas adultas. Também são conhecidas como cancorosa no Paraná e como espinheira-divina, erva cancorosa, erva-santa no Rio Grande do Sul. Essas espécies pertencem à família *Calastraceae* (a mesma da família *aquifoliaceae* a qual também faz parte *Ilex paraguariensis*). Ocorrem em solos álicos, com saturação em bases trocáveis baixa e em solos eutróficos (BENEDETTI et al., 2009). A família engloba 50 gêneros e 800 espécies, sendo que no Brasil ocorrem 77 dessas espécies. Destas 77, 43 são encontradas no Brasil extra-amazônico e apenas 6 são exclusivas ou mais abundantes na região subtropical (BENEDETTI, 2009).

Esta espécie é descrita por Carvalho-Okano (1992) como:

Subarbusto ou árvore ramificado desde a base, medindo cerca de 5,0 m de altura. Ramos novos glabros angulosos, tetra ou multicarenados. Folhas congestas, coriáceas, glabras; pecíolo com 0,2 a 0,5 cm de comprimento; estípulas inconspícuas; limbo com 2,2 a 8,9 cm de comprimento e 1,1-3,0 cm de largura; nervuras proeminentes na face abaxial; forma elíptica ou estreitamente elíptica; base aguda a obtusa; ápice agudo a obtuso, mucronado ou aristado; margem inteira ou com espinhos em número de 1 a vários, distribuídos regular ou irregularmente no bordo, geralmente concentrados na metade apical de um ou de ambos semilimbos. Inflorescências em fascículos multifloros. Pedicelos florais com 0,2 a 0,5 cm de comprimento. Sépalas semicirculares, ciliadas, com cerca de 0,1 cm de comprimento, Pétalas ovais, inteiras, com cerca de 0,22 cm de comprimento e 0,2 cm de largura. Estames com filetes achatados na base. Estigma capitado, séssil ou com estilete distinto; ovário saliente ou totalmente imerso no disco carnosos. Fruto cápsula bivalvar, orbicular; pericarpo maduro de coloração vermelho-alaranjada (CARVALHO-OKANO, 1992, p.169).

Este nome, espinheira-santa, é pelo fato das folhas possuírem bordas com espinhos e por possuir efeitos medicinais. Sua origem é do sul do Brasil, porém é encontrada no Chile, Paraguai, Argentina e Uruguai (NEGRI et al., 2009).

Esta espécie apresenta propriedades medicinais para gastrite e úlcera gástrica que são comprovadas pelo CEME (Central de Medicamentos) e do Ministério da Saúde do Brasil. Devido ao seu alto valor medicinal, tem sido bastante explorada e isso tem levado a um extrativismo predatório, gerando com isso a perda da variabilidade genética. Sendo assim ela é considerada uma espécie prioritária para a conservação e coleta (CHABARIBERI et al., 2009).

Estudos revelam que *M. ilicifolia* contém compostos bioativos com ação anti-tumoral e anti-leucêmica em doses baixas. O emplastro das folhas e o decocto para lavagens é usado no tratamento de câncer de pele. No entanto o mais comum é a utilização para tratamento e úlceras, indigestão, gastrites crônicas e dispepsia. Extratos do caule dessa espécie apresentaram também atividade anti-fúngica, mas as folhas não apresentaram. Populações indígenas e do meio rural do Paraguai utilizam a espécie como contraceptivo e no nordeste da Argentina como abortivo (MARIOT; BARBIERI, 2007).

A espinheira-santa é encontrada, em maior parte, na Região Sul do Brasil. A época de transplante desta planta, para que se mantenha os componentes em concentrações adequadas, é na primavera, com irrigação frequente principalmente nos dois primeiros anos, e deve ser cultivada preferencialmente na sombra (SANTOS-OLIVEIRA et al. 2009).

O período de florescimento começa na primavera e continua no verão, a frutificação acontece em novembro, dezembro e janeiro. Suas sementes têm comportamento ortodoxo e perdem sua viabilidade quando em câmara fria. A forma de dispersão é principalmente por aves (CARVALHO-OKANO, 2008).

Pesquisadores como Lima et al. (1969) já comprovaram em estudos que a maitenina tem forte atividade antimicrobiana em bactérias Gram positivas. Esses efeitos foram demonstrados a partir de extratos de folhas e raízes que tem efeitos sobre patógenos como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* sp.

2.2 FITOQUÍMICA

Os tecidos dos organismos vegetais e animais são geralmente formados por acúmulos e degradações de inúmeras substâncias provenientes de processos vitais de biossíntese. Essas substâncias, principalmente as de origem vegetal, são aplicáveis a diversas áreas da alimentação e saúde, e isso tem estimulado a novas pesquisas a cerca disso. Destes compostos resultantes, podemos citar os do metabolismo primário (glicídios, protídeos e lipídios) e do metabolismo secundário (compostos terpênicos, alcaloides, glicosídeos e outros). Os

primeiros são aplicáveis principalmente na bioquímica e os outros na química de produtos naturais (MATOS, 1997).

O estudo químico das plantas pode ser desenvolvido se seguido seis etapas principais e complementares. São elas:

A escolha da planta a ser estudada;

A identificação botânica da planta estudada;

A prospecção preliminar de sua composição química;

O isolamento e purificação dos constituintes principais;

O esclarecimento da estrutura molecular dos compostos puros e isolados;

O levantamento bibliográfico sobre a espécie identificada e suas congêneres.

Cada etapa é desenvolvida com técnicas adequadas e cuidadosamente para que se atinja o objetivo final (MATOS, 1997).

2.3 COMPOSTOS FENÓLICOS E A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Por definição: “os compostos fenólicos são estruturas químicas que apresentam hidroxilas e anéis aromáticos, na forma simples ou de polímeros, o que lhes confere uma estrutura antioxidante” (GALLICE, 2010). Esses compostos também apresentam diversos efeitos biológicos, dentre eles a atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e vasodilatadora. Os compostos fenólicos são capazes de capturar os radicais livres, impedindo que se liguem a estruturas e se tornem maléficos à saúde (GALLICE, 2010).

A classificação dos compostos fenólicos pode ser em flavonoides e não flavonoides. Dentro do grupo dos flavonoides encontra-se os flavanóis (catequina, epicatequina), flavonóis (caempferol, a quercetina, a rutina e a miricetina), antocianidina, flavonas e as flavanonas. Dentro do grupo dos não flavonoides estão os ácidos fenólicos, hidroxibenzóicos, hidroxicinâmicos e os estibenos. Os compostos fenólicos podem ser encontrados nos vegetais na forma complexa ligado a açúcares (glicosilados) e proteínas, ou na forma isolada (agliconas) (GALLICE, 2010).

Na dieta humana os compostos mais abundantes encontrados são os flavonoides por estarem presentes em grande variedade de frutas, hortaliças, chá preto, entre outros. Calcula-se que existem cerca de 5000 flavonóides com estruturas diferentes (BEHLING et al., 2004; OLDONI, 2010).

Os radicais livres, ou espécies reativas de oxigênio, se formam naturalmente no metabolismo durante a realização de atividades físicas, pela exposição em excesso à luz solar

e também pelo tabagismo. Esses radicais formados são moléculas instáveis e que para se estabilizar precisam capturar elétrons de outras moléculas, e quando essas moléculas se ligam com moléculas do DNA ou outros componentes de membrana celular, causam danos biológicos. A principal patologia desencadeada por esses radicais são câncer e doenças cardiopatas (GALLICE, 2010; PINTO et al., 2011).

As moléculas antioxidantes podem ser classificadas como primárias e secundárias. As primárias fornecem aos radicais livres, elétrons ou hidrogênio ou ainda reagem com estes tornando-os moléculas estáveis. Já as secundárias agem na complexação de metais, absorção da radiação ultravioleta, sequestro do oxigênio singlete, entre outros mecanismos que retardam a iniciação da autoxidação (PINTO et al., 2011).

2.3.1 Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) ou Radicais Livres

A formação de EROS no metabolismo tanto vegetal como animal é devido à cadeia transportadora de elétrons. Nessa via o oxigênio tem sua completa redução em água e incorpora elétrons no final da cadeia. Se, durante a cadeia transportadora de elétrons, houver redução do oxigênio com menor número de elétrons, haverá formação de EROS. São exemplos de EROS o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a hidroxila (OH^{\bullet}) (SILVA E GONÇALVES, 2010).

Dentre todos os radicais formados nos organismos vivos, as EROS representam a classe mais importante. O termo radical livre não é o mais indicado pois alguns deles não apresentam elétrons desapareados em sua última camada de valência (SILVA E GONÇALVES, 2010).

No funcionamento normal do organismo, o balanço entre antioxidantes e ERRO é bem ajustado, garantindo o bom funcionamento dos órgãos. No entanto, o acréscimo ou decréscimo de agentes oxidantes pode causar um desequilíbrio, causando o chamado estresse oxidativo, que é a condição onde moléculas biológicas, como lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos são afetados, causando diversas enfermidades (SILVA E GONÇALVES, 2010).

2.4 FUNGOS

Os fungos são de grande importância econômica e ecológica, são diversificados filogeneticamente e compõe um grupo numeroso de organismos. Esse grupo, apesar de

heterogêneo, reúne características que fazem com que sejam separados de outros seres vivos e com isso compõem um reino à parte, são elas:

- a) Talo eucariótico: Distingue-se das bactérias por possuírem membrana nuclear envolvendo o material genético da célula.
- b) Heterotrofismo: Separa-se das plantas por não possuírem clorofila. Todos os fungos requerem carbono orgânico na sua nutrição, assim como os animais.
- c) Absorção de nutrientes: A absorção se dá através da parede celular das hifas, as quais constituem o talo vegetativo da maioria. Água e nutrientes são absorvidos do meio em que crescem.
- d) Formação de esporos: São unidades reprodutivas, com forma e tamanho definidos, que funcionam como seus propágulos.

A estrutura básica de reprodução dos fungos é o esporo, que é um propágulo especializado, microscópico, que contém um ou mais núcleos, capaz de gerar um novo indivíduo adulto sem necessidade de outra célula para se fundir. É o meio de dispersão mais usual (FILHO et al. 1995).

Dentro deste grande grupo, da família *Ascomycotinas*, da ordem *Hypocreales*, tem-se o gênero *Calonectria*, que é a fase teleomórfica de *Cylindrocladium*, fungo que foi estudado neste trabalho.

2.5 *Cylindrocladium* spp.

As *Ascomycotinas* constituem o grupo mais numeroso de fungos, dentro deste grupo existem cerca de 40 ordens, dentre elas, destaca-se a ordem *Hypocreales*, e desta ordem um gênero importante é a *Calonectria*, fase teleomórfica de *Cylindrocladium*, patógeno particularmente importante em espécies florestais, como agente causal de “Damping-off”, podridões de raiz, podridões de estacas e manchas foliares (DIAS, 2010).

As características taxonômicas básicas da ordem *Hypocreales* são a produção de ascomas do tipo peritécio, rostrados ou não, geralmente de coloração viva, alaranjada ou avermelhada, com textura carnosa ou cerosa, usualmente agrupados sobre ou imersos em um estroma (FILHO et al. 1995). Sua forma imperfeita está classificada como pertencente a família *Hyphomycetes*, ordem *Moniliales*, família *Moniliaceae* (DIAS, 2010).

Das doenças causadas pelos fungos *Cylindrocladium* spp., destaca-se as que atacam eucaliptos. Estas doenças são: “Damping-off” ou tombamento de mudas, podridão de estacas e miniestacas, canela preta e mancha de *Cylindrocladium* (KRUGNER, 1997). As principais

espécies dadas como apodrecedoras de estacas no Brasil são *Cylindrocladium candelabrum*, *C. parasiticum* spp. nov. Crous, Wingfield & Alfenas (sinonímia de *C. crotalariae*) (DIAS, 2010).

As espécies de *Cylindrocladium* são identificadas baseadas na morfologia e dimensões de estipe, tamanho, número de septos dos conídios e formato de vesícula. Sobrevivem como microescleródios em tecidos de plantas infectadas e em solos infestados. Ao ocorrer o contato das raízes das plântulas com os escleródios, acontece a germinação e então ocorre a infecção. Este fungo tem grande tolerância em variações de pH o que dificulta as técnicas de controle cultural em viveiros (DIAS, 2010).

Os fungos do gênero *Cylindrocladim* são destaques como patógenos de *Eucalyptus* e *Pinus*, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, isso porque as condições ambientais favorecem esse patógeno, que pode levar à morte de plantas jovens e no eucalipto, também à ocorrência de manchas foliares (DIAS, 2010).

2.6 EUCALIPTO

O eucalipto está dentro do grupo de espécies arbóreas, e tem sido amplamente utilizado devido às suas características de rápido crescimento, produtividade, ampla diversidade de espécies, grande capacidade de adaptação e utilizado para plantios florestais (MORA E GARCIA, 2000).

As primeiras mudas de eucalipto foram plantadas no Rio Grande do Sul em 1868, segundo o que se ouve, e que no mesmo ano também foram plantados exemplares em Quinta da Boa Vista, Rio de Janeiro (MORA E GARCIA, 2000).

O gênero *Eucalyptus* pertence à família das *Myrtaceas*, com aproximadamente 600 espécies e sub-espécies. Menos de 1% das 600 espécies são usadas com propósitos industriais. Sendo assim, o uso do eucalipto na indústria mundial é baseado em duas espécies: *E. globulus* e *E. grandis* (SANTOS, 2001).

O eucalipto é a árvore mais plantada no mundo, com cerca de 17,9 milhões de hectares. O Brasil é o segundo em maior área plantada, atrás da Índia, onde o plantio é de aproximadamente oito milhões de hectares, onde também a eucalipticultura é intensiva e baseada principalmente em florestas clonais formadas com materiais-elite e de elevada produtividade média, podendo atingir valores na ordem de 45-60 m³ ha⁻¹ ano⁻¹ (ALFENAS et al., 2009).

Existem muitas contradições no que diz respeito ao plantio do eucalipto, e isso é decorrente de diversos estudos que muitas vezes não podem ser comparados pois confrontam diferentes situações de solo, clima e intensidade de manejo. O incremento de 15 a 25 m³ por hectare por ano é obtido em grandes áreas de plantio em regiões de clima temperado e tropicais (MORA; GARCIA, 2000).

Começou a ser utilizado depois da descoberta do seu valor econômico, e atualmente é a principal fonte de alimentação da indústria da celulose no Brasil, o que acaba por gerar grandes discussões e até mesmo conflitos entre proprietários de terras plantadas com o eucalipto e a grande massa de migrantes sem-terra. Uma grande vantagem do eucalipto é a sua rápida difusão e o fato da planta ser capaz de se adaptar a variados climas, desde os locais quentes e secos até os muito úmidos e frios (CARDOSO, 2015).

Fatores que influenciam a produtividade dos eucaliptos:

- a) Precipitação: As árvores crescem bem em regiões de 900 a 2000 mm de precipitação.
- b) Solo: Preferência de solos profundos, drenados e sem impedimento.
- c) Adubação: Em solos brasileiros a adubação com fósforo é fundamental.
- d) Espécies: É necessário identificar a melhor procedência já que há grande variação genética.
- e) Espaçamento: Depende do seu uso final e da idade de corte.
- f) Tratos culturais: A competição com mato tem influência negativa principalmente no primeiro ano.
- g) Idade: Varia entre 5 e 7 anos a idade de corte, sendo possível efetuar 2 a 3 cortes comercialmente.
- h) Pragas: O principal problema são as formigas cortadeiras, que atacam a copa das árvores e comprometem o crescimento e em casos extremos a sobrevivência. As lagartas também atacam a copa das árvores, causando desfólia.
- i) Doenças: A principal doença é o cancro. Os fungos também atacam o tronco das árvores comprometendo o volume e a qualidade da madeira (MORA; GARCIA, 2000).

O eucalipto é atacado principalmente por fungos, desde a sua fase de viveiro até adultos. Os problemas são observados em plantações, ocorrendo nos mais variados locais, espécies e épocas do ano (SANTOS et al., 2001).

2.7 DADOS DE DOENÇAS DE EUCALIPTO EM VIVEIROS

Surto de podridão de estacas, manchas foliares e anelamento da haste tem sido registrado na maioria dos viveiros de eucalipto no país, causando significativo prejuízo. A título de exemplo, considerando o preço de mil mudas sendo R\$ 350,00 e uma produção de 100.000 estacas por dia em um viveiro médio, cada 1% de estacas mortas significam uma perda de 22.000 mudas mensais, ou seja, um prejuízo R\$ 7.000,00 (ALFENAS et al. 2009).

Em 1988, uma empresa de Minas Gerais produzia cerca de 4.000 estacas ao dia com 55% de enraizamento. A incidência de um *C. candelabrum* e *Thizoctonia* spp. acarretou na morte de estacas e o enraizamento caiu para 10%. No mesmo ano, no Espírito Santo produzia-se 160.000 estacas por dia com enraizamento 90%. Com uma água rica em matéria orgânica, pH baixo e elevados níveis de alumínio, ferro e sulfatos, o enraizamento caiu 60% (ALFENAS et al., 2009).

No ano de 2002 e 2003 foi constatado pela primeira vez a ferrugem causada por *Puccinia psidii*, em virtude disso, cerca de 2 milhões de mudas foram descartadas por uma única empresa (ALFENAS, et al. 2009).

Em 2003 a 2008 foram registradas perdas de mudas e minicepas clonais em diversos viveiros clonais do país, gerando um total de 14,5 milhões de reais, em consequência de bacteriose foliar causada por *X. axonopodis* (ALFENAS et al., 2009).

Em 2005 houve perdas elevadas de mudas no Brasil em resultado da murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum* em viveiros clonais de eucalipto. Houve o descarte de cerca de 553.991 minicepas e 11.266.918 mudas, resultando em um prejuízo de no mínimo 6 milhões de reais (ALFENAS et al., 2009).

2.8 DOENÇAS CAUSADAS POR *Cylindrocladium* spp. EM EUCALIPTO

Várias doenças têm surgido devido ao aumento da eucaliptocultura no Brasil. Essas doenças atacam em fases de produção de mudas em viveiro e após o plantio no campo (ALFENAS et al., 2009).

Das doenças causadas por *Cylindrocladium* spp. em eucalipto, podemos citar:

- a) Tombamento de mudas: Pode ocorrer em pós ou pré-emergência. O patógeno ataca as sementes antes e em germinação (que pode ser confundido com baixa taxa de germinação (ALFENAS et al., 2009), destruindo-as, e as plântulas recém emergidas, atacando tecidos tenros e suculentos. O sintoma típico é a lesão na região do colo da muda, a qual pode se estender a alturas variáveis no hipocótilo, com aspecto encharcado de início e depois adquirindo coloração escura. A destruição do tecido

acaba provocando o tombamento da muda e sua morte (KRUGNER, 1997). As condições favoráveis para essa doença são as condições precárias de higiene, fechamento de canteiros e elevada umidade e temperatura. O controle é feito por técnicas de manejo visando a redução ou erradicação de fontes do inóculo e minimizar as condições favoráveis (ALFENAS et al., 2009).

- b) Podridão de estacas e miniestacas (Podridão de *Cylindrocladium*): causa uma minilesão escura que progride da base ao ápice da estaca. A lesão avança sobre os tecidos, induzindo a morte das gemas, impedindo o enraizamento e escurecendo a estaca por completo (KRUGNER, 1997). Menos frequente observa-se estruturas globosas de cor alaranjada a vermelha. As fontes de inóculos são água contaminada, tubetes e bandejas contaminados e brotações doentes. As condições favoráveis são a falta de higiene, dias nublados, temperatura alta e umidade elevada (ALFENAS et al., 2009).
- c) Mancha de *Cylindrocladium* e Canela preta: Caracterizada pela formação de lesões necróticas escuras, muitas vezes deprimidas, nos tecidos do caule e das mudas. Com o desenvolvimento da lesão, a haste poderá ser estrangulada provocando a morte das partes situadas acima da lesão (KRUGNER, 1997). Tem forma, tamanho e coloração variada dependendo da espécie de *Eucalyptus*, de *Corymbia*, de *Cylindrocladium* e das condições ambientais. Os brotos não são atingidos, o que permite a recuperação das plantas (KRUGNER, 1997). Denomina-se canela preta devido as características sintomatológicas, ou seja, lesões escuras no caule. As condições favoráveis são a precipitação e umidade relativa do ar elevadas, molhamento do filoplano, temperatura alta e abafamento das mudas.

2.9 AGROTÓXICO E CONTROLE ALTERNATIVO

O uso desenfreado de agrotóxicos para o controle de pragas tem causado diversos problemas e desordem ambiental, como a contaminação de solo, água, alimentos, animais, a intoxicações, indução da resistência dos patógenos dentre outros inúmeros problemas. Em contrapartida, a utilização dos agrotóxicos é muito atraente, pela simplicidade, necessidade de poucos conhecimentos acerca dos processos do agroecossistema e previsibilidade (BETTIOL, 2008).

A preocupação da sociedade com a agricultura no ambiente e a contaminação da cadeia alimentar está mudando o cenário agrícola. O resultado disso são mercados de alimentos que garantem o uso correto ou a não utilização de agrotóxicos. Das alternativas para

a substituição do uso do agrotóxico podemos citar o controle biológico, manejo adequado dos recursos naturais (BETTIOL E GHINI, 2003).

O estudo de novas alternativas para a substituição dos agrotóxicos impulsionou a utilização de metabólitos naturais, produzidos pelas plantas naturalmente. Sendo assim cresceu a busca por espécies com metabólitos interessantes para o controle de doenças e que sejam de fácil obtenção (MILAN, 2015).

Os fungicidas retirados de vegetais são utilizados a séculos. A anos que se nota um aumento das pesquisas acerca de novos metabólitos em diversos países (DIGRAK et al., 1999; SATO et al., 2000; SILVA et al., 2001; CARRÉ et al., 2002). Para tais pesquisas leve-se em consideração a diversidade de substâncias e a possibilidade de encontrar novas substâncias. Essas substâncias devem ser de fácil acesso do produtor, cultivo, preparo e aplicação.

2.9.1 Uso de Extratos Vegetais no Controle de Fungos

O trabalho realizado por Souza et al. (2007) objetivou avaliar a atividade antifúngica em concentrações diferentes de extratos de alho e capim-santo, tendo em vista o controle de *F. proliferatum* em sementes de milho, além de observar os efeitos dos tratamentos sobre a germinação de sementes, sanidade e desenvolvimento das plântulas. Os autores obtiveram como resultados extratos que reduziram a taxa de crescimento micelial e a germinação dos esporos, assim como reduziram também a incidência de *F. proliferatum* nos grãos de milho. A concentração de 2,5% foi a mais eficiente. A germinação das sementes aumentou e conseguiu-se controlar o tombamento e podridão do colmo.

Os autores Celoto et al. (2008) avaliaram o efeito fungitóxico de extratos vegetais de 22 espécies de plantas, obtidos com etanol e água, sobre o crescimento micelial e a germinação de esporos de *Colletotrichum gloeosporioides*. Ao meio de cultura BDA foi incorporado 20% dos extratos e 50% de suspensão de esporos. A percentagem de inibição da germinação de esporos (PIG) e a porcentagem de inibição micelial (PIC) foi avaliada. Maiores PIC foram observados em extratos aquoso e hidroetanólico de melão-de-são-caetano e extrato hidroetanólico de eucalipto. A germinação de esporos foi inibida em mais de 90% com extratos aquosos de *Luffa acutangula* (L.) Roxb., *Eucalyptus citriodora* (*Corymbia citriodora* (Hook.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson), *Chenopodium ambrosioides* (L.) Spach e

Bauhinia spp., e os extratos hidroetanólicos de *Ruta graveolens* L. (*Rutaceae*), *Eucalyptus citriodora*, *Zingiber officinale* Rosk. e *Chenopodium ambrosioides*.

Em pesquisa realizada por Cunico et al. (2002), foi estudada a atividade antifúngica de extrato de *Maytenus ilicifolia* etanólico sobre o crescimento micelial de fungos patogênicos *Colletotrichum acutatum*, *Fusarium oxysporum* e *Cylindrocladium spathulatum*. Foram desenvolvidos em BDA com adição dos extratos. Observou-se que os extratos inibiram em 10% o crescimento micelial de *F. oxysporum* nas três concentrações utilizadas (0,2; 0,4 e 0,6 mg mL⁻¹), estimulou o crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum* em mais de 30% na concentração de 0,2 mg mL⁻¹ e algumas frações inibiram o desenvolvimento de *Cylindrocladium spathulatum*.

Salustiano et al. (2006) avaliaram a atividade de extratos de folhas e de óleo essencial da candeia sobre a germinação de urediniósporos ferrugens *Puccinia psidii*, *Hemileia vastatrix*, *Phakopsora pachyrhizi*, e *Cerotelium fici* e sobre o crescimento micelial de *Cylindrocladium scoparium*. Como resultado, apenas os urediniósporos da testemunha germinaram. *C. scoparium* teve inibição do crescimento micelial maior no extrato metanólico com redução da produção de esporos. Os tratamentos chá a 10% e óleo essencial a 1% reduziram (25%) o crescimento micelial de 28 a 34% produção de esporos, respectivamente.

2.9.2 Uso de Espinheira-santa no Controle de Fungos

Existem relatos do uso da espinheira-santa como substância antimicrobiana há bastante tempo, como o estudo de Lima et al. (1996) que demonstrou que a maitenina tem forte atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas.

Anuk et al. (1999) demonstraram que taninos gálicos podem inibir o crescimento de bactérias pela capacidade da modificação da permeabilidade da parede celular.

De acordo com Mabe et al. (1999) os taninos derivados da catequina possuem atividade contra *H. pylori*.

Os autores Singh e Dubey (2001) contribuíram com estudos acerca da friedelina e friedelan-3-B-ol, demonstrando que esses compostos possuem atividade antimicrobiana sobre *S. aureus*, *E. coli* e *Aspergillus niger*.

Os autores Cunico et al. (2002) testaram a inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* e obtiveram uma taxa de 10% de inibição. Juntamente nesse estudo o extrato de folhas de espinheira-santa inibiu o desenvolvimento de *Colletotrichum acutatum* e estimulou o crescimento micelial de *Cylindrocladium spathulatum*.

Em estudos realizados por Portillo et al. (2001), extratos do caule de *M. ilicifolia* demonstraram propriedades fungicidas em *Microsporum gypseum* e *Trichophyton mentagrophytes*.

ARTIGO 1 – MÉTODO DE EXTRAÇÃO E DO SOLVENTE DE SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ESPINHEIRA-SANTA

RESUMO

A bioatividade das folhas da espinheira-santa pode ser melhor avaliada através de processos de purificação com solventes. A forma como é feita a extração influencia os teores dos compostos extraídos. Para que se otimize esse processo, são necessárias pesquisas acerca de variáveis como solventes, temperatura e tempo de extração. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antioxidante de extratos e frações purificadas de folhas de duas espécies de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* e *M. aquifolium*). Os métodos de atividade antioxidante utilizados foram captura do radical livre ABTS^{•+}, captura do radical livre DPPH e FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*). Os métodos de extração utilizados foram percolação a 28 °C por 7 dias e ultrassom a 50, 60 e 70 °C por 15 minutos. A Cromatografia em coluna aberta (sílica gel) foi utilizada para o fracionamento dos extratos e foram utilizados os solventes hexano, clorofórmio e metanol. Os métodos de extração que mais se destacaram em teor de atividade antioxidante foram a percolação e a ultrassom a 50 °C. As espécies comparadas não tiveram diferenças significativas entre si para o DPPH e FRAP. Os extratos obtidos com a cromatografia tiveram diferenças significativas para todas as avaliações, sendo o extrato bruto total e o extrato obtido com metanol os que resultaram em maiores teores de atividade antioxidante. O extrato que resultou em menor teor de atividade antioxidante foi o hexano. O solvente que se destacou na separação por cromatografia foi o solvente metanol, o que denota caráter de maior polaridade para esses compostos extraídos devido à afinidade com esse solvente, e teve resultados muito semelhantes com o extrato bruto total.

Palavras chave: Propriedades Farmacêuticas; Cromatografia; *Maytenus ilicifolia*; *Maytenus aquifolium*.

ABSTRACT

The bioactivity of the leaves of the hawthorn can be better evaluated through solvent purification processes. The extraction process influences the contents of the extracted compounds. In order to optimize this process, research is required on variables such as solvents, temperature and extraction time. The objective of this work was to evaluate the antioxidant activity of extracts and purified fractions of leaves of two species of espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*). The antioxidant activity methods used were the capture of free radical ABTS•+, capture of free radical DPPH and FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). The extraction methods used were percolation at 28 °C for 7 days and ultrasound at 50, 60 and 70 °C for 15 minutes. Open column chromatography (silica gel) was used to fractionate the extracts and the hexane, chloroform and methanol solvents were used. The extraction methods that most stood out in terms of antioxidant activity were percolation and ultrasound at 50 ° C. Compared species did not have significant differences between themselves for DPPH and FRAP. The extracts obtained with the chromatography had significant differences for all the evaluations, being the total crude extract and the extract obtained with methanol which resulted in higher levels of antioxidant activity. The extract that resulted in lower content of antioxidant activity was hexane. The solvent that stood out in the chromatographic separation was the solvent methanol, which denotes higher polarity character for these extracted compounds due to the affinity with that solvent, and had very similar results with the total crude extract.

Keywords: Pharmaceutical Properties; Chromatography; *Maytenus ilicifolia*; *Maytenus aquifolium*.

1. INTRODUÇÃO

Maytenus ilicifolia (Mart. ex Reissek) e *M. aquifolium* (Mart.) são espécies de espinheira-santa nativas do Brasil. As suas folhas possuem propriedades farmacêuticas comprovadas contra doenças do estômago como úlceras gástricas e gastrite (NEGRI; POSSAMAI; NAKASHIMA. 2009; SOUZA et al., 2008). Na sua composição são encontrados alcaloides, polifenóis, diterpenos, triterpenos friedelanos entre outros (CUNICO et al., 2002).

Os compostos fenólicos são os principais agentes antioxidantes vegetais que, em conjunto com outros agentes redutores nutricionais, como vitaminas C, E e carotenoides, protegem as células contra danos oxidativos, prevenindo o corpo contra o risco de várias doenças degenerativas associadas ao estresse oxidativo. Na medicina popular o uso da espinheira-santa é feito a partir das folhas secas, na forma de chá (MARIOT; BARBIERI, 2007).

A extração, ou purificação, de compostos fenólicos de matrizes vegetais é influenciada por diversos fatores, como o método utilizado, o tamanho das partículas, o tempo de procedimento e a presença de substâncias interferentes. Os compostos fenólicos podem ter diferentes grupos hidroxila que podem ser conjugados com açúcares, ácidos ou grupos alquila. Consequentemente, as polaridades dos compostos fenólicos variam muito e é difícil desenvolver um método único e eficiente para todos os compostos fenólicos. Portanto, a otimização do processo de extração é fundamental para uma avaliação precisa (MOKRANI; MADANI, 2016).

A busca por plantas com propriedades medicinais é crescente, e surge a necessidade de padrões metodológicos de extração que otimizem a recuperação de compostos retirados. Para isso, deve-se levar em consideração as variáveis como tempo e temperatura de extração e tipo de solvente (TIWARI et al., 2011; ATL, 2016), que podem interferir na composição e na bioatividade de extratos das folhas da espinheira-santa. Uma vez que espécies vegetais de um mesmo gênero podem conter compostos diferentes, é possível que estes compostos sejam melhor avaliados e comparados através de processos de separação e purificação por cromatografia convencional de coluna aberta com diferentes solventes de eluição.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos métodos de extração e também do solvente de separação cromatográfica na atividade antioxidante de *M. ilicifolia* e *M. aquifolium*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL

As amostras de folhas de *M. ilicifolia* (Mart. ex Reissek) e *M. aquifolium* (Mart.) foram coletadas em Marechal Cândido Rondon, Paraná, Brasil (24°33'29.7"S 54°02'44.0"W), no período de junho a setembro de 2017. As folhas foram coletadas de três plantas cultivadas em casa de vegetação com tela de sombreamento e turno diário de duas irrigações. As folhas foram coletadas manualmente com mesmo tamanho e coloração de várias porções da folhagem e acondicionadas em sacos plásticos para transporte até o laboratório, onde foram higienizadas com solução de hipoclorito a 2% e secas a temperatura de 28 °C até que não se observasse umidade na superfície da folha. Em seguida, as folhas foram desidratadas em estufa com circulação de ar a 55 °C, por três dias e moídas em moinho de facas (TE-680, Wiley) e o pó foi colocado em saco plástico e refrigerado.

2.2 EXTRAÇÃO

O Extrato Bruto Total (EBT) foi preparado por dois métodos de extração sólido-líquido: (1) percolação (7 dias) em temperatura ambiente (28°C) e (2) ultrassom (15 min) com temperaturas diferentes (50, 60 e 70 °C). A proporção sólido-líquido foi de 10% (p/v). Foi utilizado solvente extrator hidroetanólico a 80%. Depois de finalizada a extração, o solvente extrator foi evaporado sob pressão reduzida (50 °C, 55 rpm). Em seguida os extratos brutos secos foram pesados em balança analítica para a determinação do rendimento de extração, e depois foram rediluídos em hexano (2,0 mg mL⁻¹) e armazenados em temperatura de 8 °C. Todos os extratos foram preparados em triplicata.

2.3 SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO EM CROMATOGRAFIA DE COLUNA ABERTA

Utilizou-se coluna cromatográfica de vidro de 20 cm de comprimento e 2,0 cm de diâmetro empacotada com adsorvente sílica gel 70-230 mesh. No topo da coluna foram colocados areia, algodão e a amostra a ser separada. Os solventes da fase móvel foram, nesta sequência de eluição, hexano, clorofórmio e metanol. Essa sequência foi escolhida devido à escala de polaridade, do menos polar para o mais polar. As frações foram coletadas por coloração. Cada fração coletada foi evaporada sob pressão reduzida (50 °C, 55 rpm) e os

pesos secos registrados. Depois, cada fração seca foi diluída em etanol 80% e armazenada em temperatura de 8 °C para posteriormente realizar as análises de atividade antioxidante.

2.4 CAPTURA DO RADICAL LIVRE ABTS^{•+}

O ABTS^{•+} foi obtido segundo metodologia descrita por Re et al. (1999) com algumas modificações, no qual o método inicia-se a partir da reação de 7 mM de ABTS com 140 mM de persulfato de potássio, com incubação à temperatura ambiente na ausência de luz durante 16 h. Em seguida, diluiu-se a solução em etanol 100% juntamente ao espectrofotômetro para que se alcançasse absorvância de $0,700 \pm 0,200$ medida em 734 nm. Em tubos de ensaio foram adicionados 30 µL de amostras e 3 mL da solução contendo o radical. Após 6 min de reação a absorvância foi determinada em espectrofotômetro, a 734 nm. Para a construção da curva padrão utilizou-se o antioxidante sintético Trolox nas concentrações de 100 a 1500 µmol. Os resultados foram expressos em µmol Eq. Trolox g⁻¹.

2.5 CAPTURA DO RADICAL LIVRE DPPH

A solução de trabalho foi obtida segundo metodologia descrita por Brand-Williams et al. (1995) com modificações, que consiste na adição de 0,5 mL dos padrões ou das amostras previamente diluídas, seguido de 3,0 mL de etanol 50% (v/v), 0,3 mL do radical DPPH, em solução de etanol (0,5 mmol L⁻¹), com reação por 45 min em temperatura de 28 °C e ao abrigo da luz. Após o tempo de reação a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 517 nm. Para o controle negativo, o volume do extrato foi substituído por solvente da extração (etanol 80%). Preparou-se o branco substituindo o volume da solução de DPPH por igual volume de etanol. A curva foi preparada com o antioxidante sintético Trolox em concentrações que variaram de 20 a 140 µmol de Trolox. Os resultados foram expressos em mg Eq. Trolox g⁻¹.

2.6 MÉTODO DE REDUÇÃO DO FERRO (FRAP)

Segundo metodologia descrita por Benziel e Strain (1996) com algumas modificações. O reagente FRAP foi preparado, no qual 25 mL de uma solução de tampão acetato (300 mM, pH 3,6), 2,5 mL da solução TPTZ (10 mM TPTZ em 40 mM HCl) e 2,5 mL de FeCl₃ (20 mM) em solução aquosa são misturados. Em tubo de ensaio adicionou-se uma

alíquota de 100 μL da amostra previamente diluída a 3 mL do reagente FRAP e deixou-se reagir a 37°C em banho-maria por 30 minutos. Após o tempo de reação a absorbância foi medida espectrofotômetro a 595 nm, sendo zerado com a solução FRAP. A curva padrão foi feita com sulfato ferroso nas concentrações 2 – 12 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol sulfato ferroso g}^{-1}$.

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi aplicado teste de normalidade e homogeneidade nos dados para que se eliminasse maiores margens de erros. O delineamento experimental foi um fatorial composto por quatro métodos de extração, quatro extratos e duas espécies. Quando pertinente, as médias foram comparadas com o teste de Tukey a 95% de confiança utilizando o Sisvar (FERREIRA, 2011) juntamente com Excel (Microsoft, 2010).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As folhas de *M. ilicifolia* e *M. aquifolium* foram submetidas aos quatro métodos de extração etanólica (percolação a 28 °C por 7 dias, ultrassom por 15 minutos em 50 °C, 60 °C e 79 °C) resultando no extrato bruto total (EBT), seguida de fracionamento por separação cromatográfica de coluna aberta, a qual resultou em 3 extratos (hexano, clorofórmio e metanol). A partir dos métodos de extração foram calculados os rendimentos de material vegetal obtido em cada um deles (Tabela 1).

O método que resultou em maiores rendimentos foi o método com ultrassom a 70 °C, seguido de ultrassom a 60 °C. Maiores temperaturas renderam maiores teores em rendimento de matéria. Esse rendimento não corrobora com os rendimentos em teores de atividade antioxidante assim como não corrobora com os teores de atividade antifúngica, como apresentado no Artigo 2.

Os extratos que tiveram maiores rendimentos foram o EBT, seguido de hexano, clorofórmio e metanol. A análise estatística dos rendimentos foi feita em fatorial tripla, mas no intuito de facilitar o entendimento, a Tabela 1 foi feita em fatorial duplo (4 métodos x 4 extratos). A espécie *M. aquifolium* teve teores superiores em rendimentos à *M. ilicifolia*.

Tabela 1 – Quantidade de matéria resultante de cada método de extração e dos seus respectivos extratos cromatográficos em função da espécie.

Rendimentos dos extratos (g)
Extratos cromatográficos**

Métodos	EBT*	Hexano	Clorofórmio	Metanol
<i>Maytenus ilicifolia</i>				
Percolação	0,25 dA	0,125 cB	0,075 dC	0,075 bC
Ultrassom 50	0,395 cA	0,265 bB	0,125 cC	0,085 bD
Ultrassom 60	0,485 bA	0,265 bB	0,185 aC	0,075 bD
Ultrassom 70	0,73 aA	0,485 aB	0,158 bC	0,115 aD
<i>Maytenus aquifolium</i>				
Percolação	0,285 dA	0,25 bB	0,175 bC	0,08 bD
Ultrassom 50	0,405 cA	0,275 bB	0,125 bC	0,085 bD
Ultrassom 60	0,51 bA	0,245 bB	0,179 bC	0,065 bD
Ultrassom 70	0,74 aA	0,385 aB	0,185 aC	0,105 aD

*Extrato bruto total: Extrato obtido diretamente do método de extração. ** Extratos obtidos a pela separação cromatográfica do extrato bruto. Médias seguidas da mesma letra, minúsculas, na coluna, não diferem entre si. Médias seguidas da mesma letra, maiúscula, na linha não diferem entre si a $p < 0,05$.

A atividade antioxidante (DPPH, ABTS e FRAP) das frações obtidas foi então realizada.

A análise dos resultados indicou que com relação a atividade antioxidante DPPH (Figuras 1a e 1b) não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as espécies vegetais estudadas. A análise com os dados de DPPH resultou apenas na interação ($F=10.6$, $P < 0,01$) entre as fontes de variação extrato e temperatura (sendo extrato o obtido diretamente com os métodos ou através da separação cromatográfica, e temperatura são as utilizadas no método de extração com ultrassom). Isso significa que ao variar uma das fontes, a outra necessariamente irá mudar, podendo dizer que essas variáveis são correlacionadas.

Inicialmente foi feito análises fatorial tripla (métodos de extração x extratos x espécies) a fim de se obter os dados entre as espécies e posteriormente foi feito análise fatorial dupla (métodos de extração x extratos) para facilitar o entendimento, isto é, separando as espécies.

O método de extração por percolação a 28 °C mostrou atividade antioxidante estatisticamente similar à extração com ultrassom, com exceção da fração purificada com hexano, que mostrou atividade antioxidante menor para todas as temperaturas de extração e ultrassom, e também para a temperatura a 70 °C, a qual apresentou dados menos significativos. Devido ao método de percolação a 28 °C resultar em maiores valores ser um método que não requer equipamentos sofisticados e não precisar aplicar temperatura, pode ser o mais indicado, pela sua simplicidade e praticidade, apesar de ser mais demorado.

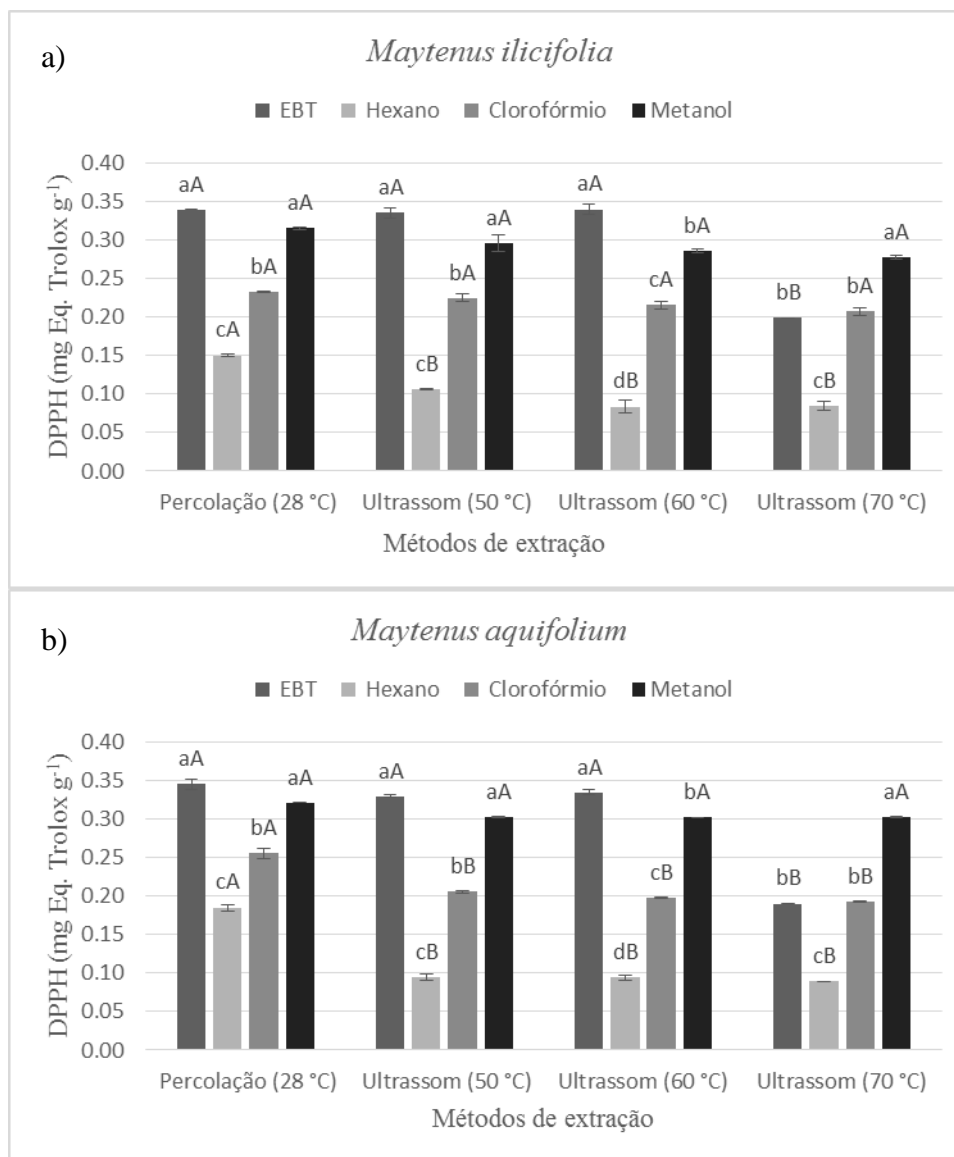


Figura 1– Atividade antioxidante DPPH de frações extraídas de folhas das espécies *M. ilicifolia* (a) e *M. aquifolium* (b) por diferentes métodos. Médias seguidas da mesma letra, minúsculas, dentro de cada método de extração não diferem entre si. Médias seguidas da mesma letra, maiúscula, entre métodos e mesmo solvente não diferem entre si a $p < 0,05$ e coeficiente de variação de 2,05%.

A fração purificada com metanol foi a que mostrou maior atividade antioxidante DPPH, seguida das frações obtidas com clorofórmio e hexano (Figuras 1a e b), sendo o extrato cromatográfico com maior atividade antioxidante. Uma vez que o metanol é o solvente de maior polaridade entre os solventes testados, os resultados sugerem que o perfil antioxidante do extrato bruto das folhas de espinheira-santa é representado por compostos de caráter majoritariamente polar.

Adicionalmente, quando a fração com metanol foi comparada ao seu respectivo extrato bruto etanólico (EBT), houve similaridade estatística da atividade antioxidante apenas

para as extrações por percolação e por ultrassom a 50 °C, independente da espécie de espinheira-santa. No ultrassom em 60 °C, o extrato bruto e o metanólico foram os extratos superiores, mas diferiram entre si estatisticamente. Para as extrações por ultrassom a 70 °C a fração metanólica foi superior ao EBT, o que sugere efeito negativo da temperatura, podendo indicar degradação de compostos com o aumento da temperatura. Esse efeito foi observado para ambas as espécies.

A capacidade antioxidante medida pelo método DPPH mostrou maiores níveis quando a extração foi feita em temperaturas mais baixas (28 °C e 50 °C). O EBT e o extrato obtido com metanol foram superiores e diferiram dos demais, para ambas as espécies (Figura 1).

Visualmente, foi constatado que tanto o EBT, quanto a fração metanólica, obtidas nos métodos de extração de menores temperaturas (28 °C e 50 °C) mostraram coloração mais escura que os demais (hexano e clorofórmio), indicando que os compostos de maior atividade antioxidante das folhas das espinheiras-santa estudadas têm possibilidade de serem de pigmentação escura. Corroborando com os resultados encontrados, Negri et al. (2009) estudaram o efeito da temperatura no preparo de amostras de folhas de espinheira-santa, e encontraram que menores temperaturas (40 °C e 50 °C) apresentaram maior atividade antioxidante DPPH.

A análise dos dados de ABTS revelou influência das fontes individuais de variação temperatura ($F=5,06$ e $P<0,05$) e extratos ($F=10,5$ e $P<0,01$).

O EBT obtido de *M. ilicifolia* diferiu ($p<0,05$) dos demais extratos para todos os tratamentos, sendo o extrato de maior atividade antioxidante, seguido do extrato obtido com metanol. O mesmo foi verificado para a *M. aquifolium*.

Para ambas as espécies, os gráficos são semelhantes mostrando que a relação da atividade antioxidante em função dos extratos e as formas de extração tem similaridade, sugerindo que os compostos de ambas as espécies têm características parecidas. Para a análise da atividade antioxidante ABTS a percolação foi superior, seguida do método com ultrassom a 50 °C. O EBT e as frações metanólicas tiveram resultados superiores para todos os métodos de extração. O extrato de menor atividade antioxidante foi o obtido com hexano, conferindo caráter polar dos compostos. Esse caráter polar dos compostos é devido o metanol ser o solvente de maior polaridade e por ter retido na coluna cromatográfica maiores teores de moléculas que possuem atividade antioxidante. Sendo assim, os compostos no extrato obtido com metanol têm caráter mais polar, e o extrato obtido com hexano tem caráter mais apolar. No método a 60 °C e 70 °C pode-se observar que o hexano e o clorofórmio, para a espécie *M.*

ilicifolia não diferiram entre si e foram os dois solventes com menores teores de compostos fenólicos. Para *M. aquifolium* os métodos a 60 °C e 70 °C não resultaram em maiores discrepâncias entre si. Os dados da espécie *M. aquifolium* são menos instáveis ou menos termosensíveis por não se alterarem com os tratamentos de maiores temperaturas. Os compostos importantes para a captura do radical ABTS são maiores na espécie *M. aquifolium*. Para ambas as espécies, a influência da temperatura foi bastante significativa na extração, sendo as menores temperaturas as mais eficientes.

Em estudos realizados por Haida et al. (2012) foi demonstrado a partir da avaliação dos extratos de folhas de *M. ilicifolia* e *M. aquifolium*, que extratos aquosos e alcoólicos de *M. ilicifolia* são ricos em compostos fenólicos. Os mesmos autores também encontraram que *M. ilicifolia* tem o maior conteúdo de compostos fenólicos, condizendo com o encontrado no presente trabalho.

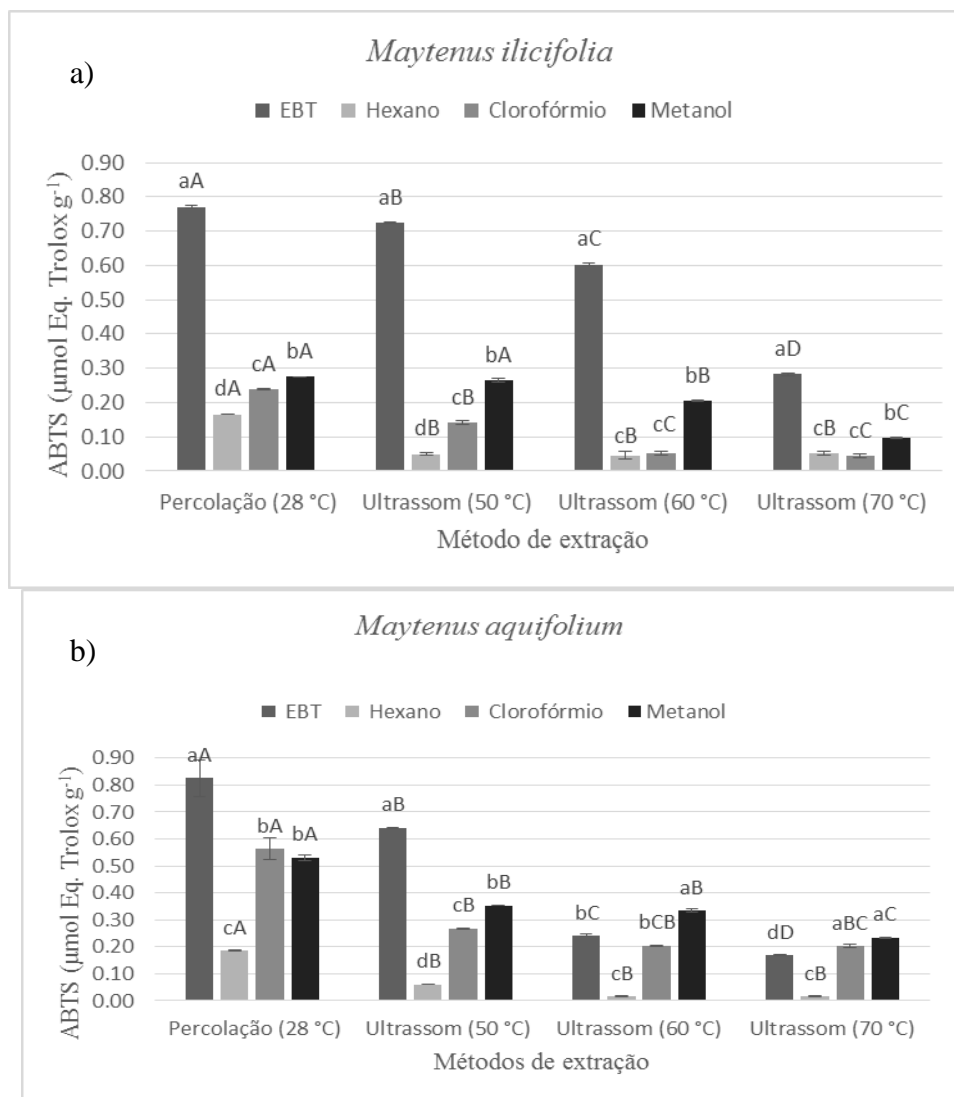


Figura 2– Atividade antioxidante ABTS de frações extraídas de folhas das espécies *M. ilicifolia* (a) e *M. aquifolium* (b) por diferentes métodos. Médias seguidas da mesma letra, minúsculas, dentro de cada método de extração não diferem entre si. Médias seguidas da mesma letra, maiúscula, entre métodos e mesmo solvente não diferem entre si a $p < 0,05$ e coeficiente de variação de 2,98%.

A análise dos dados com FRAP indicou apenas os efeitos individuais das fontes de variação temperatura ($F=15,7$; $F < 0,01$) e extratos ($F=199,5$ e $F < 0,01$).

Os resultados para a atividade antioxidante FRAP (Figura 3) indicaram haver semelhanças nos dados obtidos no EBT e o extrato obtido com metanol ($p < 0,05$). Os métodos de extração com menores temperaturas (28 °C e 50 °C) para o método FRAP, se destacaram na extração de compostos com atividade antioxidante, fato que foi observado para todos os métodos de avaliação da atividade antioxidante descritos nesse trabalho.

Os extratos brutos totais (EBT) e os extratos obtidos com metanol tiveram semelhanças no teor de atividade antioxidante pelo método FRAP. Pode-se observar um comportamento dos gráficos semelhantes para as duas espécies, mostrando que os compostos

com atividade antioxidantes são extraídos nos mesmos extratos e em concentrações parecidas, sofrendo a mesma influência da temperatura, o que confere similaridade nos compostos extraídos para as duas espécies.

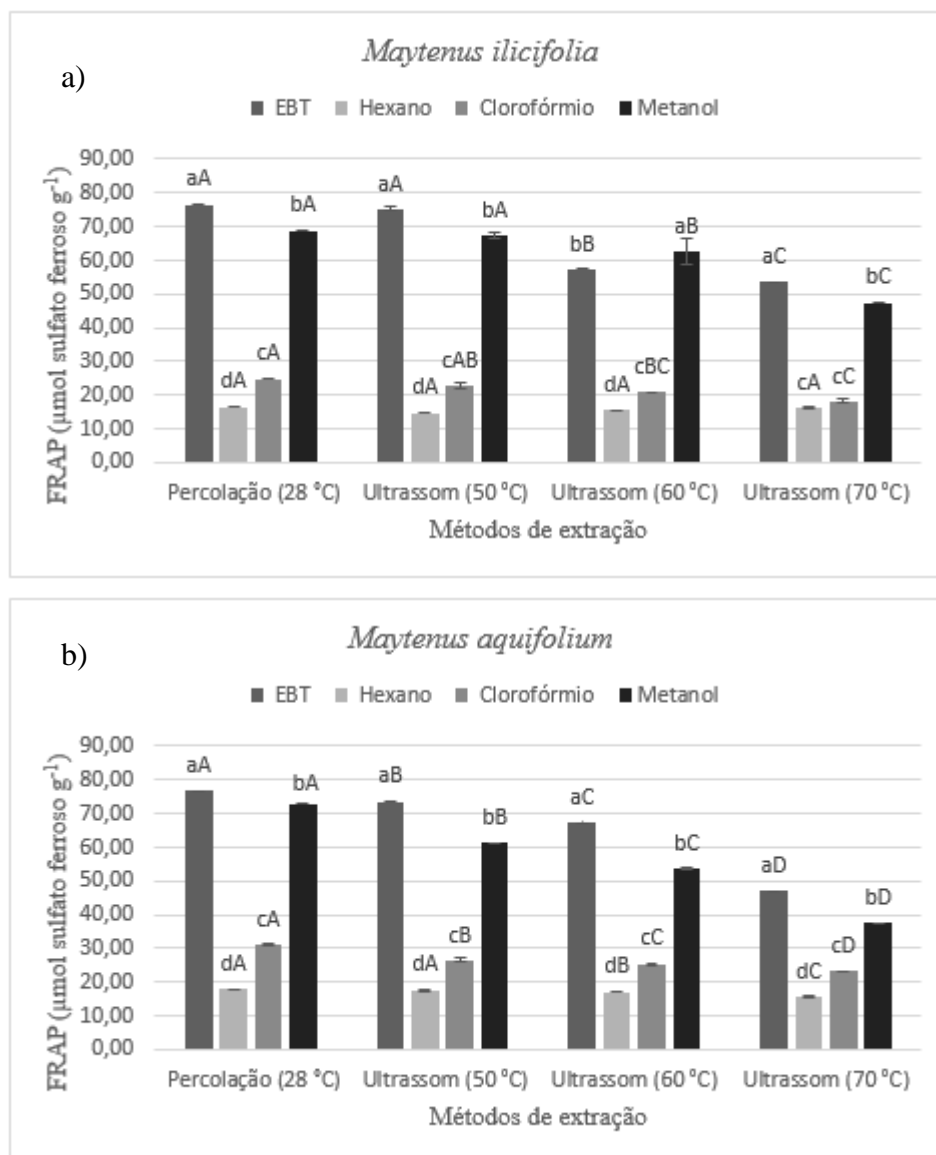


Figura 3 – Atividade antioxidante FRAP de frações extraídas de folhas das espécies *M. ilicifolia* (a) e *M. aquifolium* (b) por diferentes métodos. Médias seguidas da mesma letra, minúsculas, dentro de cada método de extração não diferem entre si. Médias seguidas da mesma letra, maiúscula, entre métodos e mesmo solvente não diferem entre si a $p < 0,05$ e coeficiente de variação de 3,5%.

Para a atividade antioxidante avaliada pelo método FRAP, os métodos de extração tiveram influência, sendo as menores temperaturas mais efetivas na extração dos compostos. Os compostos avaliados para ambos os métodos são majoritariamente encontrados nos extratos brutos e extratos obtidos com metanol.

No método ABTS houve maiores teores de compostos obtidos com o solvente clorofórmio, o que pode significar que os compostos antioxidantes para o radical ABTS são diversos e podem ser de diferentes pesos moleculares.

Os maiores rendimentos de extração (Tabela 1) não condizem com os maiores teores de atividade antioxidantes (Figuras 1, 2 e 3). Os maiores teores de rendimentos foram obtidos com os métodos a maiores temperaturas e as maiores atividade antioxidantes obtidas com menores temperaturas. Os extratos com maiores rendimentos foram EBT seguindo de hexano e os extratos com maiores atividades antioxidantes são EBT e metanólico. Maiores temperaturas são mais agressivas e tem poder de extrair maior material da planta ao mesmo tempo que também degrada moléculas sensíveis a altas temperaturas.

Considerando a diversidade de substâncias antioxidantes presentes nos alimentos e vegetais, vários métodos têm sido desenvolvidos para estimar a capacidade antioxidante *in vitro* dessas substâncias. Porém, a falta de padronização desses métodos dificulta as comparações entre dados publicados por diferentes grupos de pesquisas, principalmente pelo uso de diferentes solventes e pelas maneiras distintas de expressar os resultados.

Do mesmo modo, variações no complexo antioxidante de cada alimento podem fornecer respostas diferentes em cada método. Por isso, a literatura recomenda a combinação de pelo menos três desses métodos para fornecer resultados mais completos e representativos da capacidade antioxidante (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2008).

Com exceção do método ABTS, ambas as espécies mostraram resultados semelhantes para os métodos utilizados e isso pode explicar o fato de ambas as espécies serem muito utilizadas como produtos fármacos.

A utilização das duas espécies para fins medicinais é comum pois ambas possuem atividade comprovada sobre problemas estomacais. Uma possível explicação para as propriedades medicinais da espinheira-santa são os seus antioxidantes, que pertencem a uma classe de metabólitos secundários largamente distribuídos nas plantas, que geralmente são taninos relacionados com processos de cicatrização (SILVA; SILVA, 1999).

Bressani (1993) avaliou polifenóis em feijões sob cozimento e mostrou que os processos de extração influenciam nos níveis de atividade antioxidante. Segundo ele, a elevação da temperatura promoveu maior liberação de polifenóis dos feijões na água do cozimento.

Radomski e Scheffer (2004) relataram sobre interferências ambientais na atividade antioxidante, afirmando que as plantas que crescem em pleno sol, em relação às que crescem em sombra, tem maiores teores de polifenóis, mas que sofrem variação de acordo com a

luminosidade. Neste caso, é relevante considerar que fatores como clima, região, manejo e técnicas pós-colheita também influenciam e devem ser levados em conta no que diz respeito à atividade antioxidante.

4. CONCLUSÕES

As folhas de *M. ilicifolia* e *M. aquifolium* apresentam atividade antioxidante similares para as análises de atividade antioxidante DPPH e FRAP. Os extratos brutos e os extratos obtidos com metanol externaram resultados superiores para todos os métodos de avaliação da atividade antioxidante, ainda que nem sempre estatisticamente similares. Os métodos de extração com menores temperaturas conferiram maior atividade antioxidante (percolação 28°C e ultrassom 50 °C), sendo assim, o método mais indicado para aplicações em laboratórios equipados é o método com ultrassom a 50 °C por ser mais rápido e não ser diferente do método a percolação a 28 °C.

REFERÊNCIAS

- ATL, M. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clae-dad de *Dicksonia sellowiana* (presl.). Hook, *dicksoniaceae*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v. 18, n. 1983–084x, p. 230–239, 2016.
- BENZIE, I. F.F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 239, p. 70–76, 1996.
- BRAND-WILLIAN, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – food Science and Technology**. London, v. 28, n. 1, p. 25-30,
- BRESSANI, R. Grain quality of common beans. **Food Reviews International**, Phyladelphia, v. 9, n. 2, p. 237-297, 1995.
- CUNICO, M. M., CIRIO, G. M., MIGUEL, O. G., MIGUEL, M. D., MONTRUCCHIO, D. P., AUER, C. G., & GRIGOLETTI JÚNIOR, A. Contribuição ao estudo da atividade antifúngica de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., *Celastraceae*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 12, n. 2, p. 69–73, 2002.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez., 2011.
- HAIDA, K. S.; HAAS, J.; LIMA, D. S. D.; HAIDA, K. Y.; SILVA, F. J. da; LIMANA S.; RODRIGUES R. T. Anti-oxidant activity and phenolic compounds of *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium*. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 5, n. 2, p. 360–368, 2012.
- MARIOT, M. P.; BARBIERI, R. L. O conhecimento popular associado ao uso da Espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* e *M. aquifolium*). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 1, p. 666–668, 2007.
- MOKRANI, A.; MADANI, K. Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit. **Separation and Purification Technology**, Amsterdam, v. 162, n. January, p. 68–76, 2016.
- NEGRI, M. L. S.; POSSAMAI, J. C.; NAKASHIMA, T. Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., secas em diferentes temperaturas. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, João Pessoa, n. 19, v. 2b, p. 553–556, 2009.
- PEREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, Amsterdam, v. 39, p. 791-800, 2006.
- RADOMSKI, M. I.; SCHEFFER, M. C. Características fenotípicas de 44 progênes de *Maytenus ilicifolia* Mart. Cultivadas no Município de Ponta Grossa-PR, **Embrapa Florestas (Circular Técnica)**, Ponta Grossa, 2004.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICEEVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. D. Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 1, p. 21–32, 1999.

SOUZA, L. M. de. CIPRIANI, T. R., SERRATO, R. V., COSTA, D. E. da, LACOMINI, M., GORIN, P. A. J. & SASSAKI, G. L. Analysis of flavonol glycoside isomers from leaves of *Maytenus ilicifolia* by offline and online high performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 1207, n. 1–2, p. 101–109, 2008.

TIWARI, P., KUMAR, B., KAUR, M., KAUR, G. & KAUR H. Phytochemical screening and extraction - A review. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, Ghaziabad, v. 1, n. 1, p. 98–106, 2011.

ARTIGO 2 - CONTROLE DE *Cylindrocladium clavatum* EM EUCALIPTO COM EXTRATOS DE FOLHAS DE ESPINEHIRA SANTA

RESUMO

A aplicação de extratos de vegetais em plantas vem crescendo nos últimos anos devido a um grande aumento do uso de agrotóxicos, resistência dos microrganismos e efeitos colaterais causados, como por exemplo intoxicações em seres humanos e danos no meio ambiente. Com isso, o objetivo do trabalho foi testar o efeito de extratos vegetais de espinheira-santa, sendo avaliados na sua forma bruta e também de forma fracionada através da cromatografia em coluna aberta com diferentes solventes, sob o fungo *Cylindrocladium clavatum*. A extração do material vegetal foi feita através do método de percolação a 28 °C por 7 dias. Para a separação através da cromatografia líquida de coluna aberta, os solventes utilizados foram hexano, clorofórmio e metanol. As avaliações da atividade antifúngica foram feitas a partir de uma concentração fixada dos extratos, sendo essa concentração de 2000 mg L⁻¹ sob *Cylindrocladium clavatum*. Também foi avaliado a concentração inibitória mínima dos extratos, a esporulação e o controle de *Cylindrocladium clavatum* em folhas de eucalipto. A avaliação da atividade antifúngica a 2000 mg L⁻¹ resultou em uma completa inibição do fungo. Posteriormente, para a avaliação da concentração inibitória mínima, utilizou-se as concentrações de 500 mg L⁻¹, 250 mg L⁻¹, 125 mg L⁻¹ e 100 mg L⁻¹ avaliados em 5 e 15 dias de incubação. As maiores taxas de inibição do extrato foram observadas nas concentrações mais elevadas para os dois períodos. A avaliação da esporulação foi feita apenas com 15 dias de incubação e resultou também em melhores resultados para o extrato mais concentrado. Esse padrão de resultados se repetiu para a avaliação em folhas de eucalipto. Os melhores solventes de separação cromatográfica para as análises de avaliação da atividade antifúngica e para a avaliação da concentração inibitória mínima foram o extrato bruto total e o obtido com clorofórmio e para as análises de avaliação da esporulação e avaliação dos extratos aplicados em folhas de Eucalipto foram o extrato bruto total e o obtido com metanol.

Palavras-chave: Esporos, Colônias, vegetais.

ABSTRACT

The application of plant extracts to plants has been growing in recent years due to a large increase in the use of pesticides, resistance of microorganisms and side effects caused, such as intoxication in humans and damage to the environment. Therefore, the objective of this work was to test the effect of plant extracts of espinheira-santa, being evaluated in their crude form and also in a fractional form through the open column chromatography with different solvents under the fungus *Cylindrocladium clavatum*. The extraction of the plant material was done by the percolation method at 28 °C for 7 days. For separation through open column liquid chromatography the solvents used were hexane, chloroform and methanol. The evaluations of the antifungal activity were made from a fixed concentration of the extracts, being this concentration of 2000 mg L⁻¹ under *Cylindrocladium clavatum*. The minimum inhibitory concentration of extracts, sporulation and control of *Cylindrocladium clavatum* in eucalyptus leaves were also evaluated. The evaluation of antifungal activity at 2000 mg L⁻¹ resulted in complete inhibition of fungus. Subsequently, concentrations of 500 mg L⁻¹, 250 mg L⁻¹, 125 mg L⁻¹ and 100 mg L⁻¹ were evaluated at 5 and 15 days of incubation for the minimum inhibitory concentration. The highest inhibition rates of the extract were observed at the highest concentrations for the two periods. The evaluation of sporulation was done only with 15 days of incubation and resulted in better results for the more concentrated extract. This pattern of results was repeated for evaluation in eucalyptus leaves. The best solvents of chromatographic separation for the analyzes of evaluation of the antifungal activity and for the evaluation of the minimal inhibitory concentration were the total crude extract and the one obtained with chloroform. For the analyzes of evaluation of the sporulation and evaluation of the extracts applied in leaves of Eucalyptus best results were obtained with the total crude extract and that obtained with methanol.

Keywords: Spores, colonies, vegetables.

1. INTRODUÇÃO

Maytenus ilicifolia Mart. ex Reiss é uma árvore ramificada desde a sua base e tem em média 5 m de altura em plantas adultas pertencente à família *Calastraceae*. A espécie ocorre em solos álicos, com saturação em bases trocáveis baixa e em solos eutróficos (BENEDETTI, 2009).

Estudos revelam que *M. ilicifolia* contém compostos bioativos com ação antitumoral e antileucêmica em doses baixas. O emplasto das folhas e o decocto para lavagens é usado no tratamento de câncer de pele. No entanto, o mais comum é a utilização para tratamento de úlceras, indigestão, gastrites crônicas e dispepsia. Extratos do caule dessa espécie apresentaram também atividade antifúngica (MARIOT; BARBIERI, 2007).

O fungo *Cylindrocladium clavatum* pertence ao grupo *Ascomycotinas*. Esse patógeno é particularmente importante em espécies florestais como agente causal de “Damping-off”, podridões de raiz, podridões de estacas e manchas foliares. Os fungos do gênero *Cylindrocladium* spp. são destaques como patógenos de *Eucalyptus* e *Pinus*, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, isso porque as condições ambientais favorecem esse patógeno, que pode levar à morte de plantas jovens, e no eucalipto também pode levar à ocorrência de manchas foliares (DIAS, 2010).

Entre as doenças causadas por *Cylindrocladium* spp. em eucalipto, podemos citar: Tombamento de mudas: O patógeno ataca as sementes em germinação destruindo-as, e as plântulas recém emergidas, atacando tecidos tenros e suculentos. A destruição do tecido acaba provocando o tombamento da muda e sua morte (KRUGNER, 1997); Podridão de estacas e miniestacas: Causa um minilesão escura que progride da base ao ápice da estaca (ALFENAS, et al. 2009); e Mancha de *Cylindrocladium* e Canela preta: Caracterizada pela formação de lesões necróticas escuras. Com o desenvolvimento da lesão, a haste poderá ser estrangulada provocando a morte das partes situadas acima da lesão (KRUGNER, 1997).

Devido à grande importância do *Cylindrocladium* spp para as espécies florestais, e devido as características benéficas da espinheira-santa, o presente trabalho objetivou avaliar o controle de *Cylindrocladium clavatum* com extratos de duas espécies de espinheira-santa.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL

Foram utilizadas folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek e *Maytenus aquafolium* Mart. coletadas em Marechal Cândido Rondon – Paraná, 24°33'29.7"S 54°02'44.0"W, no período de junho a setembro de 2017. As folhas foram coletadas manualmente e acondicionadas em sacos plásticos durante o transporte até o laboratório. No laboratório, as folhas foram higienizadas com solução de hipoclorito a 2%, enxaguadas e secas em temperatura ambiente até que não se observasse gotículas de água, e colocadas em seguida em estufa com circulação de ar a 55 °C por três dias. Depois de secas as folhas foram moídas em moinho de facas (Wiley TE-680) a fim de se obter um pó fino. Após esse processo, seguiu-se com a metodologia de extração.

2.2 EXTRAÇÃO

As amostras moídas foram colocadas em percolador com etanol 80% em concentração 1/10 (m/v), por sete dias à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram filtradas e colocadas em balão previamente pesado para posterior evaporação do solvente (50 °C, 55 rpm e vácuo) e cálculo do peso vegetal por diferença do peso do balão (peso do balão vazio – peso do balão com amostra). O cálculo do peso vegetal é utilizado para padronização da concentração dos extratos, utilizados a 2000 mL L⁻¹. Após o cálculo, as amostras foram diluídas em hexano (primeiro solvente utilizado para a eluição na coluna cromatográfica) e deu-se sequência no processo de separação por cromatografia em coluna aberta.

2.3 CROMATOGRAFIA EM COLUNA ABERTA

A coluna cromatográfica utilizada foi de 20 cm com 2 cm de diâmetro, recheada com algodão, areia e sílica gel 70-230 mesh. As fases móveis foram hexano, clorofórmio e metanol, respectivamente. As frações foram coletadas por coloração. O extrato bruto é inserido no topo da coluna já empacotada e inicia-se o processo de eluição com o solvente hexano, ao notar-se que toda a fração de cor semelhante foi eluída, muda-se o solvente, seguindo com o clorofórmio e por último o metanol. Após a cromatografia, cada fração

coletada é evaporada em evaporador rotativo para fazer o cálculo do peso vegetal extraído, por diferença do peso do balão. Posteriormente, dilui-se o extrato em etanol 80% para dar continuidade nas análises.

2.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS EXTRATOS SOB *Cylindrocladium clavatum*

O inóculo utilizado foi obtido já isolado do Instituto Biológico, São Paulo – SP. Como testemunha utilizou-se apenas o fungo em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA).

Em placas de Petri foi adicionado o meio de cultura BDA com o extrato vegetal já incorporado em uma concentração fixa de 2000 mg L⁻¹. Em seguida repicou-se um disco de 5 mm de diâmetro do inóculo de *C. clavatum* para o centro da placa. As placas foram fechadas e mantidas incubadas em uma temperatura de 25 °C em câmara incubadora para BOD, no escuro.

Após o período de incubação as placas foram avaliadas por mensuração do tamanho da colônia, onde mediu-se a colônia em dois sentidos perpendiculares e tomou-se o valor do crescimento a média das medidas. As avaliações foram feitas aos 5 e 15 dias de incubação.

2.5 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

Para que se avaliasse a mínima concentração de extrato necessária para controle do fungo, aplicou-se em placas de Petri o meio de cultura BDA e o extrato já incorporado ao meio, sendo em cada placa uma concentração diferente. As concentrações dos extratos foram de 100 mg L⁻¹, 125 mg L⁻¹, 250 mg L⁻¹, 500 mg L⁻¹. Foi repicado um disco de 5 mm de diâmetro contendo o inóculo de *C. clavatum* em cada placa. Utilizou-se como testemunha foi o meio de cultura contendo somente BDA. As avaliações foram feitas em triplicata.

As placas foram incubadas à uma temperatura de 25 °C no escuro em câmara incubadora para BOD, e a avaliação se deu por mensuração do tamanho das colônias. As avaliações foram realizadas aos 5 e 15 dias de incubação.

2.6 AVALIAÇÃO DA ESPORULAÇÃO

A avaliação da esporulação foi feita apenas na concentração inibitória mínima e avaliada aos 15 dias de incubação uma vez que aos 5 dias de incubação as colônias eram muito pequenas. Para a avaliação após o período de incubação, cada placa avaliada foi lavada com 20 mL de uma solução de água e tween 80 (utilizando uma gota para 100 mL de água). Em seguida filtrou-se em malha fina e leitura em câmara de Neubauer.

2.7 AVALIAÇÃO DO CONTROLE DE *Cylindrocladium clavatum* EM FOLHAS DE EUCALIPTO

As folhas de *Eucalyptus dunnii* foram coletadas de árvores visualmente saudáveis, com aproximadamente 1 ano e meio. Utilizou-se folhas com mesmo tamanho e semelhança de coloração, que foram destacadas com o pecíolo. As folhas foram lavadas com água destilada e desinfetadas com solução de hipoclorito a 2%.

Os pecíolos das folhas foram envolvidos com algodão umedecido com água da torneira e dispostas em caixa gerbox, juntamente com folhas de papel filtro ao fundo também umedecidas, a fim de formar uma câmara úmida. Os extratos (Bruto, Hexano, Clorofórmio e Metanol) e suas diferentes concentrações (500, 250, 125 e 100 mg L⁻¹) foram aplicados nas folhas de eucalipto de forma pulverizada.

Após não se observar mais gotículas de água na superfície das folhas, deu-se continuidade na aplicação do fungo, sendo retirados discos de 5 mm de diâmetro da colônia e colocados em cima de lesões (cortes), feitas com bisturi, nas folhas, também de 5 mm. Por fim, envolveu-se a caixa em película de plástico a fim de se obter uma câmara úmida. A testemunha foi pulverizada com água destilada e inoculada com o fungo. A incubação foi feita por 5 dias no escuro em temperatura de 25 °C conforme metodologia adaptada de Carvalho Filho et al. (2008) com modificações. As análises foram feitas em triplicata.

As análises dos resultados foram feitas após 5 dias de incubação através de análises de imagens com o auxílio do software QUANT (VALE, et al. 2003).

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos a teste de homogeneidade e normalidade. O delineamento foi o inteiramente casualizado fatorial triplo formado por duas espécies, quatro extratos mais a testemunha e quatro concentrações dos extratos. No intuito de facilitar a compreensão, após verificar a interação entre as espécies o restante dos dados foi trabalho na

forma de fatorial duplo. Foi feito a análise de variância e para os dados com diferenças significativas foram aplicados teste de médias como o Teste de Tukey. Para as concentrações utilizadas foram realizadas análises de regressão. Os softwares utilizados foram Sisvar (FERREIRA, 2011) e Excel (MICROSOFT, 2010).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA SOB *Cylindrocladium clavatum*

Na concentração fixa de 2000 mg L⁻¹, todos os extratos inibiram completamente o crescimento do fungo, o que impulsionou ainda mais a pesquisa acerca da concentração inibitória mínima.

3.2 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

Para a avaliação após 5 dias de incubação, as placas com as colônias foram medidas com paquímetro digital e os dados submetidos a análise estatística (Figura 4). Não houveram diferenças significativas entre as espécies avaliadas. As maiores concentrações dos extratos utilizados (500 mg L⁻¹ e 250 mg L⁻¹) resultaram em menores colônias.

Em relação à testemunha, as colônias tiveram crescimento bastante inferior, o que indica uma inibição do crescimento da colônia com a utilização dos extratos. O extrato obtido com hexano, a partir da cromatografia foi o que externou menor inibição do crescimento da colônia, ou seja, resultou em maiores colônias, em comparação com os outros solventes da cromatografia, seguido do extrato metanólico.

O extrato obtido com clorofórmio foi o de maior inibição do crescimento das colônias. A concentração de 500 mg L⁻¹ foi a melhor pois não permitiu o crescimento das colônias.

Cunico et al. (2002) constataram que os extratos etanólicos de espinheira-santa inibiram o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum*, estimularam o crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum* e algumas frações do extrato, quando separado por cromatografia em camada delgada, inibiram o crescimento de *Cylindrocladium spathulatum*.

Gleriano (2015) mostrou que o extrato hidroalcoólico de espinheira-santa tem ação fungicida eficiente no tratamento do fungo *Aspergillus niger*.

Ainda que nenhuma colônia teve crescimento tal qual a testemunha, apenas a concentração de 500 mg L⁻¹ foi que inibiu completamente o crescimento em 5 dias de incubação.

Alves et al. (2016) mostraram que o extrato etanólico de folhas secas de espinheira-santa apresentou atividade antimicrobiana em *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Já o extrato de folhas frescas não foi tão efetivo para *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*. *Salmonella enteritidis* e *Klebsiella pneumoniae*.

Com 5 dias de incubação as colônias não atingiram tamanho significativo para a avaliação da esporulação. Sendo assim, foram feitos experimentos com 15 dias de incubação para a avaliação da concentração inibitória mínima e esporulação.

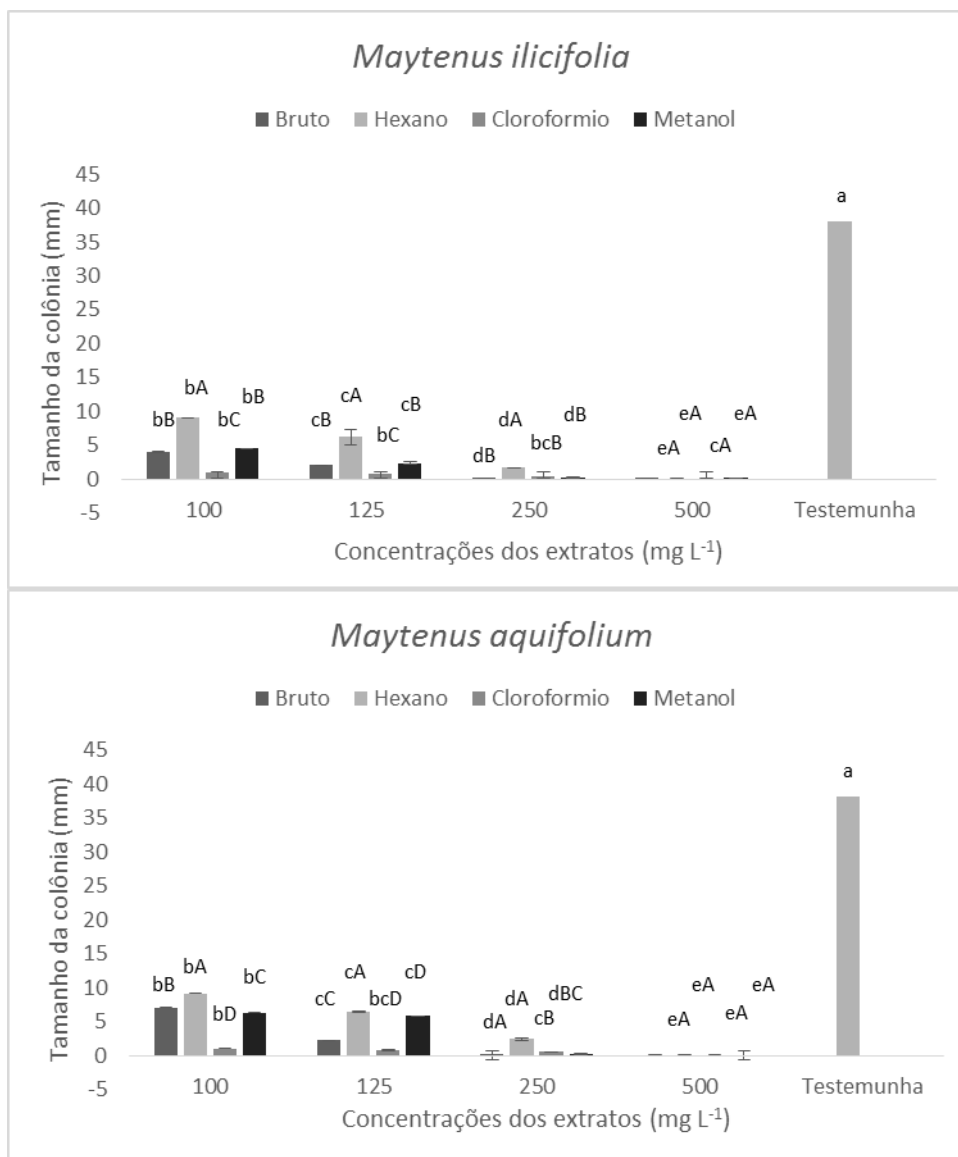


Figura 4 – Diâmetro do tamanho da colônia (mm) de *Cylindrocladium clavatum* após 5 dias de incubação para os extratos e suas respectivas concentrações testadas. Médias seguidas da mesma letra, minúsculas, entre as concentrações, e maiúscula entre os extratos, não diferem entre si a nível de 95% de probabilidade.

A avaliação da regressão linear (Tabela 1) apontou que apenas as equações obtidas com os dados do cloroformio são significativas. Sendo assim, é possível afirmar que apenas esse extrato possui uma correlação funcional com o tamanho da colônia do fungo após 5 dias de incubação. Isso significa que ao variar a concentração do extrato, necessariamente vão variar os tamanhos das colônias. Os coeficientes de determinação para essas análises foram de 0,97 e 0,95, indicando um alto ajuste do modelo linear. O restante dos extratos não possui correlação entre concentração do extrato e tamanho da colônia, demonstrando que ao mudar a concentração dos extratos, nem sempre o tamanho da colônia pode variar também.

Tabela 2 - Equações para as concentrações dos extratos aplicados sob o fungo *Cylindrocladium clavatum* para as duas espécies testadas na avaliação da concentração inibitória mínima e incubação em 5 dias.

Atributo	Regressão das concentrações dos extratos	R ²
<i>Maytenus ilicifolia</i>		
Extrato bruto	$y = 362,757 - 25,320x^{ns}$	0,62
Hexano	$y = 386,79 - 12,77x^{ns}$	0,68
Clorofórmio	$y = 480,607 - 139,328x^{**}$	0,97
Metanol	$y = 370,731 - 23,192x^{ns}$	0,62
<i>Maytenus aquifolium</i>		
Extrato bruto	$y = 335,958 - 13,079x^{ns}$	0,5
Hexano	$y = 386,798 - 12,772x^{ns}$	0,68
Clorofórmio	$y = 481,823 - 136,036x^{**}$	0,95
Metanol	$y = 380,465 - 14,860x^{ns}$	0,7

** Significativo pelo teste t ($p < 0,05$); ns – não significativo.

Para a avaliação após 15 dias de incubação, as placas com as colônias foram medidas com paquímetro digital e os dados submetidos a análise estatística (Figura 5). Menores concentrações de extratos resultaram em maiores tamanhos de colônias, isso também foi observado na avaliação em 5 dias de incubação.

O crescimento das colônias foi inibido quando se compara com a testemunha, com exceção do extrato obtido com hexano. O hexano foi o extrato que teve os resultados menos efetivos, tendo o maior crescimento de colônias. O comportamento das espécies não teve diferença.

Com 15 dias de avaliação as colônias já foram muito maiores que as colônias nas avaliações em 5 dias, mas ainda assim não atingiram os valores da testemunha (com exceção do hexano a 100 mg L^{-1}).

A utilização dos extratos em plantas suscetíveis ao fungo *Cylindrocladium clavatum* podem inibir a sua atuação, ainda que isso só possa ser comprovado com testes *in vivo*. Há indícios de bons resultados quando ao tratamento preventivo do fungo em mudas com a aplicação dos extratos.

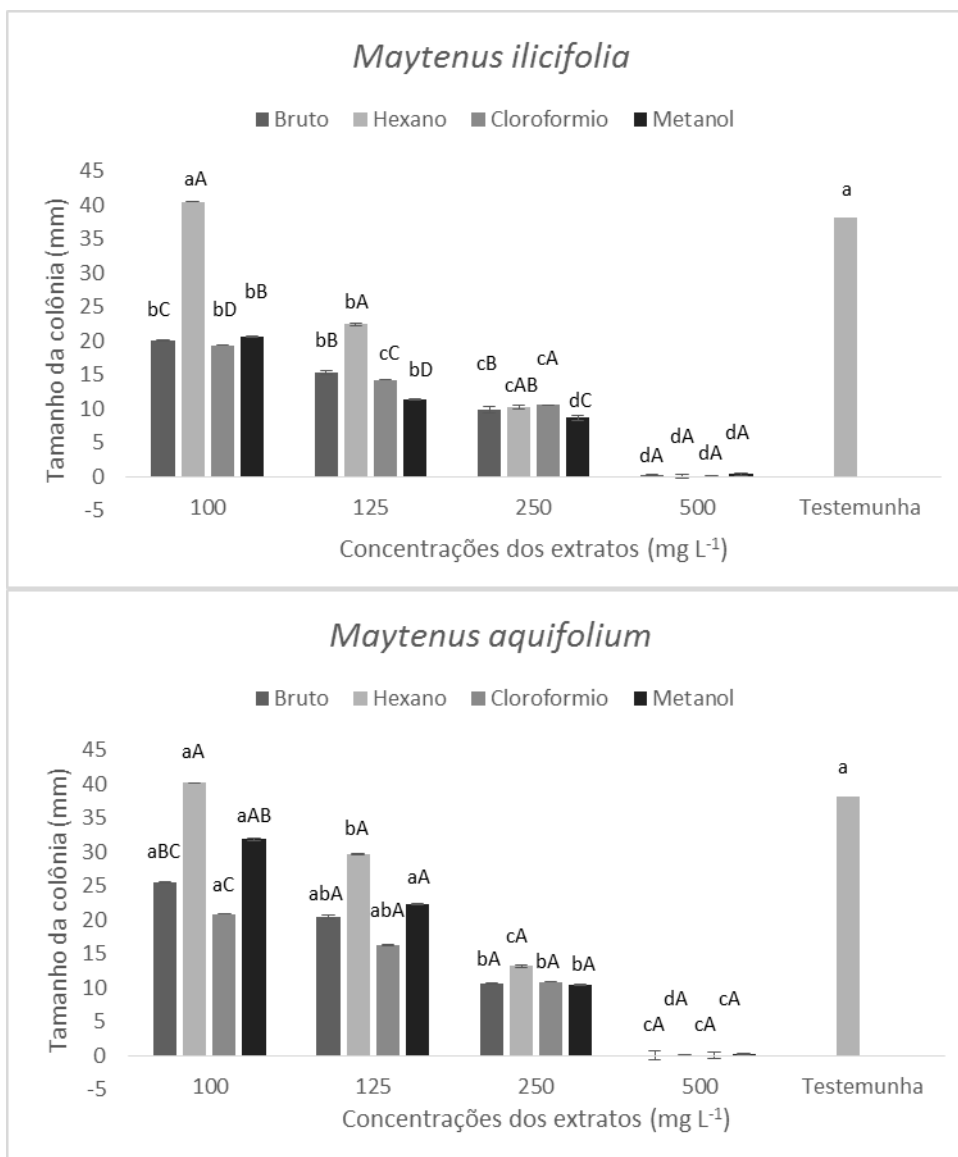


Figura 5 – Tamanho da colônia (mm) de *Cylindrocladium clavatum* após 15 dias de incubação para os extratos e suas respectivas concentrações testadas. Médias seguidas da mesma letra, minúsculas, entre as concentrações, e maiúscula entre os extratos, não diferem entre si a nível de 95% de probabilidade.

A análise de regressão foi aplicada para as concentrações dos extratos na avaliação da concentração inibitória mínima com 15 dias de incubação e as equações juntamente com o coeficiente de determinação (Tabela 3). Para essa análise as equações resultantes do extrato bruto e do extrato obtido com clorofórmio foram significativas. Significando que ao variar a concentração desses extratos necessariamente o tamanho da colônia varia. Isso foi demonstrado nas duas espécies avaliadas.

Os coeficientes de determinação dos modelos lineares foram de 0,96 e 0,94 para o extrato bruto e de 0,96 e 0,97 para o clorofórmio demonstrando um bom ajuste da reta.

Tabela 3 - Equações para as concentrações dos extratos aplicados sob o fungo *Cylindrocladium clavatum* para as duas espécies testadas na avaliação da concentração inibitória mínima e incubação em 15 dias.

Atributo	Regressão das concentrações dos extratos	R ²
<i>Maytenus ilicifolia</i>		
Extrato bruto	$y = 483,283 - 7,029x^{**}$	0,96
Hexano	$y = 412,955 - 3,082x^{ns}$	0,77
Clorofórmio	$y = 485,510 - 7,309x^{**}$	0,96
Metanol	$y = 368,612 - 5,009x^{ns}$	0,63
<i>Maytenus aquifolium</i>		
Extrato bruto	$y = 470,921 - 5,326x^{**}$	0,94
Hexano	$y = 426,639 - 2,618x^{ns}$	0,82
Clorofórmio	$y = 484,800 - 6,695x^{**}$	0,97
Metanol	$y = 445,438 - 4,143x^{ns}$	0,88

** Significativo pelo teste t ($p < 0,05$); ns – não significativo.

A Figura 6 é um exemplo de como as placas ficaram após o período de incubação e a testemunha juntamente para comparação.

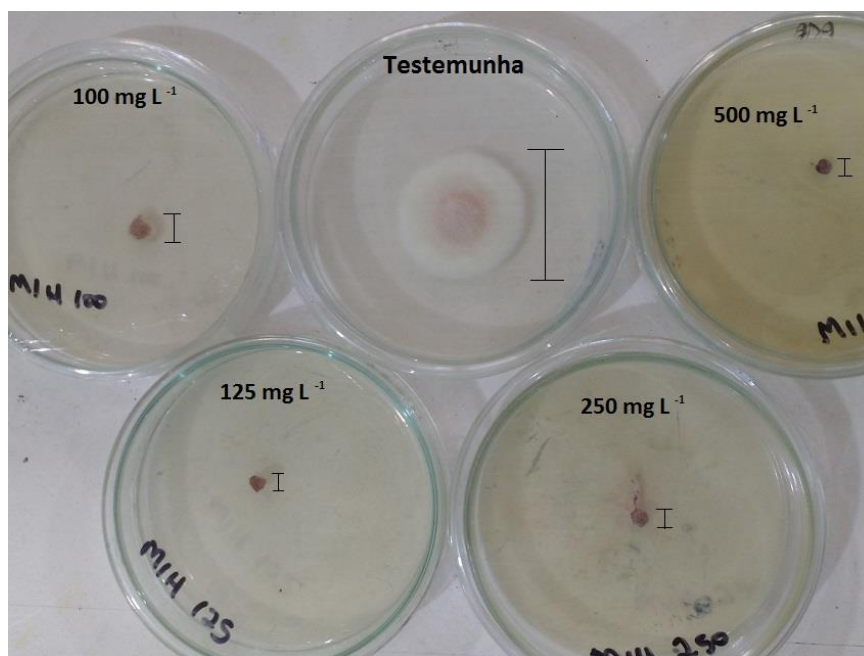


Figura 6 – Método de avaliação da concentração inibitória mínima para as diferentes concentrações de um extrato juntamente com a testemunha (5 dias)

3.3 AVALIAÇÃO DA ESPORULAÇÃO

Para a avaliação da esporulação o tempo de incubação foi de 15 dias, pois em 5 dias não se constatou esporulação. A contagem foi feita em câmara de Neubauer (Figura 7). As menores concentrações utilizadas resultaram em maiores valores de desenvolvimento de esporos.

A concentração de 500 mg L⁻¹ foi a com melhor resultado já que inibiu 100% do desenvolvimento de esporos. Na concentração de 250 mg L⁻¹ dos extratos bruto e com solvente metanol também resultaram em inibição de 100%. Sendo assim, esses dois extratos tem uma taxa de inibição de esporulação maior do que os demais. Os melhores extratos foram o bruto e o obtido com metanol, devido a maior faixa de concentração que inibe o desenvolvimento dos esporos.

A estrutura básica de reprodução dos fungos é o esporo, que é um propágulo especializado, microscópico, que contém um ou mais núcleos, capaz de gerar um novo indivíduo adulto sem necessidade de outra célula para se fundir. O esporo é o meio de dispersão mais usual (FILHO et al., 1995). Assim, a inibição da esporulação é importante para que o fungo não se prolifere.

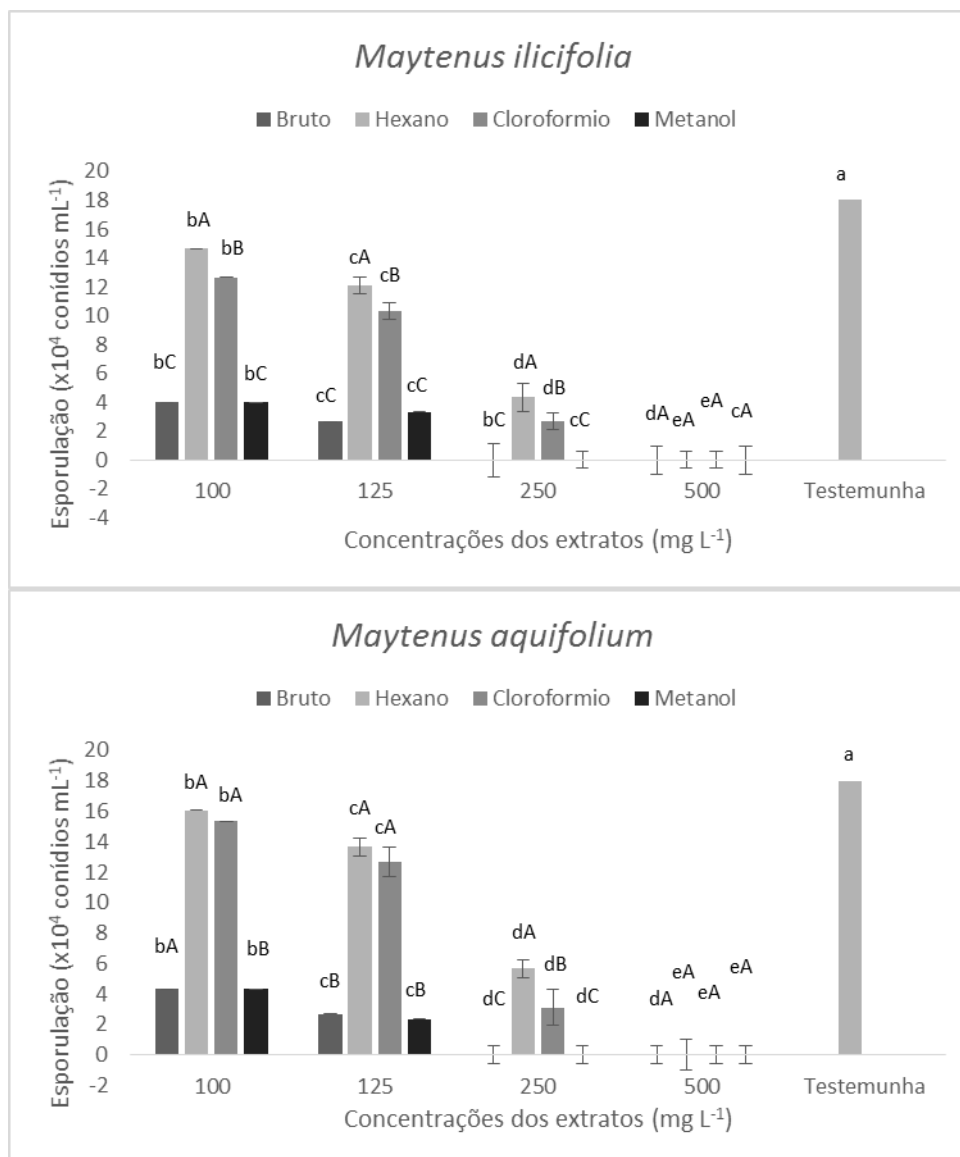


Figura 7 – Esporos encontrados nas colônias de *Cylindrocladium clavatum* após 15 dias de incubação para os extratos e suas respectivas concentrações testadas. Médias seguidas da mesma letra, minúsculas, entre as concentrações, e maiúscula entre os extratos, não diferem entre si a nível de 95% de probabilidade.

As duas espécies não diferiram entre si em relação à esporulação. Ainda que menores concentrações resultaram em resultados menos efetivos no controle, nenhuma concentração teve comportamento tão elevado como o da testemunha.

Os extratos inibiram a produção de esporos além de inibir o desenvolvimento da colônia, fazendo com que não só retardasse o seu desenvolvimento como também evitasse a formação de partes que se desenvolvem no intuito de proliferar a espécie.

Salustiano et al. (2006) avaliaram a atividade de extratos de folhas e de óleo essencial da candeia sobre o crescimento micelial de *Cylindrocladium scoparium*. Como resultado, apenas os urediniosporos da testemunha germinaram. *C. scoparium* teve inibição

do crescimento micelial maior no extrato metanólico, sendo de 52,97% e com redução da produção de esporos de 98,66%. Os tratamentos com chá a 10% e óleo essencial a 1% reduziram o crescimento micelial em 25,75% e 25,89% e redução de produção de esporos de 28 e 34%, respectivamente.

A análise de regressão (Tabela 3) feita para as concentrações em função da esporulação revelou que apenas o extrato obtido com hexano teve correlação significativa com a quantidade de esporos formados após a aplicação dos extratos no fungo. O ajuste da reta foi de 0,88, indicando um ajuste linear suficiente. Isso foi observado para as duas espécies.

Tabela 4 – Equações de regressão linear para as concentrações dos extratos aplicados sob o fungo *Cylindrocladium clavatum* para as duas espécies testadas na avaliação da esporulação e incubação em 15 dias.

Atributo	Regressão das concentrações dos extratos	R ²
<i>Maytenus ilicifolia</i>		
Extrato bruto	$y = 367,592 - 24,768x^{ns}$	0,65
Hexano	$y = 441,175 - 8,491x^{ns}$	0,88
Clorofórmio	$y = 421,155 - 9,215x^{ns}$	0,83
Metanol	$y = 373,983 - 23,678x^{ns}$	0,68
<i>Maytenus aquifolium</i>		
Extrato bruto	$y = 364,307 - 22,963x^{ns}$	0,64
Hexano	$y = 454,709 - 7,960x^{**}$	0,92
Clorofórmio	$y = 417,781 - 7,485x^{ns}$	0,82
Metanol	$y = 358,156 - 22,881x^{ns}$	0,61

** Significativo pelo teste t ($p < 0,05$); ns – não significativo.

2.4 AVALIAÇÃO DO CONTROLE DE *Cylindrocladium clavatum* EM FOLHAS DE EUCALIPTO

Após o período de incubação de 5 dias em câmara com controle de umidade, escuro e temperatura de 28 °C, as folhas foram digitalizadas e a lesão foliar foi avaliada pelo software QUANT (Figura 8). As menores concentrações resultaram em maiores porcentagens de lesões foliares. A concentração mais efetiva no controle foi a 500 mg L⁻¹. O hexano foi o solvente com maiores danos foliares, corroborando com os resultados das análises anteriores.

Mesmo com mais lesões nas menores concentrações, nenhuma concentração se aproximou da testemunha, condizendo com os dados das análises anteriores.

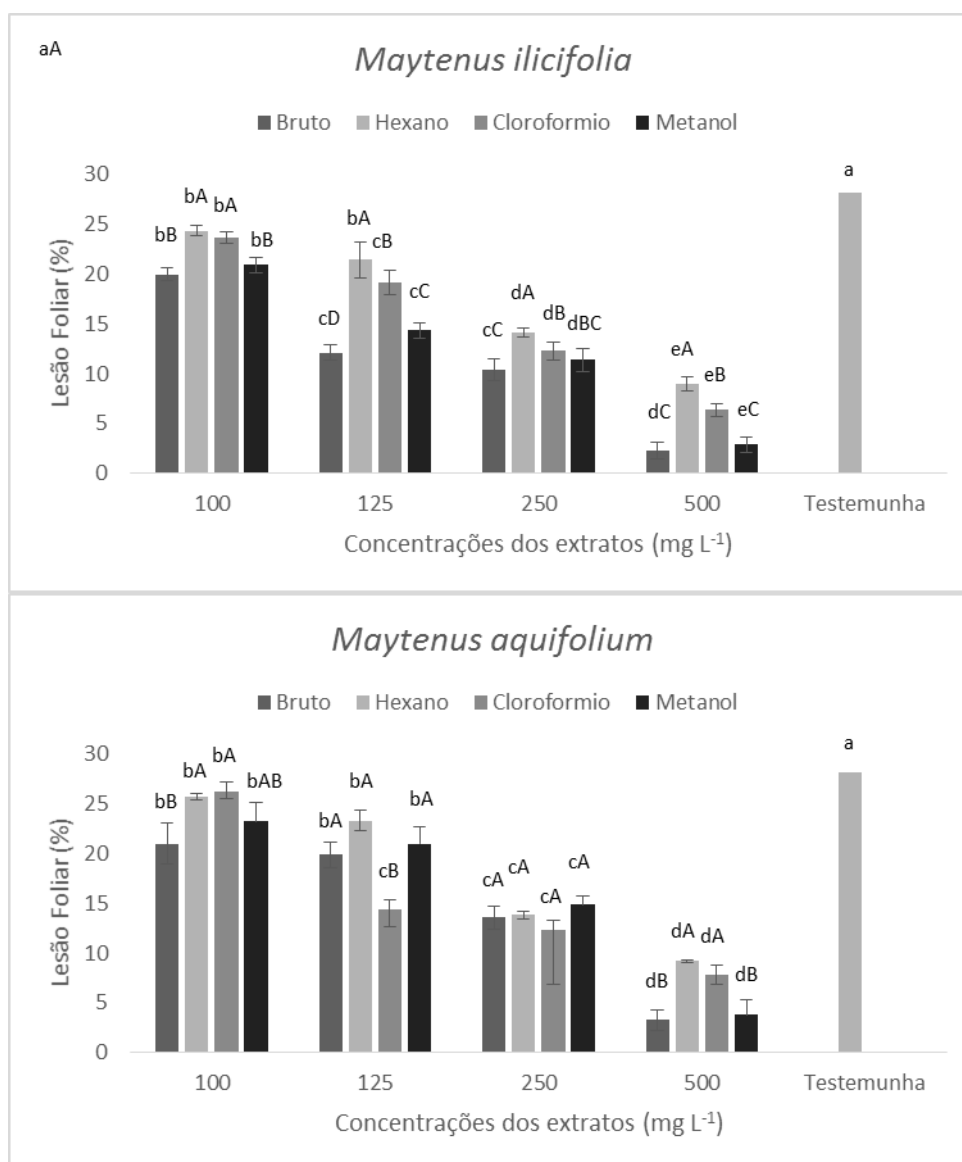


Figura 8 – Área foliar lesionada (%) causada por *Cylindrocladium clavatum* após 5 dias de incubação para os extratos e suas respectivas concentrações testadas. Médias seguidas da mesma letra, minúsculas, entre as concentrações, e maiúscula entre os extratos, não diferem entre si a nível de 95% de probabilidade.

Nas folhas após incubação com um extrato (Figura 9) é possível notar a progressão da lesão com a diminuição da concentração do extrato aplicado.

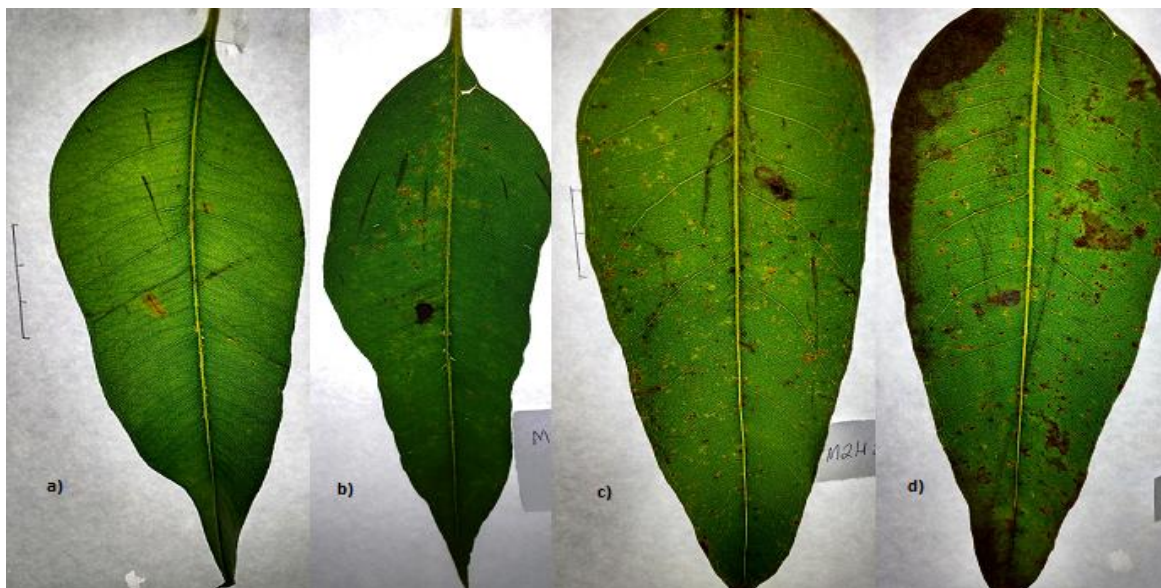


Figura 9 – Folhas após incubação a) 500 mg L⁻¹ b) 250 mg L⁻¹ c) 125 mg L⁻¹ d) 100 mg L⁻¹.

A inibição do desenvolvimento do fungo é de suma importância principalmente na muda de eucalipto e plantas suscetíveis ao *Cylindrocladium* spp. Esse fungo é capaz de causar inúmeras doenças em plantas florestais como eucalipto, pinus e erva mate (DIAS, 2010).

As equações (Tabela 4) com correlação significativa foram obtidas para os extratos hexano para a espécie *M. ilicifolia* e para o extrato bruto e metanol para a espécie *M. aquifolium*. Os coeficientes de determinação para essas equações foram de 0,9, 9,99 e 0,99 respectivamente, indicando excelentes ajustes de reta.

Tabela 5 – Equações de regressão linear para as concentrações dos extratos aplicados sob o fungo *Cylindrocladium clavatum* para as duas espécies testadas na avaliação do controle em folhas de eucalipto, avaliadas em 15 dias.

Atributo	Regressão das concentrações dos extratos	R ²
<i>Maytenus ilicifolia</i>		
Extrato bruto	$y = 501,515 - 5,766x^{ns}$	0,84
Hexano	$y = 674,965 - 6,259x^{**}$	0,9
Clorofórmio	$y = 593,996 - 5,701x^{ns}$	0,9
Metanol	$y = 530,335 - 5,794x^{ns}$	0,9
<i>Maytenus aquifolium</i>		
Extrato bruto	$y = 567,749 - 5,616x^{**}$	0,99
Hexano	$y = 639,327 - 5,487x^{ns}$	0,88
Clorofórmio	$y = 522,380 - 4,594x^{ns}$	0,62
Metanol	$y = 572,889 - 5,237x^{**}$	0,99

** Significativo pelo teste t ($p < 0,05$); ns – não significativo.

Para todas as análises de regressão efetuadas foi possível observar que para cada avaliação os comportamentos das retas era diferentes para os extratos. Isso significa que ao fazer uma análise deve-se levar em consideração o tipo de substâncias interessantes para cada avaliação. Neste caso, busca-se entender como cada fração dos extratos de comportava em relação ao fungo. Foi interessante observar que esse comportamento variou.

Em análises dos gráficos foi possível observar que os extratos também variaram para cada tipo de análise. Indicando que diferentes substâncias são importantes para cada uma. Foi possível observar que o extrato bruto teve mais destaque nas suas aplicações, e isso pode ser explicado pelo fato desse extrato possuir todas as substâncias que possuem nos outros.

4.CONCLUSÃO

Para todos os testes feitos, a concentração de 500 mg L⁻¹ resultou em menores tamanhos de colônia, sendo a concentração de extrato com melhor desempenho. Para a avaliação da concentração inibitória mínima em 5 e 15 dias os melhores extratos foram o bruto e o clorofórmico nas concentrações de 500 mg L⁻¹ e 250 mg L⁻¹ para 5 dias e 500 mg L⁻¹ para as avaliações em 15 dias de incubação. Para a avaliação da esporulação os extratos bruto e metanólico tiveram melhor desempenho, principalmente nas concentrações de 500 mg L⁻¹ e 250 mg L⁻¹, resultando em menor número de esporos. Todas as análises resultaram em dados inferiores à testemunha. Na avaliação da concentração inibitória mínima observa-se que o fungo não é controlado em 100 %, mas sim que o maior efeito dos extratos sob o fungo *Cylindrocadium clavatum* é no retardo do crescimento, e mesmo que posteriormente o fungo cresça não se compara à testemunha. Para os testes em folhas de eucalipto o extrato bruto resultou em menor área de lesão em folhas nas concentrações de 500 mg L⁻¹ e 250 mg L⁻¹. Com isso é possível perceber que o extrato é mais efetivo quando se aplica na forma bruta e mais concentrada, sendo possível a utilização do extrato sem nenhuma modificação, facilitando seu uso.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS T. F. D. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2 ed. Viçosa, MG. UFV, 2009.
- ALVES, A. O., OLIVEIRA, R. M., WEISS, G. C. C., BONADIMAN, B. S. R., & SANTOS, R. C. V. (2016). **Análise fitoquímica e avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana de *Maytenus ilicifolia***. XXV CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 2016.
- BENEDETTI, E. L., WINK, C., SANTIN, D., SEREDA, F., ROVEDA, L. F., & SERRAT, B. M. Crescimento e sintomas em mudas de Espinheira-Santa com omissão de nitrogênio, fósforo e potássio. **Floresta**, Curitiba, v. 39, n. 2, p. 335–343, 2009.
- CARVALHO FILHO, M. ***Trichoderma* spp. como agentes de controle de *Cylindrocladium scoparium* e como promotores de crescimento em mudas de eucalipto**. 2008. 86f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília.
- CUNICO, M. M.; CIRIO, G. M.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D.; MONTRUCCHIO, D. P.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. Contribuição ao estudo da atividade antifúngica de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., *Celastraceae*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 12, n. 2, p. 69–73, 2002.
- DIAS, A. C. R. **Controle químico de doenças de *Eucalyptus* spp. em viveiros e seus efeitos morfo-fisiológicos**. 2010. 121p. Dissertação (Mestrado em Ciência florestal) - Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”, Botucatu.
- FILHO, A. B.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia**. 3 ed. v .1. São Paulo, SP. Agronômica Ceres. 1995.
- GLERIANO, M. R. C. **Perfil antimicrobiano de extratos hidroalcoólico de plantas nativas e exóticas no controle de *Aspergillus niger***. XV Congresso de iniciação científica, 2015.
- JUNIOR, A. G.; LAU, D. Crescimento de isolados de *Cylindrocladium spathulatum* da erva-mate, de cinco regiões do estado do Paraná. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Brasília, v. 1, n. 38, p. 67–75. 1999.
- KRUGNER, T. L. Controle de doenças fúngicas em viveiros de *eucalyptus* e *pinus*. IPEF-Instituto de pesquisas e estudos florestais. Circular técnica nº 26, 1997.
- MARIOT, M. P.; BARBIERI, R. L. O conhecimento popular associado ao uso da Espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* e *M. aquifolium*). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 1, p. 666–668, 2007.
- SALUSTIANO, M. E.; FERRAZ FILHO, A. C.; POZZA, E. A.; DE CASTRO, H. A. Extracts of candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) Macleish) in the inhibition in vitro of *Cylindrocladium scoparium* and four rust species. **Cerne**, Lavras, v. 12, n. 2, p. 189–193, 2006.

VALE, F. R. X; FERNANDES FILHO, E. I. LIBERATO, J. R. A software plant disease severity assessment. In: International congress of plant pathology. **Christchurch. Proceedings Christchurch:** international society for plant pathology. 2003, p.105.

CONCLUSÕES GERAIS

Na primeira parte deste trabalho (Artigo 1), observamos que as folhas de *M. ilicifolia* e *M. aquifolium* tem semelhante atividade antioxidante. Também que os extratos brutos e os extratos obtidos com metanol têm resultados superiores aos demais extratos, para todos os métodos de avaliação do potencial antioxidantes analisados. Com relação aos métodos de extração, a percolação a 28 °C e ultrassom a 50 °C resultou em maiores teores de atividade antioxidante.

A segunda parte deste documento (Artigo 2) pode ser considerada uma continuação da primeira parte. Nessa fase foram analisados aspectos microbiológicos dos extratos obtidos a partir das mesmas espécies avaliadas na primeira parte, os métodos de extração que mais se destacou e a mesma metodologia para o fracionamento por cromatografia.

Esses aspectos microbiológicos são sob o fungo *Cylindrocladium clavatum*. Foram avaliados a atividade antifúngica do extrato e a concentração inibitória mínima que este possuía (já que houve ação inibitória). Também foi testado a esporulação do fungo com a ação do extrato e por fim como este agia aspergido em folhas de eucalipto que continham discos do fungo.

No Artigo 2 a concentração de 500 mg L⁻¹ resultou em colônias com tamanhos menores. Essa concentração de extrato foi definida como concentração inibitória mínima já que foi destaque na retenção do crescimento da colônia. Na avaliação da concentração inibitória mínima em 5 e 15 dias os melhores extratos foram os obtidos a partir do método de extração principal (bruto) e também o obtido a partir da cromatografia com o solvente clorofórmio.

Na avaliação da esporulação, os extratos bruto e o obtido com solvente metanol, tiveram melhor desempenho resultando em menor número de esporos. Ainda que se avaliou a esporulação apenas com 15 dias de incubação, já que com 5 dias as colônias não haviam esporulado. Para os testes em folhas de eucalipto o extrato bruto resultou em menor área de lesão em folhas. As duas espécies se comportam de forma semelhante em relação as análises avaliadas.

Os aspectos de atividade antioxidante e microbiológicos das duas espécies avaliadas são semelhantes, e isso pode explicar o porquê de as duas espécies serem muito utilizadas na indústria.

É possível observar que o extrato que mais se destacou nas análises foi o obtido diretamente com o método de extração, chamado de extrato bruto. No Artigo 1 também se

destaca o extrato obtido com metanol, esse mesmo extrato também teve dados destacados para a análise em folhas de eucalipto.

Os métodos de extração avaliados no Artigo 1 não tiveram resultados semelhantes com os resultados microbiológicos e nem com os teores de atividade antioxidante. Sendo possível afirmar que maiores teores de matéria extraída não significam maiores teores de moléculas bioativas. Isso porquê muitas vezes a temperatura utilizada na extração foi muito alta, fazendo com que agredisse mais a matéria e extraíndo mais componentes, mas também degradando muitos deles e fazendo com que se perdesse as suas propriedades.

A aplicação dos extratos sob as folhas de eucalipto inoculadas com o fungo, juntamente com a avaliação da concentração inibitória mínima demonstraram que a aplicação não inibe o fungo, mas sim que o retarda, fazendo com que a aplicação desse extrato seja interessante no auxílio da planta na sua defesa contra o fungo. Com isso surge o questionamento: A aplicação desse fungo é interessante de forma a proteger a planta de ataques desse tipo de patógeno? Como resposta surgem outros questionamentos: A aplicação desse extrato de forma preventiva pode ativar rotas metabólicas desnecessárias? Ou então: Os grandes teores de moléculas sequestradoras de radicais livres da *M. ilicifolia* e *M. aquifolium* podem ativar as defesas das plantas? Ou vão inibir a explosão oxidativa fazendo com que retarde as defesas da planta? As respostas para esses questionamentos estão nesse trabalho: A aplicação de forma remediativa (ou seja, quando o fungo já atacou a planta) vai auxiliar a planta na defesa, fazendo com que o crescimento do fungo seja retardado.

Por isso, o uso dos extratos afim de evitar o uso de agrotóxicos que prejudicam o meio ambiente e causam desordem ambiental é indicado.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS T. F. de. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2 ed. Viçosa, MG. UFV, 2009.
- BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. de L. P. Flavonóides quercetinas: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos Nutricionais**. Araraquara, v. 5, n. 3, p. 285 – 292, 2004.
- BENEDETTI, E. L.; WINK, C.; SANTIN, D.; SEREDA, F.; ROVEDA, L. F.; SERRAT, B. M. Crescimento e sintomas em mudas de Espinheira-Santa com omissão de nitrogênio, fósforo e potássio. **Floresta**, Curitiba, v. 39, n. 2, p. 335–343, 2009.
- BETTIOL, W. Conversão de sistemas de produção. In: Poltronieri, L.S. & Ishida, A.K.N. (Eds.) Métodos Alternativos de Controle de Insetos-Praga, Doenças e Plantas Daninhas: Panorama atual e perspectivas. Belém. **Embrapa Amazônia Oriental**. 2008. pp. 289-308.
- BETTIOL, W; GHINI. R. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. In: Campanhola, C. & Bettiol, W. (Eds.) Métodos Alternativos de Controle Fitossanitário. Jaguariúna. **Embrapa Meio Ambiente**. 2003. pp. 79-95.
- CARDOSO, R. S. B. Algumas considerações sobre a monocultura do eucalipto e suas implicações. **Statewide Agricultural Land Use Baseline**. 2015 Disponível em: <<http://www.uff.br/vsinga/trabalhos/Trabalhos%20Completo/Rafael%20Said%20Bhering%20Cardoso.pdf>>. Acesso em: 02/01/2018.
- CARRÉ, V. et al. Fungitoxicidade de quitosana e extrato de *Artemisia camphorata* a *Colletotrichum musae*. **Fitopatol. Bras.** Brasília, v. 27, p. 291, 2002. (Resumo).
- CARVALHO-OKANO, R. M. **Estudos taxonômicos do gênero *Maytenus Mol emend. Mol. (CELASTRACEAE)* do Brasil extra-amazônico**. 1992. 257p. Tese (Doutorado em Ciências - Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- CELOTO, M. I. B.; PAPA, M. DE F. S.; DO SACRAMENTO, L. V. S.; CELOTO, F. J. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 30, n. 1, p. 1–5. 2008.
- CHABARIBERI, R. D. A. O.; POZZI, A. C. S.; ZERAIK, M. L.; YARIWAKE, J. H. Determinação espectrométrica dos flavonóides das folhas de *Maytenus (Celastraceae)* e de *Passiflora (Passifloraceae)* e comparação com método CLAE-UV. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Joao Pessoa, v. 19, n. 4, p. 860–864, 2009.
- CUNICO, M. M., CIRIO, G. M., MIGUEL, O. G., MIGUEL, M. D., MONTRUCCHIO, D. P., AUER, C. G., & GRIGOLETTI JÚNIOR, A. Contribuição ao estudo da atividade antifúngica de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., *Celastraceae*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Joao Pessoa, v. 12, n. 2, p. 69–73, 2002.

DIAS, A. C. R.. **Controle químico de doenças de *Eucalyptus* spp. em viveiros e seus efeitos morfo-fisiológicos**. 2010. 121p. Dissertação (Mestrado em Ciência florestal) - Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”, Botucatu.

DIGRAK, M. et al. Antibacterial and antifungal effects of various commercial plant extracts. **Pharm. Biol.**, Kahramanmaras, v. 37, n. 3, p. 216-220, 1999.

FERREIRA, E.; ALFENAS, A.; MAFFIA, L.; MAFIA, R. Eficiência de Fungicidas Sistêmicos para o Controle de *Cylindrocladium candelabrum* em Eucalipto. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 5, p. 468–475. 2006.

FILHO, A. B.; KIMATI, H.; AMORIM, L.; **Manual de fitopatologia**. 3 ed. v .1. São Paulo, SP. Agronômica Ceres. 1995.

GALLICE, Wellington C. **Caracterização do potencial antioxidante e vinhos e quantificação de fenóis totais e trans-resveratrol utilizando técnicas cromatográficas e espectroscópicas multivariadas**. 2010. 87f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2010.

JORGE, R. M., LEITE, J. P. V., OLIVEIRA, A. B., TAGLIATI, C. A., 2004. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. *J. ethnopharmacol.* v. 94, p. 93-100.

JUNIOR, A. G.; LAU, D. Crescimento de isolados de *Cylindrocladium spathulatum* da erva-mate, de cinco regiões do estado do Paraná. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, v. 1, n. 38, p. 67–75. 1999.

KROGH, R. **Isolamento e identificação de triterpenos friedelanos de *Maytenus robusta* reiss**. 1996. 122p. Dissertação (Mestrado em química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

KRUGNER, T. L. **Controle de doenças fúngicas em viveiros de *Eucalyptus* e *Pinus***. IPEF - Instituto de pesquisas e estudos florestais. Circular técnica nº 26, 1997.

LIMA, O.G.; ALBUQUERQUE, I.L.; COELHO, J.S.B.; MARTINS; D.G.; LACERDA, A.L. & MACIEL, G.J. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. **Revista do Instituto de Antibiótico**, Recife, v. 9, p. 17-25, 1969.

LIMA, O. G., COELHO, J.S.B., WEIGERT E., D’ALBUQUERQUE I. L., SOUZA, M. A. M. 1969. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. **Rev Inst Antibióticos**, Recife, v. 9, p. 17-25.

MABE, K., YAMADA, M., OGUNI, I. 1999. In vitro and in vivo activities of tea catechins against *Helicobacter pylori*. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v. 43, p. 1788-1791.

MARIOT, M. P.; BARBIERI, R. L. O conhecimento popular associado ao uso da Espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* e *M. aquifolium*). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 1, p. 666–668, 2007.

- MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2 ed. Fortaleza, CE. UFC, 1997.
- MILAN, M.D.; BARROSO, F.M; MELLO, S.C.M; ARAÚJO, M.S.; CARVALHO, D.D.C. Regimes de luz na produção de conídios de *Trichoderma harzianum* para controle do mofo branco em feijoeiro. **Pesq. Agropec. Trop.**, Goiânia, v. 45, n. 4, p. 434-439, out./dez. 2015.
- MORA, A. L; GARCIA, C. H. **A cultura do eucalipto no Brasil**. São Paulo, SP. 2000.
- NEGRI, M. L. S.; POSSAMAI, J. C.; NAKASHIMA, T. Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., secas em diferentes temperaturas. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, João Pessoa, v. 19, n. 2 b, p. 553–556, 2009.
- OLDONI, Tatiane L. C. **Prospecção e identificação de compostos bioativos de subprodutos agroindustriais**. 2010. 163f. Tese (Doutorado em ciências) – Universidade de São Paulo – Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Piracicaba, 2010.
- PINTO, E. P.; MOREIRA, A. da S.; MACHADO, M. R. G.; RODRIGUES, R. da S. **A uva como um alimento funcional**. **Revista Brasileira de Viticultura e Enologia**, Bento Gonsalves, v. 3, p. 66 – 73, set. 2011.
- PORTILLO, A.; VILA, R.; FREIXA, B.; ADZET, T.; CAÑIGUERAL, S. Antifungal activity of Paraguayan plants used traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 1, p. 93-98, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874101002148>>. Acesso em: 3 set. 2011.
- SALUSTIANO, M. E.; FERRAZ FILHO, A. C.; POZZA, E. A; DE CASTRO, H. A. Extracts of candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) Macleish) in the inhibition in vitro of *Cylindrocladium scoparium* and four rust species. **Cerne**, Lavras, v. 12, n. 2. p 189–193, 2006.
- SANTOS, Á. F. D; AUER, C. G.; GRIGOLETTI, A. **Doenças do eucalipto no sul do Brasil: identificação e controle**. Ministério da agricultura e do abastecimento. Circular Técnica nº 45, 2001.
- SANTOS-OLIVEIRA, R.; COULAUD-CUNHA, S.; COLAÇO, W. Revisão da *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, *Celastraceae*. Contribuição ao estudo das propriedades farmacológicas. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, João Pessoa, v. 19, n.2 B, p. 650–659. 2009.
- SATO, J. et al. Antifungal activity of plant extracts against *Arthrinium sacchari* and *Chaetomium funicola*. **J. Biosci. Bioeng.**, Tokyo, v. 90, n. 4, p. 442-446, 2000.
- SILVA, A. A. da; Gonçalves, R. C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. **Ciência Rural**, Botucatu, v. 40, n. 4, 2010.
- SILVA, M.V. et al. Growth inhibition effect of Brazilian cerrado plant extracts on *Candida* species. **Farm. Bio.**, Goiânia, v. 39, n. 2, p. 138-141, 2001.

SINGH, B., DUBEY, M. M. 2001. Estimation of triterpenoids from *Heliotropium maifolium* Kohen ex Retz in vivo and in vitro: antimicrobial screening. **Phytother Res**, v. 15, p. 231-234

SHAIKI, F; NACZK, M. **Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications**. Lancaster: Technomic Publishing, p. 281-319,1995.

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