

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
TROPICAL

SOCORRO CRISTINA TAVARES DA COSTA

**FUNGOS ENDOFÍTICOS E EXTRATOS VEGETAIS NO
CONTROLE ALTERNATIVO DA MANCHA-ALVO DO
TOMATEIRO**

Manaus, AM
2018

SOCORRO CRISTINA TAVARES DA COSTA

**FUNGOS ENDOFÍTICOS E EXTRATOS VEGETAIS NO
CONTROLE ALTERNATIVO DA MANCHA-ALVO DO
TOMATEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia Tropical, área de concentração em Produção Vegetal.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Jânia Lília da Silva Bentes Lima
Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Antônia Queiroz Lima de Souza

Manaus, AM
2018

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C837f Costa, Socorro Cristina Tavares da
Fungos endofíticos e extratos vegetais no controle alternativo da
mancha-alvo do tomateiro / Socorro Cristina Tavares da Costa.
2018
98 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Jânia Lília da Silva Bentes Lima
Coorientadora: Antônia Queiroz Lima de Souza
Dissertação (Mestrado em Agronomia Tropical) - Universidade
Federal do Amazonas.

1. Extrato vegetal. 2. Endofíticos. 3. Antagonismo. 4. *Corynespora*
cassicola. I. Lima, Jânia Lília da Silva Bentes II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título

SOCORROCRISTINA TAVARES DA COSTA

FUNGOS ENDOFÍTICOS E EXTRATOS VEGETAIS NO
CONTROLE ALTERNATIVO DA MANCHA-ALVO DO
TOMATEIRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia Tropical, área de concentração em Produção Vegetal.

Aprovada em 30 de abril de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Jânia Lília da Silva Bentes Lima, Presidente
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Neliton Marques da Silva, Membro
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Rogério Eiji Hanada, Membro
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Maria Wilma Tavares da Costa e Gerson Ramos da Costa, meus pais, pelo amor, incentivo e por acreditarem em mim; aos meus irmãos, pelo carinho e apoio nos momentos em que não pude estar presente ao longo desta trajetória científica.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela disposição diária para concluir esta jornada de estudos;

Aos meus pais Maria Wilma Tavares da Costa e Gerson Ramos da Costa, por me ajudarem na realização de um sonho e por todo suporte emocional;

Aos meus irmãos, que sempre estiveram a meu lado me apoiando, mesmo diante das dificuldades.

À minha filha de coração, Evelyn Monteiro Gadelha, pela força, coragem e ajuda em todos os momentos;

À Dra. Jânia Lília da Silva Bentes Lima e Dra. Antônia Queiroz Lima de Souza, pela paciência e orientação;

Ao Dr. José Ferreira, pelo espaço cedido no Laboratório de Plantas Daninhas- UFAM e pelos conselhos pessoais e profissionais de grande ajuda;

Ao Dr. Ari Hidalgo, pela ajuda nas coletas de campo de todas as espécies utilizadas para o preparo dos extratos vegetais;

Ao Msc. Luiz Alberto Guimarães Assis (Tirico), pelo empréstimo de lâminas escavadas, primordiais ao andamento dos ensaios *in vitro*.

Ao Prof. Msc. Matheus Caniato, pela valiosa contribuição nas análises estatísticas;

Aos meus companheiros de mestrado Marcelo, Alexandre, Ajax, Vilson e Galileo pela ajuda, principalmente em campo, quando precisava de força masculina para o desempenho das atividades;

Aos colegas Francinaldo, André, Leonardo, Rafael, Sara, Marta e Lílian, por todo suporte dado nas análises químicas.

Aos técnicos Antônio, Moacir e Franky, por todo apoio nas atividades em casa de vegetação.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

RESUMO

Metabólitos secundários presentes em fungos endofíticos e em plantas medicinais apresentam várias propriedades biológicas, incluindo a atividade antifúngica. Neste contexto, foram testados 141 fungos endofíticos isolados de folhas e sementes de guaranazeiro (*Paullinia cupana* Kunth), extratos brutos aquosos de folhas de *Picrolemma sprucei* Hook.f (caferana), *Croton cajucara* Benth. (sacaca), *Piper marginatum* Jacq. (caapeba) e rizoma de *Curcuma zedoaria* (Christin.) Rosc (curcuma) preparados nas concentrações de 0 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 % e de 50 %, e frações hexânicas, acetato-etílicas e metanólicas contra o fitopatógeno *Corynespora cassiicola*. Treze isolados endofíticos apresentaram inibição entre o antagonista e o patógeno, sendo que os isolados 3012 R1 e 3031 R2 apresentaram o maior valor de inibição, mostrando seus potenciais para futuros estudos no biocontrole de fungos do gênero *Corynespora*. Bioensaios *in vitro* (crescimento micelial, esporulação, germinação de esporos, bioautografia direta e concentração inibitória mínima) e *in vivo* (efeito do extrato bruto aquoso de *P. marginatum* em mudas de tomate) mostraram que as frações hexânica e acetato-etílica de *P. marginatum* reduziram o crescimento micelial, a esporulação e a germinação do patógeno, e que o extrato bruto de *P. sprucei* apresentou as maiores porcentagens de inibição dessas variáveis. Na bioautografia direta, foram detectadas zonas de inibição de crescimento micelial nas frações hexânica e acetato-etílica de *P. marginatum*, que apresentaram concentração inibitória mínima (CIM) de 2,5 mg.mL⁻¹. O teste *in vivo* mostrou que o controle da mancha-alvo em tomateiro não foi viável nas condições testadas do extrato bruto de *P. marginatum*.

Palavras-chave: Extrato vegetal. Endofíticos. Antagonismo. *Corynespora cassiicola*.

ABSTRACT

Secondary metabolites present in endophytic fungi and medicinal plants have several biological properties, including antifungal activity. In this context, 141 endophytic fungi isolated from guaraná leaves and seeds (*Paullinia cupana* Kunth), crude aqueous extracts of leaves of *Picrolemma sprucei* Hook.f (caferana), *Croton cajucara* Benth. (sacaca), *Piper marginatum* Jacq. (caapeba) and rhizome of *Curcuma zedoaria* (Christin.) Rosc (curcuma) prepared at the concentrations of 0 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 % and 50 %, and hexanic, ethyl acetate and methanolic fractions phytopathogen *Corynespora cassiicola*. Thirteen endophytic isolates showed inhibition between the antagonist and the pathogen, whereas the isolates 3012 R1 and 3031 R2 presented the highest inhibition value, showing their potential for future studies on the biocontrol of fungi of the genus *Corynespora*. In vitro bioassays (mycelial growth, sporulation, spore germination, direct bioautography and minimal inhibitory concentration) and in vivo (effect of the crude aqueous extract of *P. marginatum* on tomato seedlings) showed that the hexane and ethyl acetate fractions of *P. marginatum* reduced mycelial growth, sporulation and germination of the pathogen, and that the crude extract of *P. sprucei* presented the highest percentages of inhibition of these variables. In direct bioautography, zones of inhibition of mycelial growth were detected in the hexanic and acetate-ethylic fractions of *P. marginatum*, which presented a minimum inhibitory concentration (MIC) of 2.5 mg.mL⁻¹. The in vivo test showed that control of the target spot in tomato was not feasible under the tested conditions of the crude extract of *P. marginatum*.

Keywords: Vegetable extract. Endophytics. Antagonism. *Corynespora cassiicola*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Seleção massal in vitro utilizando 141 isolados endofíticos.....	25
Figura 2 - Mapa do Setor Sul da Universidade Federal do Amazonas representando o local de coleta dos materiais vegetais	26
Figura 3 - Exsicatas depositadas no Herbário da Universidade Federal do Amazonas - UFAM. A) <i>Picrolemma sprucei</i> , B) <i>Piper marginatum</i>	27
Figura 4 - Espécies vegetais (A); Lavagem das folhas e rizomas (B); secagem das folhas em bancada (C); Ensacamento em jornal (D) e Secagem em estufa (E)	28
Figura 5 - Processo de obtenção do extrato bruto aquoso das folhas de <i>Picrolemma sprucei</i> , <i>Croton cajucara</i> , <i>Piper marginatum</i> , e rizomas de <i>Curcuma zedoaria</i>	28
Figura 6 - Processo de obtenção dos extratos fracionados: Material vegetal seco e imersão da biomassa em solvente (A e B); material vedado (C) e filtração em bomba de vácuo (D). Esquema de partição líquido-líquido para obtenção das frações hexânicas das folhas de <i>Picrolemma sprucei</i> , <i>Croton cajucara</i> , <i>Piper marginatum</i> , e rizomas de <i>Curcuma zedoaria</i> (E)	30
Figura 7 - Esquema geral de partição e separação provável dos principais metabólitos secundários presentes nas plantas estudadas	30
Figura 8 - Rotaevaporador e secagem das amostras em dessecador	31
Figura 9 - Quantificação (A) e germinação (B) de esporos de <i>Corynespora cassiicola</i>	33
Figura 10 - Cromatografia de camada delgada, aplicação e desenvolvimento	34
Figura 11 - Observação das amostras sob luz ultravioleta em comprimentos de onda de 254 nm e 366 nm (A) no equipamento CAMAG TLC VISUALIZER (B)	36
Figura 12 - Representação do ensaio da concentração mínima inibitória para determinação da atividade antifúngica das frações hexânica e acetato etílicas de <i>Piper marginatum</i>	38
Figura 13 - Inibição formada entre o crescimento micelial de <i>Corynespora cassiicola</i> e dos isolados endofíticos do guaranazeiro	43
Figura 14 - Porcentagem de inibição do crescimento micelial de <i>Corynespora cassiicola</i> em diferentes concentrações de extrato bruto aquoso de <i>Picrolemma sprucei</i> , <i>Curcuma zedoaria</i> , <i>Croton cajucara</i> e <i>Piper marginatum</i> . Médias dos dados originais sem transformação. **Significativo a 1 % pelo teste F	49
Figura 15 - Inibição da esporulação de conídios de <i>Corynespora cassiicola</i> em diferentes concentrações de extrato bruto aquoso de <i>Picrolemma sprucei</i> , <i>Curcuma zedoaria</i> , <i>Croton cajucara</i> e <i>Piper marginatum</i> . *Significativo a 5 % pelo teste F. ^{ns} Não significativo pelo teste F	51
Figura 16 - Inibição da germinação de conídios de <i>Corynespora cassiicola</i> em diferentes concentrações de extrato bruto aquoso de <i>Picrolemma sprucei</i> , <i>Curcuma zedoaria</i> , <i>Croton cajucara</i> e <i>Piper marginatum</i> . *Significativo a 5 % pelo teste F. ^{ns} Não significativo pelo teste F	53
Figura 17 - Índice de crescimento micelial das espécies <i>Picrolemma sprucei</i> , <i>Curcuma zedoaria</i> , <i>Croton cajucara</i> e <i>Piper marginatum</i> utilizadas nos extratos brutos aquosos	55

Figura 18 - Efeito de seis concentrações de extratos brutos aquosos de <i>Picrolemma sprucei</i> , <i>Curcuma zedoaria</i> , <i>Croton cajucara</i> e <i>Piper marginatum</i> no índice de crescimento micelial (ICM) de <i>Corynespora cassiicola</i> , doze dias após a incubação. *Significativo a 5 % pelo teste F. Média Geral = 4.43219. CV % = 6.53	55
Figura 19 - Efeito dos extratos de <i>Picrolemma sprucei</i> , <i>Curcuma zedoaria</i> , <i>Croton cajucara</i> e <i>Piper marginatum</i> a 5 mg.mL ⁻¹ , no índice de crescimento micelial (ICM) de <i>Corynespora cassiicola</i> , dez dias após a incubação	62
Figura 20 - Cromatografia em camada delgada da fração hexânica das espécies <i>Picrolemma sprucei</i> , <i>Curcuma zedoaria</i> , <i>Croton cajucara</i> e <i>Piper marginatum</i> (de 1 a 4, respectivamente) em três sistemas de eluição: AcoEt:MeOH 3:7; Hex: AcoEt 7:3 e Hex:AcoEt:MeOH 7:2:1	64
Figura 21 - Cromatografia em camada delgada da fração acetato-etílica das espécies <i>Picrolemma sprucei</i> , <i>Curcuma zedoaria</i> , <i>Croton cajucara</i> e <i>Piper marginatum</i> (de 1 a 4, respectivamente) em três sistemas de eluição: AcoEt:MeOH 3:7; Hex: AcoEt 7:3; Hex:AcoEt:MeOH 7:2:1	65
Figura 22 - Cromatografia em camada delgada da fração metanólica das espécies <i>Picrolemma sprucei</i> , <i>Curcuma zedoaria</i> , <i>Croton cajucara</i> e <i>Piper marginatum</i> (de 1 a 4, respectivamente) em quatro sistemas de eluição: AcoEt:MeOH 3:7; Hex: AcoEt 7:3; Hex:AcoEt:MeOH 7:2:1 e AcoEt:MeOH 5:5	66
Figura 23 - Representação dos R _f 's dos três sistemas de eluição escolhidos para as frações hexânica (A), acetato-etílica (B) e metanólica (C)	66
Figura 24 - Placas de CCD grandes reveladas em luz UV de 366 nm que serviram de controle para o ensaio bioautográfico	68
Figura 25 - Bioautografia da fração hexânica de <i>Picrolemma sprucei</i> , <i>Curcuma zedoaria</i> , <i>Croton cajucara</i> e <i>Piper marginatum</i>	69
Figura 26 - Bioautografia da fração acetato-etílica de <i>Picrolemma sprucei</i> , <i>Curcuma zedoaria</i> , <i>Croton cajucara</i> e <i>Piper marginatum</i>	69
Figura 27 - Bioautografia da fração metanólica de <i>Picrolemma sprucei</i> , <i>Curcuma zedoaria</i> , <i>Croton cajucara</i> e <i>Piper marginatum</i>	70
Figura 28 - Diluição seriada da suspensão de esporos utilizada na bioautografia	71
Figura 29 - Concentração inibitória mínima das frações hexânica e acetato-etílica de <i>Piper marginatum</i>	73
Figura 30 - Determinação da concentração fungicida mínima da fração hexânica de <i>Piper marginatum</i> (A) e determinação da concentração fungistática mínima da fração acetato-etílica de <i>Piper marginatum</i> (B)	75
Figura 31 - Tamanho da maior lesão da macha-alvo em folhas de tomateiro. Médias com as mesmas letras nas colunas não diferem significativamente pelo teste de Kruskal-Wallis. As barras verticais correspondem ao erro de 5 %	76
Figura 32 - Curvas de progresso da doença baseado no número de lesões	78
Figura 33 - Variáveis não incluídas na discussão dos resultados em casa de vegetação	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Volume de reagente adicionado ao material vegetal às 0 h e às 48 h antes da filtração	29
Tabela 2 - Sistemas de solventes empregados em CCD em placas de sílica gel 60 G para eluição das frações hexânicas, acetato-etílicas e metanólicas	35
Tabela 3 - Tratamentos aplicados no experimento da casa de vegetação	40
Tabela 4 - Inibição formada de <i>Corynespora cassiicola</i> frente aos isolados endofíticos de guaranazeiro	42
Tabela 5 - Porcentagem de inibição do crescimento micelial, da esporulação e da germinação de conídios de <i>Corynespora cassiicola</i> por extrato bruto de <i>Picrolemma sprucei</i> , <i>Curcuma zedoaria</i> , <i>Croton cajucara</i> e <i>Piper marginatum</i>	46
Tabela 6 - Rendimento total das frações hexânicas, acetato-etílicas e metanólicas das espécies <i>Picrolemma sprucei</i> , <i>Curcuma zedoaria</i> , <i>Croton cajucara</i> e <i>Piper marginatum</i> .	57
Tabela 7 - Porcentagens de inibição do crescimento micelial, da esporulação, da germinação e índice de crescimento micelial do patógeno <i>Corynespora cassiicola</i> nas frações hexânicas, acetato-etílicas e metanólicas de <i>Picrolemma sprucei</i> , <i>Curcuma zedoaria</i> , <i>Croton cajucara</i> e <i>Piper marginatum</i>	58
Tabela 8 - Rf's e colorações dos supostos compostos encontrados nas frações hexânica, acetato-etílica e metanólica das espécies estudadas, identificados na luz ultravioleta (366 nm) após revelação com vanilina sulfúrica	67
Tabela 9 - Número de conídios presentes na suspensão utilizada na bioautografia	72

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.	15
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3.1 Tomateiro.....	16
3.2 Mancha - Alvo (<i>Corynespora cassiicola</i>).....	17
3.3 Métodos alternativos de controle de doenças de plantas.	18
3.4 Fungos endofíticos no controle de doenças de plantas.	20
3.5 Plantas como antifúngicos naturais.....	20
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Obtenção dos fungos endofíticos e de <i>Corynespora cassiicola</i>	24
4.2 Avaliação do potencial de fungos endofíticos na inibição do crescimento <i>in vitro</i> de <i>Corynespora cassiicola</i>	25
4.3 Avaliação do potencial de extratos vegetais na inibição do crescimento, produção e germinação de esporos de <i>Corynespora cassiicola in vitro</i>	26
4.3.2 Obtenção dos extratos brutos e frações.	28
4.3.3 Avaliação do efeito dos extratos brutos e fracionados no crescimento micelial de <i>Corynespora cassiicola</i>	31
4.3.4 Avaliação do efeito dos extratos brutos e fracionados na produção e germinação de esporos de <i>Corynespora cassiicola</i>	32
4.3.5 Bioautografia direta.	34
4.3.6 Ensaio bioautográfico.	37
4.3.7 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	37
4.3.8 Concentração Fungicida Mínima (CFM).	39
4.4 Avaliação do efeito do extrato aquoso de <i>Piper marginatum</i> sobre a mancha-alvo em plantas de tomateiro em casa de vegetação.....	39
4.4.3 Avaliação da severidade da mancha-alvo em tomateiro em casa de vegetação.	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 Avaliação do potencial de fungos endofíticos isolados do guaranazeiro na inibição do crescimento micelial de <i>Corynespora cassiicola in vitro</i>	41
5.2 Avaliação do potencial dos extratos brutos aquosos na inibição do crescimento micelial, produção e germinação de esporos de <i>Corynespora cassiicola in vitro</i>	45
5.3 Avaliação do potencial de extratos fracionados na inibição do crescimento micelial, produção e germinação de esporos de <i>Corynespora cassiicola in vitro</i>	56

5.4 Cromatografia de camada delgada dos extratos de <i>Picrolemma sprucei</i> , <i>Curcuma zedoaria</i> , <i>Croton cajucara</i> e <i>Piper marginatum</i>	63
5.4 Ensaio bioautográfico.	68
5.6 Determinação da concentração mínima inibitória das frações hexânica e acetato-etílica de <i>Piper marginatum</i>	72
5.7 Determinação da concentração fungicida mínima das frações hexânica e acetato-etílica de <i>Piper marginatum</i>	74
5.6 Avaliação do efeito do extrato bruto de <i>P. marginatum</i> no controle da mancha-alvo em tomateiro em casa de vegetação.....	75
6 CONCLUSÃO	82
REFERÊNCIAS	83
ANEXOS	92

1 INTRODUÇÃO

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das oleráceas mais cultivadas no mundo segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura – FAO (2014), e um dos principais entraves para a sua produção na região Amazônica são as condições ambientais. O ambiente quente e úmido favorece a incidência de doenças, o ataque de pragas e prejudica a polinização das flores do tomateiro, além dos solos ácidos e pobres em nutrientes (LUZ et al., 2002).

O tomateiro é afetado por diversas doenças causadas, principalmente, por patógenos fúngicos (REIS e MADEIRA, 2009), dentre eles, o fungo *Corynespora cassicola* (Berk. & Curt.) Wei, agente causal da mancha-alvo (LOPES e REIS, 2011), que é considerada a mais séria doença foliar desta cultura em regiões de clima quente e úmido (JONES et al., 1997).

Não há no Brasil fungicidas registrados para o controle da doença na cultura de tomate (MAPA, 2018) e o controle químico é feito pelo uso de produtos indicados para outras doenças. Métodos alternativos de manejo são sugeridos, como nutrição equilibrada das plantas, mudança da época de plantio, controle biológico, rotação de cultura, cultivo protegido, entre outros (LUZ et al., 2002). Como opção ao uso de fungicidas, o controle alternativo de fitopatógenos tem se apresentado como uma forma promissora e viável, por meio do uso de micro-organismos como agentes de controle (KUNOH, 2002), capazes de produzir substâncias deletérias aos fitopatógenos (M'PIGA et al., 1997), e/ou competindo por espaço e nutrientes, indiretamente induzindo resistência sistêmica no hospedeiro (VAN VEES et al., 1999) e/ou pela produção de substâncias promotoras de crescimento (VARMA et al., 1999).

No Amazonas existe uma diversidade de espécies de plantas medicinais disponíveis para serem avaliadas quanto ao seu potencial no controle de fitopatógenos. Estudos de bioprospecção destas espécies têm grande interesse visando a identificação de atividade antimicrobiana contra fungos fitopatogênicos e que também poderão, futuramente, serem utilizadas como uma alternativa econômica e ecologicamente viável pelos produtores locais, bem como para obtenção de potenciais substâncias bioativas com interesse biotecnológico.

Trabalhos desenvolvidos com extrato bruto ou óleo essencial, obtidos de inúmeras espécies têm apresentado potencial para controle ou manejo de doenças causadas por fungos, tanto pela sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de

esporos, quanto pela indução de fitoalexinas, indicando a presença de compostos com características de elicitores (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000).

O conhecimento mais aprofundado da ação de fungos endofíticos como agentes de biocontrole e a exploração da atividade biológica de compostos secundários presentes no extrato bruto de plantas medicinais pode se constituir, ao lado da indução de resistência, em uma forma potencial de controle alternativo da mancha alvo do tomateiro.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral.

Estudar o potencial de fungos endofíticos e de extratos vegetais como métodos alternativos para o controle da mancha-alvo do tomateiro.

2.2 Objetivos específicos.

Avaliar o potencial de fungos endofíticos obtidos de guaranazeiro na inibição do crescimento micelial de *Corynespora cassiicola in vitro*;

Avaliar o potencial de quatro extratos brutos vegetais na inibição do crescimento micelial, produção e germinação de esporos de *Corynespora cassiicola in vitro*;

Avaliar o potencial de frações hexânicas, acetato-etílicas e metanólicas provenientes de quatro espécies vegetais na inibição do crescimento micelial, produção e germinação de esporos de *Corynespora cassiicola in vitro*;

Verificar o efeito do extrato bruto de *Piper marginatum* no controle da mancha-alvo do tomateiro em casa de vegetação.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Tomateiro.

O tomate cultivado (*Solanum lycopersicum* L., anteriormente *Lycopersicon esculentum* Mill) foi domesticado em tempos pré-colombianos no México e Peru e introduzido na Europa logo após a conquista espanhola do México em 1521. As primeiras descrições da 'maçã amor' apareceram nas ervas europeias em meados do século XVI. A partir daí o tomate se espalhou para todos os outros continentes e hoje é a segunda mais importante planta de cultivo de solanáceas depois da batata. O tomate cultivado foi, além do milho, o principal modelo vegetal da genética clássica no século XX, graças à sua autocompatibilidade e compatibilidade cruzada, fácil cultivo e grande diversidade morfológica (GEBHARDT, 2016).

O tomateiro é uma planta herbácea, de porte arbustivo, com sistema radicular pivotante quando o plantio é realizado por sementes, ou fasciculado quando por transplantio. Possui caule flexível, piloso, com abundante ramificação lateral. Suas flores são hermafroditas, pequenas e reunidas em cachos. Os frutos são bagas carnosas de tamanho e formato variáveis conforme a cultivar e, quando maduros, apresentam coloração vermelha. Possuem sementes pequenas, pilosas e imersas na mucilagem placentária. A planta, apesar de ser perene, é cultivada como cultura anual. Apresenta dois hábitos de crescimento que condicionam o tipo de cultivo: o hábito indeterminado, onde ocorre predominância da gema apical sobre as gemas laterais, comum na maioria das cultivares para a produção de frutos para mesa; e o hábito determinado, onde há crescimento vegetativo menos vigoroso e a planta assume a forma de uma moita, predominante à produção de frutos para a agroindústria (CLEMENTE e BOITEUX, 2012).

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais, alcançando uma das maiores produtividades dessa olerícola segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2018). Considerada uma espécie cosmopolita, o tomate tem como centro de origem primário o estreito território limitado ao norte pelo Equador, ao sul pelo norte do Chile, a oeste pelo Oceano Pacífico e a leste pela Cordilheira dos Andes (REIS FILGUEIRA, 2013). A produção nacional de tomate em fevereiro de 2018, foi de 4.457.104 toneladas. O Estado de Goiás foi responsável pela produção de 1.442.515 toneladas, São Paulo aparece em segundo lugar com 938.800 t seguido de Minas Gerais com 745.600 t. O Amazonas produziu 1 tonelada, produtividade esta considerada muito pequena quando comparada com os Estados citados (IBGE, 2018).

Os principais entraves para a produção de tomate na região Amazônica são as condições ambientais. O ambiente quente e úmido favorece a incidência de doenças, o ataque

de pragas e prejudica a polinização das flores do tomateiro. Além disso, os solos são ácidos e pobres em nutrientes (LUZ et al., 2002).

Visando aumentar a produtividade e melhorar a qualidade dos frutos, a produção de tomate tem passado por grandes transformações tecnológicas, destacando-se o avanço do cultivo em ambiente protegido e a utilização de sementes melhoradas de híbridos de elevada produtividade (SELEGUINI et al., 2003). Ainda assim, o tomateiro está sujeito ao ataque de vários patógenos que são causadores de doenças graves como o *Corynespora cassiicola*.

3.2 Mancha - Alvo (*Corynespora cassiicola*).

O fungo *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei, está posicionado dentro Reino Fungi, filo Ascomycota, classe Dothideomycetes, ordem Pleosporales e gênero *Corynespora* (KENDRICK, 2017). A fase teleomórfica da espécie ainda não foi descrita, embora já tenham descoberto esta fase para o gênero *Corynespora*, sendo então representada pela espécie *Pleomassaria swidaie* (TANAKA et al., 2005). Este fungo já foi relatado como patógeno em mais de 587 espécies de plantas (FARR e ROSSMAN, 2016) e há também relatos de *C. cassiicola* causando infecção subcutânea e infecção ocular em humanos com deficiência imunológica (HUANG et al., 2010; YAMADA et al., 2013).

O primeiro relato da doença no Amazonas foi em 1985 (ALVES et al., 1985). Além das folhas, a doença atinge frutos, caule e raízes. Os sintomas iniciam-se com pequenas manchas aquosas na superfície das folhas mais velhas, que aumentam de tamanho tornando-se circulares e marrons-claras. Com o desenvolvimento da doença, as manchas surgem também nas partes mais jovens da planta (REIS e BOITEUX, 2007).

Os conidióforos de *C. cassiicola* são pouco septados, cilíndricos e amarelados a marrons, medindo 110-850 µm de comprimento x 4-11 µm de largura. Os conídios apresentam 4 a 20 pseudoseptos transversais, medem de 4 a 220 µm de comprimento e de 4 a 8 µm de largura, podem variar de formato, obcláveos ou cilíndricos, retos ou curvados e são, na maioria das vezes, solitários, ou em cadeias contendo, em média, seis conídios, de coloração verde-oliva ou marrom. As colônias são cinzas ou marrons, com micélio de aparência aveludada (ELLIS et al., 1971). O hilo é, geralmente, espesso e escuro, em espécimes obtidos de tecidos das plantas (SCHLUB et al., 2009).

C. cassiicola apresenta maior esporulação sob fotoperíodo de 12 h (MELO e REIS, 2010). A luz contínua também estimula a esporulação (ONESIROSAN et al., 1975). O fungo

pode ser cultivado em meios, como Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e malte-ágar, porém a melhor esporulação ocorre em meio Czapek-ágar (MELO e REIS, 2010). Sousa e Silva (2014) estudando a variabilidade e a morfocultura de isolados de *C. cassiicola* nos meios de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA), Batata-Sacarose-Ágar (BSA), Aveia-Ágar (AvA) e Cenoura-Ágar (CA), verificaram que o maior índice de crescimento micelial ocorreu no meio CA e a maior esporulação nos meios BDA e BSA para os isolados de tomateiro e de pepino.

A chuva e o vento são os principais agentes de dispersão dos conídios, que são liberados em maior quantidade no período da manhã. Os conídios permanecem viáveis por até dois anos em outras culturas e plantas daninhas (CERKAUSKAS, 2005). Os restos culturais servem como abrigo e fonte de nutrição para o fungo na sua fase saprofítica (REIS et al., 2011). O fungo produz clamidósporos que facilitam a sua sobrevivência no solo (OLIVEIRA et al., 2012).

Estratégias de controle para a mancha-alvo em tomateiro podem incluir a rotação ou a sucessão de culturas, eliminação de restos culturais e de folhas doentes e a desbrota, que aumenta a circulação do ar, diminuindo o período de molhamento foliar (COELHO NETTO et al., 2012).

3.3 Métodos alternativos de controle de doenças de plantas.

O uso de fungicidas quimicamente sintetizados tem sido a primeira linha de estratégia para controle de fungos fitopatogênicos. No entanto, os efeitos secundários, como a poluição ambiental e o desenvolvimento da resistência devido ao uso desses produtos, levaram a uma crescente relutância em usar novas estratégias de controle (FIERRO-CRUZ et al., 2017). O controle biológico e a utilização de extratos de plantas antagonistas têm sido os mais estudados.

Melo et al. (2016) com o objetivo de avaliar o efeito de tratamentos biotecnológicos no controle da transmissibilidade de *Colletotrichum* sp. em sementes de *Sideroxylon obtusifolium* (Roem & Schult.) Penn, estudaram 100 sementes submetidas a tratamentos preventivos com fungicida Captan®, extrato de *Caesalpinia ferrea* Mart. Ex. Tul. e o controle biológico com *Trichoderma* spp. Verificaram que o controle biológico com *Trichoderma* spp. e o alternativo com extrato de *C. ferrea* proporcionam maior proteção às sementes e plântulas *S. obtusifolium* quanto à transmissibilidade do *Colletotrichum* sp. O tratamento à base de extrato vegetal foi o mais eficiente para este fim, apenas em sementes de maior tamanho, por não interferir na porcentagem e velocidade de germinação, sendo necessário a realização de outros

trabalhos com *Trichoderma* spp. e extrato de *C. ferrea* para testar doses diferentes desses produtos.

Hughes et al. (2013) com o objetivo de investigar o potencial antifúngico de 30 extratos brutos de diclorometano (DCM) de *Opuntia humifusa* e 80 DCM de fungos endofíticos isolados de *O. humifusa* contra os fitopatógenos *Colletotrichum acutatum*, *C. fragariae* e *C. gloeosporioides* a uma concentração de $160 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ por ensaio de bioautografia, verificaram que um total de 6 extratos (7,5 %) de fungos endofíticos mostraram propriedades antifúngicas com zonas de inibição variando de 5 a 16 mm, e nenhuma atividade antifúngica foi observada nos extratos brutos das plantas. Os resultados mostraram que os isolados de *O. humifusa* apresentaram potencial biotecnológico para o controle de fungos fitopatogênicos testados *in vitro* e que a caracterização do extrato e da substância bioativa precisa ser realizada para a detecção de protótipos de metabólitos antifúngicos para o desenvolvimento de novos pesticidas seletivos e menos tóxicos ao meio ambiente.

Brito e Nascimento (2015) avaliando a atividade fungitóxica dos extratos vegetais de alho (*Allium sativum* L.), citronela (*Cymbopogon nardus* (D.C.) Stapf), gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) e nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) no controle *in vitro* de *Curvularia eragrostidis*, nas concentrações de 5, 15, 25, 35, e 45 %, determinaram as porcentagens do crescimento micelial, da esporulação e da germinação do fungo. As concentrações de 5 % dos extratos de gengibre e de nim foram eficientes na percentagem de inibição do crescimento micelial e esporulação de *C. eragrostidis*; porém, a utilização de todos os extratos a partir da concentração de 25 % apresentou os maiores efeitos fitotóxicos nas análises *in vitro*, reduzindo o crescimento micelial, a esporulação, e a germinação do fungo.

Fonseca et al. (2015) avaliando o efeito de óleos essenciais das espécies medicinais *Baccharis dracunculifolia* (alecrim-do-campo), *Schinus terebinthifolius* (aroeirinha) e *Porophyllum ruderale* (arnica-brasileira) sobre o crescimento dos fungos fitopatogênicos *Fusarium oxysporum* f. sp. phaseoli (Fop), *Fusarium solani* f. sp. phaseoli (Fsp), *Sclerotinia sclerotiorum* (Ss), *S. minor* (Sm), *Rhizoctonia solani* (Rs), *Sclerotium rolfsii* (Sr) e *Macrophomina phaseolina* (Mp), em cinco concentrações (0, 250, 500, 1000 e $3000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) dos óleos essenciais, verificaram que o óleo essencial de alecrim-do-campo foi o mais eficiente na redução do crescimento micelial de todos os fungos, com inibição completa quando se utilizou a concentração de $3000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

3.4 Fungos endofíticos no controle de doenças de plantas.

Os fungos endofíticos habitam dentro da planta hospedeira sem causar sintomas de doença (SCHULZ e BOYLE, 2005), são potenciais portadores de metabólitos ativos (NISA et al., 2015) e podem atuar como agente de controle biológico. De acordo com Zambolim (2010), o controle biológico é o uso de um micro-organismo para controle de outro, podendo o agente apresentar efeito biocida, causando a morte do alvo, ou biostático, inibindo seu desenvolvimento.

A interação entre fungos endofíticos e suas hospedeiras confere vantagens a estas como: a tolerância ao estresse, a produção de fatores de crescimento de plantas, a repelência de herbívoros e a proteção contra patógenos, sendo uma fonte promissora de metabólitos antifúngicos (KANCHISWAMY et al., 2015).

Zotti et al. (2018) avaliando o potencial de controle *in vitro* de fungos endofíticos isolados de *Piper amalago* no crescimento de *Didymella bryoniae*, fungo que afeta a cultura da melancia (*Citrullus lanatus*), avaliaram 26 isolados por meio de cultura pareada. Destes, cinco demonstraram efeito antagônico contra o *D. bryoniae*, inibindo totalmente seu crescimento.

Semelhantemente, Fierro-Cruz et al. (2017) isolaram 355 fungos endofíticos de *Protium heptaphyllum* e *Trattinnickia rhoifolia* (Burseraceae), espécies arbóreas que produzem metabólitos secundários de interesse agrônomo e industrial, e testaram *in vitro* contra *Fusarium oxysporum*, por cultura pareada. Cinco endofíticos exerceram pelo menos 40 % de inibição no crescimento de *F. oxysporum*. Extratos de acetato de etila (EtOAc) foram obtidos dos fungos antagônicos mais ativos, após serem cultivados em três diferentes meios líquidos, por bioautografia direta. Dois extratos derivados de fungos identificados como *Chaetomium globosum* F211 UMNG e *Meyerozima* sp. F281 UMNG mostraram inibição no crescimento do patógeno. O isolado *C. globosum*, F211 UMNG foi selecionado para análise química por RP-HPLC-DAD-ESI-MS e moléculas antifúngicas tais como cladosporina, chaetoatrosina A e chaetoviridina A foram identificadas.

3.5 Plantas como antifúngicos naturais.

Os extratos vegetais são uma alternativa promissora para uso no controle de fitopatógenos devido à grande variedade de compostos metabólicos produzidos, incluindo alcalóides, flavonóides, isoflavonóides, taninos, cumarinas, glicosídeos, terpenos, fenilpropanonas e ácidos orgânicos. O fato de serem constituídos por uma grande variedade de

compostos confere-lhes outras vantagens, como ter diferentes modos de ação, o que dificulta o desenvolvimento da resistência pelo patógeno, além de amplo espectro de ação (DA CRUZ CABRAL et al., 2013).

Trabalhos desenvolvidos com extrato bruto ou óleo essencial, obtidos a partir de plantas medicinais, indicam o potencial das mesmas no controle de alguns fitopatógenos, tanto por sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela indução de fitoalexinas, indicando a presença de compostos com características de elicitores (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000). Segundo os autores o fracionamento dos metabólitos secundários dessas plantas, bem como a determinação da atividade biológica dessas moléculas, com respeito à atividade elicitora ou antimicrobiana, poderão contribuir para aquisição de maiores conhecimentos que reforcem sua possível utilização como um método de controle de doença de planta.

Estudos realizados por Celoto et al. (2011) resultaram em 71 % de inibição do crescimento micelial e em 100 % na germinação dos conídios de *Colletotrichum musae* utilizando extrato aquoso proveniente de folhas e ramos de melão de São Caetano (*Mormodica charantia* L.). Venturoso et al. (2011) constataram inibição de 100 % do crescimento micelial de diversos fungos entre eles *Colletotrichum sp.* utilizando extrato de cravo da Índia (*Syzygium aromaticum* L. Merr. e L.M. Perry). Rozwalka et al. (2008) mencionam que o extrato aquoso e o óleo essencial de cravo da Índia inibiram em 100 % o crescimento micelial de *C. gloeosporioides* isolado de goiabeira (*Psidium guajava* L.) no período de pós-colheita.

Andrade e Vieira (2016), determinaram o efeito fungistático dos óleos essenciais de anis (*Pimpinella anisum*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), árvore-chá (*Melaleuca alternifolia*) e menta (*Mentha piperita*) sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. A germinação de conídios foi afetada drasticamente pelos óleos de menta e árvore-chá. O efeito fungitóxico do óleo de menta foi confirmado nos experimentos subsequentes, nos quais essa substância na concentração de 100 µL inibiu completamente o crescimento micelial *in vivo* e *in vitro* do fungo *C. gloeosporioides*.

Estudos que abordam o uso de extratos vegetais no controle de doenças de importância econômica na agricultura, em condições de campo, são pouco encontrados na literatura. Dentre eles, o trabalho realizado por Araújo et al. (2012) resultaram na redução de 70 % de severidade

da mancha púrpura em cebolinha, causada por *Alternaria porri*, quando aplicado semanalmente o extrato de *Ulva fasciata* em sistema de cultivo orgânico, em três dos quatro ciclos experimentais.

Rodrigues et al. (2007) avaliaram o efeito do extrato de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary e os resultados indicaram a atividade antimicrobiana do extrato, com inibição do crescimento micelial e da produção de escleródios. Na cultura da alface, foi verificado que a aplicação de massa de gengibre na base da planta aumentou a atividade da enzima peroxidase e reduziu a incidência da doença, e concluíram que pode ter ocorrido tanto por atividade antimicrobiana direta quanto pela ativação de mecanismos de defesa da planta.

Espécies de plantas medicinais como *Picrolemma sprucei*, *Curcuma zedoaria*, *Croton cajucara* e *Piper marginatum*, podem ser estudadas como potencial portadoras de moléculas de interesse para o controle de fitopatógenos.

Picrolemma sprucei Hook.f. (syn. *Picrolemma pseudocoffea* Ducke) pertence à família Simaroubaceae e está amplamente distribuída em toda a região amazônica. É conhecida pelos nomes "caferana" e "falsa quina" no Brasil, "sacha-café" no Peru, e "cafeteria" na Guiana Francesa e é usada em um grande número de remédios tradicionais, tais como decocções para febre e malária e para tratar doenças como gastrite (LE COINTE 1947, citado por VIEIRA et al., 2014). Possui nos seus tecidos substâncias terpênicas altamente oxigenadas, conhecidas como quassinóides (THOMAS, 1990). Algumas dessas substâncias apresentaram atividade *in vitro* contra leucemia e malária (SILVA et al., 2009; SARAIVA et al., 2003; POLONSKY et al., 1984). Quimicamente, os quassinóides são derivados da degradação de compostos triterpênicos, que são altamente oxigenados. Apresentam uma ampla gama de atividades biológicas *in vitro* e/ou *in vivo*, incluindo antitumoral, antimalárica, antiviral, anti-inflamatória, anti-inseticida, amebicida, antiúlcera e atividades herbicidas. Bruceantina, simalikalactona D, quassine, brusatol e glaucarubionona são alguns dos quassinóides mais bem estudados e apresentam uma grande variedade de atividades biológicas (GUO et al., 2005).

Croton cajucara Benth. (Euphorbiaceae) popularmente conhecida como "sacaca", é uma planta encontrada na região amazônica com um histórico de uso em medicina popular. Tanto a casca quanto as folhas de *C. cajucara* são usadas popularmente em chás e pílulas para o tratamento de várias doenças, incluindo diabetes, diarreia, dores de estômago, febre, hepatite e malária (PERAZZO et al., 2007). *C. cajucara* demonstrou possuir propriedades anti-

genotoxicidade, anti-aterogénicas, antitumorais, anti-ulcerogénicas, hipoglicêmicas, hipolipidémicas, anti-estrogénicas, anti-inflamatórias e anti-nociceptivas (MACIEL et al., 2000). As folhas de *C. cajucara* contêm esteróides e flavonóides como compostos principais e a sua casca é uma rica fonte de terpenos, como trans-dehidrocrotonina (DCTN) e crotonina (CTN) (MACIEL 1998, citado por RODRIGUES et al., 2012). Campos et al. (2010) verificaram que o extrato bruto metanólico da casca de *C. cajucara* foi mais eficaz contra *Trypanosoma cruzi* do que seus terpenos isolados, a trans-desidrocrotonina (DCTN), a crotonina (CTN) e o triterpeno acetylauri-tolicacid (AAA). Estes primeiros resultados levaram Lima et al. (2015) a investigarem a atividade anti-leishmania dos terpenos (DCTN, CTN e AAA) de *C. cajucara* obtidos a partir da casca destas espécies de *Croton*, contra *Leishmania amazonenses in vitro*, demonstrando efeitos promissores na concentração ensaiada.

Curcuma zedoaria (Christin.) Rosc (Zingiberaceae), também conhecida como açafraão branco ou zedoaria, tem sido cultivada como uma especiaria vegetal no Sul e Sudeste Asiático (LOBO et al., 2009). Nos rizomas japoneses e chineses, são usados como estimulante, carminativo, diurético, anti-diarréico e anti-emético, e também usado para curar feridas, úlceras e doenças da pele (MATSUDA et al., 2001). Tem sido relatada como tendo atividade anti-inflamatória e antibacteriana (THOLKAPPIYAVATHI et al., 2013), e efeito contra a filariose linfática (LF).

Hamdi et al. (2014) testaram a atividade citotóxica dos extratos obtidos de rizomas de *C. zedoaria* com os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, em duas linhas celulares de câncer humano e uma linha celular não cancerígena, fornecendo base para a aplicação etnomédica desta espécie no tratamento do câncer de mama. A investigação sobre os componentes químicos nas fracções de hexano e diclorometano resultou em 19 compostos. Jung et al. (2018) demonstraram que o extrato de MeOH de rizomas de *C. zedoaria* exerceu um efeito citotóxico sobre células AGS de câncer gástrico humano. Uma investigação química do extrato levou ao isolamento de cinco sesquiterpenos incluindo isoprocurcumenol, germacrone, curzerenone, curcumenol e curcuzedoalida. Entre estes, a curcuzedoalida demonstrou o efeito mais forte na supressão da proliferação celular do câncer gástrico, sendo um candidato positivo para o desenvolvimento de novas quimioterapêuticas.

Piper marginatum Jacq. (Piperaceae) é um arbusto comum da região amazônica, popularmente conhecido como 'malvaísc'o'. O extrato de suas folhas tem sido usado em medicina popular para tratar doenças do fígado e vesículas e também como um tônico com ação

carminativa e antiespasmódica (REIGADA et al., 2007). Estudos fitoquímicos com espécies de *Piper* demonstram uma grande diversidade de metabólitos secundários, inclusive com ação antifúngica (REIGADA et al., 2007; JOHNNY et al., 2011).

Segundo Brú e Guzman (2016), a espécie *P. marginatum* mostra uma fitoquímica distinta com a presença de metabólitos secundários específicos, não encontrados em outras espécies de *Piper*, por exemplo, anetole, estragole, isoeugenol-éter metílico, os ácidos fenilalcanoides 3-farnesil-4-hidroxibenzoico e 3-farnesil-4-metoxibenzóico e os glicosídeos marginatoside e vitexina. Nenhuma outra espécie de *Piper* mostrou a presença desses marcadores quimioteônicos. De acordo com os componentes do óleo essencial (EO), sete quimiotipos foram reconhecidos em um estudo abrangente com 22 amostras de *P. marginatum* coletadas em toda a Amazônia brasileira (ANDRADE et al., 2008). Esses resultados apontam para uma ampla variação na composição química para um conjunto de espécies relacionadas com o fenótipo, mas, além disso, é necessário considerar a variabilidade associada aos fenômenos cronobiológicos (variação mensal, semanal e diária) como a hipótese de Moraes et al. (2014).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos fungos endofíticos e de *Corynespora cassiicola*.

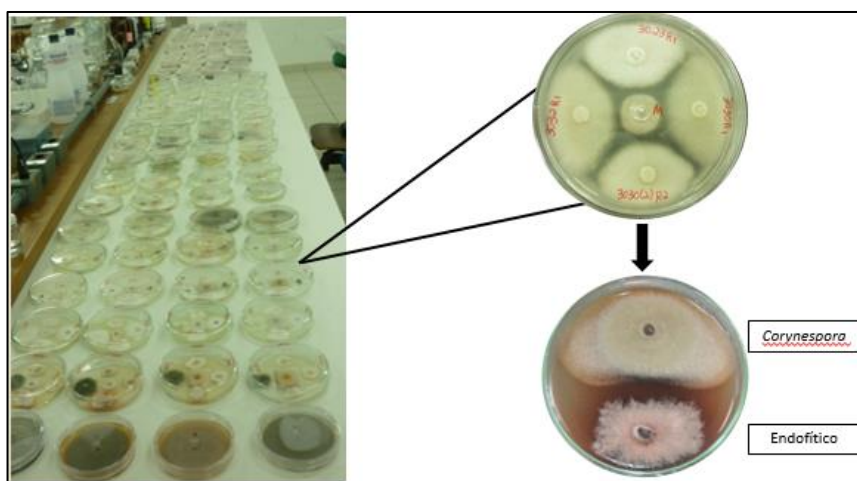
Os isolados de fungos endofíticos e do fitopatógeno *C. cassiicola* utilizados foram cedidos pelo Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, local onde se realizou todos os ensaios *in vitro*. Os fungos endofíticos foram obtidos a partir de sementes e folhas de guaranazeiro, coletados nos municípios de Manaus e Maués - AM, em novembro de 2014, isolados conforme Araújo et al. (2010). Os isolados de *C. cassiicola* foram obtidos a partir de plantas de tomateiro com sintomas típicos de mancha-alvo, coletadas em áreas produtoras nos municípios de Manaus e Iranduba-AM, isolados indiretamente conforme Alfenas et al. (2007). Os isolados estavam preservados em microtubos contendo água destilada esterelizada, mantidos em temperatura de laboratório (± 26 °C).

4.2 Avaliação do potencial de fungos endofíticos na inibição do crescimento *in vitro* de *Corynespora cassiicola*.

A seleção massal *in vitro* foi realizada utilizando 141 isolados endofíticos, que foram recuperados em placas de Petri contendo meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) e cultivados a 28 °C durante sete dias em incubadora do tipo Biochemistry Oxygen Demand (B.O.D). Estes isolados foram identificados inicialmente, e o código e a identificação molecular foi realizada somente para os isolados mais promissores, pela Universidade do Minho (Portugal).

Foi utilizado o método de culturas pareadas para selecionar os isolados com melhor potencial para uso nos testes em casa de vegetação. Para isso foram utilizadas placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo o meio de cultura BDA acrescido do antibiótico cloranfenicol (250 mg.L⁻¹), em triplicata. Em cada placa foram avaliados quatro isolados diferentes dos fungos endofíticos, pela deposição equidistante de discos de meio de cultura de 0,5 cm de diâmetro, contendo a colônia do fungo (FIGURA 1). No centro da placa foi depositado um disco de cultura do fungo *C. cassiicola*. A testemunha constou de placas contendo quatro discos equidistantes de meio de cultura BDA sem nenhum cultivo e no centro da placa foi depositado um disco de colônia de *C. cassiicola*. A avaliação foi realizada pela presença ou ausência de inibição entre o endofítico e o patógeno.

Figura 1 - Seleção massal *in vitro* utilizando 141 isolados endofíticos



Fonte: A autora (2017).

Os isolados que apresentaram inibição no ensaio anterior foram colocados em confronto direto com o patógeno *C. cassiicola*. Para isso, discos de 5 mm de meio de cultura dos endofíticos e do patógeno foram colocados em posição oposta em placas de Petri, contendo

meio de cultura BDA, para a avaliação de antagonismo (inibição do crescimento do patógeno). A testemunha constou de placas contendo um disco com o micélio do patógeno de um lado e um disco sem nenhum cultivo do outro.

A avaliação foi realizada quando a testemunha atingiu o disco de meio BDA depositado na posição oposta da placa. Foi mensurada a inibição formada entre o isolado endofítico e a colônia do fitopatógeno, usando um paquímetro.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 14 tratamentos (13 endofíticos + 1 testemunha) e três repetições. Os valores obtidos para a inibição foram submetidos à análise estatística e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade, usando o programa para análise estatística ASSISTAT versão 7.7 (SILVA e AZEVEDO, 2016).

4.3 Avaliação do potencial de extratos vegetais na inibição do crescimento, produção e germinação de esporos de *Corynespora cassiicola in vitro*.

Para a obtenção dos extratos, folhas frescas de *Picrolemma sprucei* Hook (caferana), *Croton cajucara* Benth (sacaca), *Piper marginatum* Jacq. (capeba), e rizomas de *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe (*curcuma*), foram coletados pela manhã, no Setor Sul da Universidade Federal do Amazonas (FIGURA 2), com o objetivo de eliminar o efeito temporal sobre o teor das substâncias bioativas sintetizadas pelas plantas (SILVA et al., 1999).

Figura 2 - Mapa do Setor Sul da Universidade Federal do Amazonas representando o local de coleta dos materiais vegetais



Fonte: www.googlemaps.com.br (2018).

As folhas e os rizomas foram submetidos à triagem visível com a finalidade de selecionar amostras íntegras (ausência de fungos, degradação por insetos, entre outros). Amostras contendo estruturas reprodutivas de cada espécie foram utilizadas na confecção de exsicatas (FIGURA 3), para a identificação botânica e foram depositadas no Herbário da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, sob o número: 10831 (*P. sprucei*) e 10832 (*P. marginatum*). Não foi possível fazer o depósito das espécies *C. zedoaria* e *C. cajucara* devido a falta de estruturas reprodutivas nas plantas.

Figura 3 - Exsicatas depositadas no Herbário da Universidade Federal do Amazonas - UFAM. A) *Picrolemma sprucei*, B) *Piper marginatum*



Fonte: A autora (2018).

O material vegetal foi lavado com água corrente e disposto sobre jornal em uma bancada para secagem, por um período de 4 horas. Em seguida, as folhas e os rizomas foram colocados em sacos de papel e permaneceram em estufa de ventilação forçada a 60 °C durante 72 h (FIGURA 4) no Laboratório de Ciências das Plantas Daninhas - UFAM. As amostras foram trituradas em liquidificador doméstico até a obtenção de um pó fino.

Figura 4 - Espécies vegetais (A); Lavagem das folhas e rizomas (B); secagem das folhas em bancada (C); Ensacamento em jornal (D) e Secagem em estufa (E)



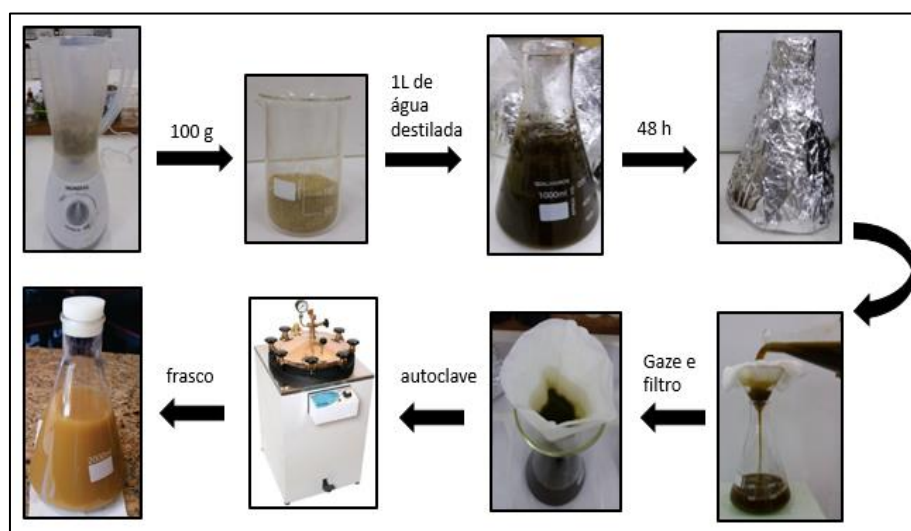
Fonte: A autora (2017).

4.3.2 Obtenção dos extratos brutos e frações.

4.3.2.1 Extrato bruto aquoso (EBA).

Para a obtenção do extrato bruto aquoso (EBA), foi adicionado 1L de água destilada sobre 100 g de biomassa seca, permanecendo por 48 h em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, agitada 1 vez ao dia. Após esse período, foi realizada a filtragem em gaze e papel filtro esterilizado, seguido de esterilização por meio de autoclavagem a 120 °C, durante 15 minutos. A solução final foi armazenada em frasco esterilizado, identificado, fechado e conservado em freezer (± 4 °C) (BONALDO et al., 2004; BANDEIRA e LIMA, 2013) – (FIGURA 5).

Figura 5 - Processo de obtenção do extrato bruto aquoso das folhas de *Picrolemma sprucei*, *Croton cajucara*, *Piper marginatum*, e rizomas de *Curcuma zedoaria*



Fonte: A autora (2017).

4.3.2.2 Frações hexânicas, acetato-etílicas e metanólicas.

Os extratos foram fracionados no Laboratório de Ciências das Plantas Daninhas – UFAM, utilizando os solventes hexano (Hex), acetato de etila (AcEt) e metanol (MetOH), os quais originaram, respectivamente, as frações FHex, FAcEt e FMetOH. A fração restante, após as extrações com os solventes, foi denominada de resíduo.

Para isso, 100 gramas do material vegetal seco e triturado foi submetido à maceração com cerca de 400 mL de Hexano, durante 48 h em capela de exaustão de gases QUIMIS. Após esse período o material foi filtrado em filtro Milipore® acoplado à bomba de vácuo e armazenado em recipiente estéril em geladeira. Junto ao resíduo remanescente foi adicionado 200 mL de Hexano, o qual permaneceu por mais 24 h, quando novamente foi filtrado. Este mesmo procedimento foi repetido para os próximos solventes de polaridade crescente: Acetato de Etila (AcEt) e Metanol (MetOH) – (FIGURA 6). O volume de reagente adicionado ao material vegetal variou conforme a espécie (TABELA 1).

Tabela 1 - Volume de reagente adicionado ao material vegetal às 0 h e às 48 h antes da filtragem

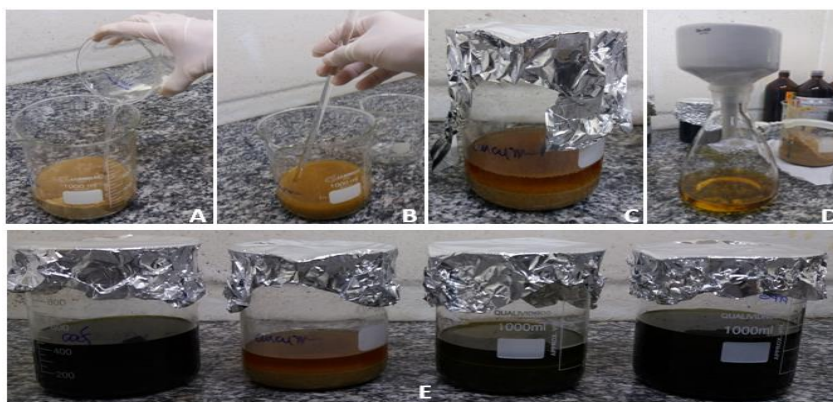
Espécies	Hexano (mL)		Acetato de Etila (mL)		Metanol (mL)	
	0 h	48 h	0 h	48 h	0 h	48 h
<i>Picrolemma sprucei</i>	400	200	300	100	350	200
<i>Curcuma zedoaria</i>	200	250	250	100	300	200
<i>Croton cajucara</i>	300	320	250	100	350	200
<i>Piper marginatum</i>	500	300	225	500	400	300

Fonte: A autora (2018).

O esquema de obtenção do extrato fracionado está representado na Figura 7.

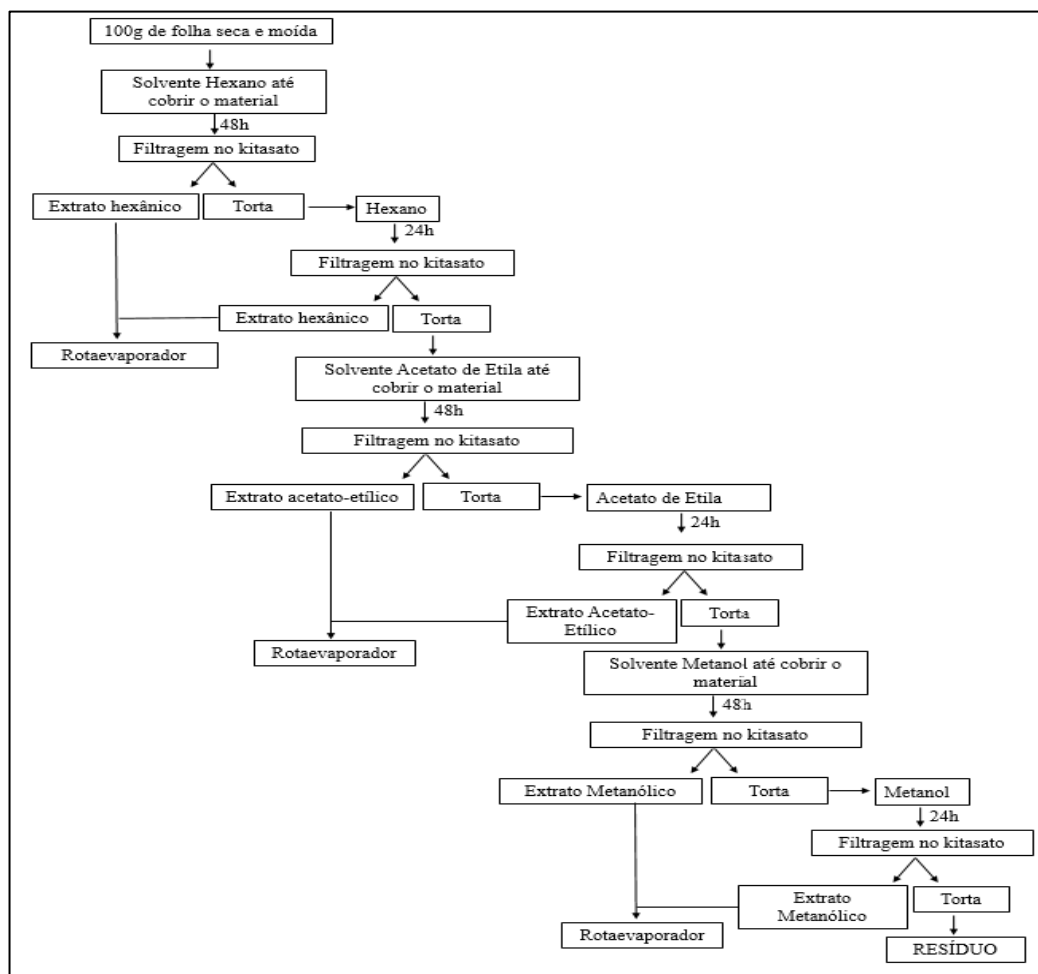
As frações obtidas foram utilizadas nos ensaios de crescimento micelial, produção e germinação de esporos de *C. cassiicola*, de bioautografia e de concentração mínima inibitória.

Figura 6 - Processo de obtenção dos extratos fracionados: Material vegetal seco e imersão da biomassa em solvente (A e B); material vedado (C) e filtragem em bomba de vácuo (D). Esquema de partição líquido-líquido para obtenção das frações hexânicas das folhas de *Picrolemma sprucei*, *Croton cajucara*, *Piper marginatum*, e rizomas de *Curcuma zedoaria* (E)



Fonte: A autora (2017).

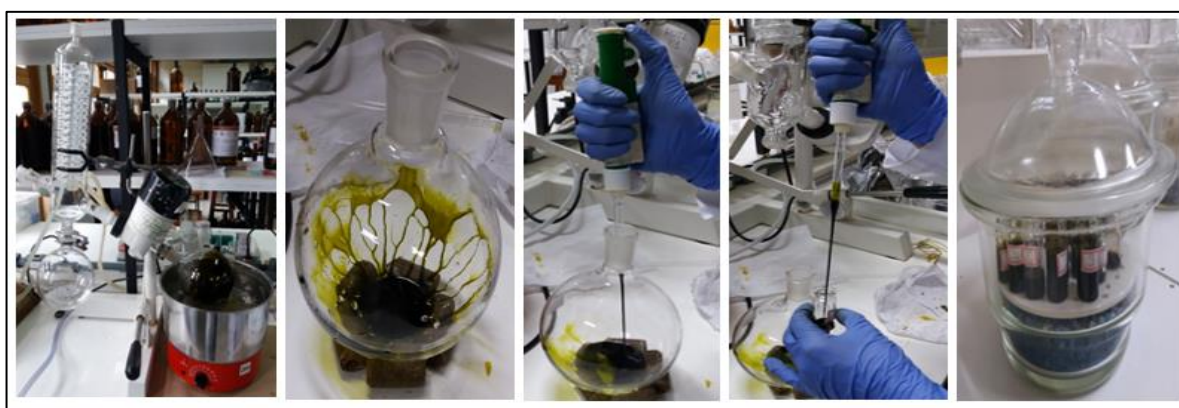
Figura 7 - Esquema geral de partição e separação provável dos principais metabólitos secundários presentes nas plantas estudadas



Fonte: A autora (2018).

Após a extração em todos os solventes, a solução extrativa foi concentrada em evaporador rotativo da FISATOM, sob pressão de 50 rpm à temperatura média de 45 °C, no Laboratório de Abertura de Amostra e Ensaio Químicos (LAEQ) da Central Analítica de Química, obtendo-se as frações denominadas hexânicas, acetato-etílicas e metanólicas das quatro espécies vegetais em estudo, que posteriormente foram secas em dessecador (FIGURA 8).

Figura 8 - Rotaevaporador e secagem das amostras em dessecador



Fonte: A autora (2018).

4.3.3 Avaliação do efeito dos extratos brutos e fracionados no crescimento micelial de *Corynespora cassiicola*.

Para a avaliação da atividade dos extratos aquosos sobre crescimento micelial de *C. cassiicola*, os mesmos foram autoclavados a 120 °C, 1 atm, durante 15 minutos, para não ocorrer contaminação do meio de cultura com outros micro-organismos.

O extrato bruto aquoso foi incorporado ao meio de cultura BDA nas dosagens de 0 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, e vertido em placas de Petri de 9 cm de diâmetro. Após o resfriamento do meio, foi depositado no centro de cada placa um disco de 5 mm de diâmetro contendo o micélio do fungo *C. cassiicola* com 7 dias de cultivo. As placas foram vedadas com filme plástico e mantidas a 28 °C ± 2 °C, no escuro em incubadora do tipo B.O.D. A testemunha constou da adição de água destilada e esterilizada ao meio.

Os extratos fracionados foram dissolvidos previamente em dimetil sulfoxido (DMSO) e adicionados ao meio BDA na concentração de 5 mg.mL⁻¹ para todas as espécies, e vertidos

em placa de Petri de 5 cm de diâmetro. Discos de BDA de 5 mm contendo micélio de *C. cassicola* foram transferidos para as placas e incubados em B.O.D a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A avaliação do crescimento micelial foi realizada por meio de medições em dias alternados do diâmetro das colônias, obtida pela média de duas medidas diametralmente opostas, até que a colônia de um dos tratamentos atingisse a borda da placa.

O índice de crescimento micelial (ICM) foi calculado e determinado pela fórmula: $\text{ICM} = [(C1/N1) + (C2/N2) + \dots + (Cn/Nn)]$, sendo: ICM= índice de crescimento micelial; C1, C2, Cn= crescimento micelial do fungo na primeira, segunda e última avaliação; N1, N2, Nn= número de dias após a inoculação.

Com os dados do último dia de avaliação, foi calculada a porcentagem de inibição do crescimento (PIC) obtida por meio da fórmula: $\text{PIC} = [(\text{diâmetro da testemunha} - \text{diâmetro do tratamento}) / \text{diâmetro da testemunha}] \times 100$, para cada extrato em relação à testemunha (FERNANDES et al, 2015).

O delineamento utilizado no experimento com os extratos brutos foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 6 (4 espécies e 6 concentrações), com quatro repetições.

Para o extrato fracionado o delineamento foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 4 (4 espécies e 4 solventes), com três repetições.

Os resultados foram analisados estatisticamente (análise de variância) com auxílio do programa ASSISTAT versão 7.7 (SILVA e AZEVEDO, 2016) pelo teste F, no nível de 5 % de probabilidade, e, posteriormente, as médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott a 5 % de significância. O estudo do fator quantitativo (concentrações) foi realizado por meio de análise de regressão para o ensaio com os extratos brutos. Os ensaios foram repetidos duas vezes.

4.3.4 Avaliação do efeito dos extratos brutos e fracionados na produção e germinação de esporos de *Corynespora cassicola*.

A produção de conídios foi avaliada após o total crescimento do patógeno nas placas de Petri do ensaio de crescimento micelial. Os conídios foram coletados adicionando-se 20 mL de água destilada esterilizada às placas e com pincel de cerdas macias foram removidos. A suspensão de todas as placas de cada tratamento foi coletada em um béquer e o número de esporos foi quantificado pelo método de contagem em gota. Uma alíquota com cerca de 10 μL , correspondente à gota, foi depositada em lâmina de vidro para a quantificação dos esporos.

Foram quantificadas três gotas por tratamento, sendo calculada a média para obtenção do número de conídios.mL⁻¹ (FIGURA 9A).

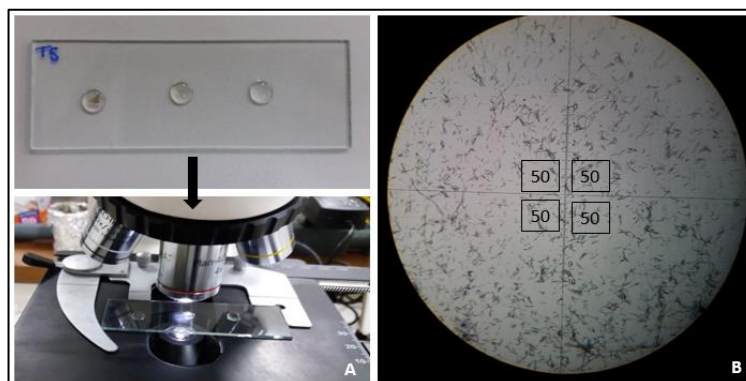
A porcentagem de inibição da esporulação (PIE) foi obtida por meio da fórmula: PIE = [(esporulação da testemunha – esporulação do tratamento)/esporulação da testemunha] x 100, para cada extrato em relação à testemunha (FERNANDES et al, 2015).

A quantificação da germinação conidial, foi realizada em microscópio de luz Marca Zeiss, sob objetiva de 40 x. Para isso, uma alíquota de 80 µL foi colocada nos três poços da lâmina escavada para microscopia, sendo cada poço correspondente a uma repetição, e mantidas em B.O.D. a 28 °C durante 12 h. Após esse período cada poço foi dividido em quatro campos, e foram quantificados em cada campo 50 conídios, entre germinados e não-germinados, totalizando 200 conídios em cada uma das três repetições (FIGURA 9B). Os conídios foram considerados germinados quando o tubo germinativo foi maior ou igual ao menor diâmetro do conídio (AMORIM et al., 2011).

A porcentagem de inibição da germinação foi obtida por meio da fórmula: PIG = [(germinação da testemunha – germinação do tratamento)/ germinação da testemunha] x 100, para cada extrato em relação à testemunha (FERNANDES et al, 2015).

O delineamento utilizado no experimento com os extratos brutos para a produção e germinação de esporos foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 6 (4 espécies e 6 concentrações), com três repetições. Para o extrato fracionado o delineamento foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 4 (4 espécies e 4 solventes), com três repetições. Os dados obtidos foram avaliados estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade, usando o programa ASSISTAT versão 7.7 (SILVA E AZEVEDO, 2016).

Figura 9 – Quantificação (A) e germinação (B) de esporos de *Corynespora cassiicola*



Fonte: A autora (2018).

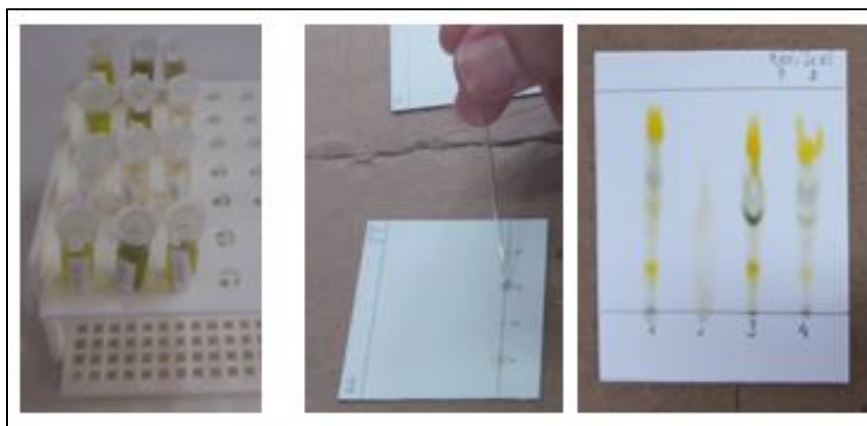
4.3.5 Bioautografia direta.

4.3.5.1 Preparo da CCD.

Antes do início da análise cromatográfica, todas as placas em sílica gel 60 G (MACHEREY-NAGEL®) foram colocadas em estufa por 15 minutos à 30 °C para ativação e eliminação da umidade, no Laboratório de Bioensaios e de Microrganismos da Amazônia (LABMICRA) da Central Analítica de Química. Foram medidas com régua milimetrada (5 cm de altura e 5 cm de largura) e cortadas cuidadosamente com um estilete.

Um miligrama de cada fração das quatro espécies vegetais foi pesado em balança analítica de precisão e diluído em 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO) autoclavado, representando a solução estoque. As gotas foram aplicadas 1,0 cm acima do bordo inferior em uma faixa horizontal uniforme, para evitar que o solvente corresse desigual e com isso obter uma melhor separação (COLLINS et al., 1990). O bordo superior foi delimitado a uma distância de 0,5 cm na placa. A distância entre cada gota foi de 1,0 cm, evitando-se sempre que houvesse contato entre as gotas das soluções. Para a aplicação da amostra foram utilizados tubos capilares de vidro. As frações hexânicas, acetato-etílicas e metanólicas das quatro espécies vegetais foram depositadas em placas de CCD pequenas (FIGURA 10).

Figura 10 - Cromatografia de camada delgada, aplicação e desenvolvimento



Fonte: A autora (2018).

4.3.5.2 Definição do sistema de eluição.

Com o auxílio de uma proveta foram testados quatro sistemas de eluição das frações hexânica (FHex), acetato-etílica (FACet) e metanólica (FMeOH) (TABELA 2). Cada sistema foi colocado em uma cuba de vidro e uma das suas paredes laterais internas foi recoberta com

um papel filtro, para que a cuba ficasse saturada com os vapores de mesma constituição da fase móvel (BARBOSA et al., 2004).

Quando introduzida a placa na cuba, o solvente ascendeu por fenômeno de capilaridade, até a extremidade superior. Ao ascender, a fase móvel arrastou mais os compostos menos adsorvidos na fase estacionária, separando-os dos compostos mais adsorvidos. A placa foi retirada da cuba com o auxílio de uma pinça, quando a frente do solvente estava a aproximadamente 0,5 cm da extremidade superior da placa. Em seguida, a placa foi seca pela simples exposição ao ar (BARBOSA et al., 2004).

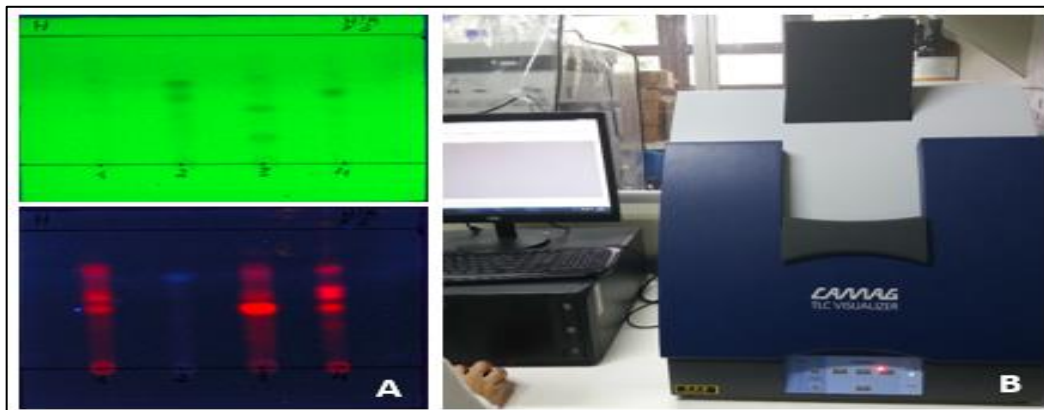
Tabela 2 - Sistemas de solventes empregados em CCD em placas de sílica gel 60 G para eluição das frações hexânicas, acetato-etílicas e metanólicas

Sistemas	Fração	Fase Estacionária	Fase Móvel	Proporção
1	Hexânica	Sílica gel	Hexano:Acetato de Etila	7:3
	Acetato-Etílica			
	Metanólica			
2	Hexânica	Sílica gel	Acetato de etila: Metanol	3:7
	Acetato-Etílica			
	Metanólica			
3	Hexânica	Sílica gel	Hexano:Acetato de Etila:Metanol	7:2:1
	Acetato-Etílica			
	Metanólica			
4	Metanólica	Sílica gel	Acetato:Metanol	5:5

Fonte: A autora (2018).

Todas as placas preparadas foram reveladas com vanilina sulfúrica e aquecidas em estufa por 3 minutos. Em seguida, foram levadas ao Laboratório de Pesquisa/Pós-graduação em Produtos Naturais, do Departamento de Química da UFAM, para serem observadas no CAMAG TLC VISUALIZER sob luz ultravioleta em comprimentos de onda de 254 e 366 nm (FIGURA 11).

Figura 11 - Observação das amostras sob luz ultravioleta em comprimentos de onda de 254 nm e 366 nm (A) no equipamento CAMAG TLC VISUALIZER (B)



Fonte: A autora (2018).

Após análise nestes dois comprimentos de onda, foi definido o melhor sistema de eluição (o que separou mais as bandas) para ser utilizado no ensaio da bioautografia direta, e calculado o fator de retenção, que é definido como a razão entre a distância percorrida pela mancha do componente e a distância percorrida pelo eluente (COLLINS, 2010). Portanto:

$$R_f = d_c / d_s$$

Em que:

d_c = distância percorrida pelo componente da mistura

d_s = distância percorrida pelo eluente.

4.3.5.3 Preparo do inóculo fúngico e diluição seriada.

Foi realizada a raspagem dos esporos levemente com uma alça de platina da placa contendo a cultura do *C. cassiicola*. Os esporos foram colocados em um tubo de ensaio contendo 2 mL de Tween 80 a 0,02 % e agitados em vórtex. Foram preparados mais seis tubos de ensaio com 9 mL de solução salina a 0,8 % (ABABOUCH et al., 1994), e realizada a diluição em série até 10^{-6} .

Foi retirado 1 mL do tubo de ensaio que continha a suspensão de esporos e transferido para o primeiro tubo contendo a solução salina, este denominado de solução mãe. Utilizando uma série de cinco tubos, cada um contendo 9 mL de solução salina, colocou-se no tubo da

primeira diluição 1 mL da solução mãe. Homogeneizou-se e transferiu-se 1 mL da solução para o segundo tubo. Este procedimento foi repetido até o último tubo.

Um mililitro da solução mãe foi utilizado no ensaio bioautográfico, e 100 µL das três últimas diluições foram plaqueados em triplicata em placas de Petri contendo meio de cultura BDA, para fazer a contagem das colônias crescidas e quantificação da diluição original, ou seja, quantos conídios haviam na suspensão original. Para a contagem, o número de conídios presentes na suspensão original foi igual ao número de colônias multiplicado pelo fator de diluição.

4.3.6 Ensaio bioautográfico.

Buscando identificar os constituintes bioativos contra o fitopatógeno *C. cassiicola*, foi realizada investigação por meio de bioautografia direta. Para isso, foram preparadas duas placas de CCD grandes medindo 10,0 x 15,5 cm (uma revelada em luz UV, que representou a testemunha, e a outra para ser utilizada no ensaio), para o melhor sistema de eluição selecionado anteriormente. As placas permaneceram em repouso por 24 h, período este necessário para que o eluente evaporasse bem e pudesse ser montado o ensaio da bioautografia.

Para isso, as soluções estoques anteriormente utilizadas nas CCD's pequenas foram aqui reaproveitadas (com 1 mg das frações para 1 mL de DMSO). As placas foram submetidas aos sistemas eluentes hexano:acetato de etila (7:3), para as frações hexânicas e hexano:acetato de etila:metanol (7:2:1), para as frações acetato-etílicas e metanólicas, secas e devidamente acondicionadas em placas de Petri de 190 x 20 mm, onde se verteu o meio BDA contendo 1 mL da solução mãe do inóculo de *C. cassiicola* previamente ajustada em diluição seriada. Em seguida, as placas foram incubadas em câmara BOD, a 28 °C, na ausência de luz.

Após 72 h de incubação foi avaliada a ocorrência de zonas de inibição correspondentes à atividade antifúngica da (s) substância (s) presente (s) em determinado fator de retenção (Rf).

4.3.7 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

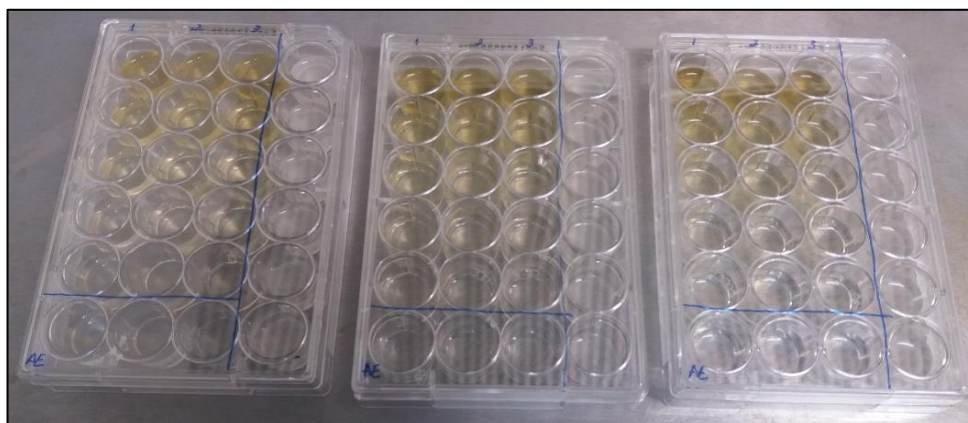
Para o ensaio da CIM foram utilizadas apenas as frações hexânica e acetato-etílica de *P. marginatum* que apresentaram melhores resultados *in vitro*, em placas de cultura de células de 24 poços. Foram testadas as doses de 5 mg.mL⁻¹, 2,5 mg.mL⁻¹, 1,25 mg.mL⁻¹, 0,625 mg.mL⁻¹ e 0,3125 mg.mL⁻¹. Foi utilizado como controle positivo o fungicida Impact 125 SC na concentração de 0,041 mL/poço e como controle de crescimento apenas a suspensão de *C. cassiicola* em meio batata-dextrose (BD).

Para isso, foram preparadas as suspensões do inóculo e da solução mãe das frações. A suspensão do inóculo foi preparada conforme descrito no item 4.3.5.3, e a solução mãe das frações foi preparada com 40 mg de extrato, diluído em 400 μ L de DMSO e 3.600 μ L de água destilada estéril.

A partir delas foi realizada a diluição. Em todos os poços foram adicionados 1 mL de meio de cultura BD, sendo que na primeira fileira foi 2 mL de meio duplicado. Para o extrato foi adicionado 1 mL da fração hexânica nos poços da primeira fileira, excluindo-se o último poço. Os poços da quarta coluna receberam 1 mL do meio BD e 0,041 mL do fungicida Impact 125 SC, representando o controle positivo. Os poços da sexta fileira receberam 1 mL do meio BD, excluindo-se o último poço, representando o controle de crescimento. Da primeira fileira até a quinta foram realizadas as sucessivas diluições da fração hexânica de *P. marginatum*, excluindo-se a última coluna. Todos os poços receberam 20 μ L da suspensão do inóculo de *C. cassiicola*.

As placas foram incubadas à 28 °C durante cinco dias em B.O.D. O ensaio foi feito em triplicata, e o procedimento foi realizado igualmente para a fração acetato-etílica. A Figura 12 esquematiza como foram preparadas as placas de cultura de células.

Figura 12 - Representação do ensaio da concentração mínima inibitória para determinação da atividade antifúngica das frações hexânica e acetato etílicas de *Piper marginatum*



Fonte: A autora (2018).

Após o período de incubação foi feita a leitura dos resultados por meio da observação do crescimento fúngico em lupa, demonstrado pela turbidez do meio. Em seguida, foram

adicionados 20 µL de solução aquosa (4 mg.mL⁻¹) de 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) como substância óxido-redutora indicadora de crescimento microbiano.

4.3.8 Concentração Fungicida Mínima (CFM).

A partir dos poços nos quais não houve crescimento fúngico visível de *C. cassicola*, no teste da CIM anterior à adição de TTC (nas diluições de 5 mg.mL⁻¹ ; 2,5 mg.mL⁻¹ e 1,25 mg.mL⁻¹), foi retirada uma alíquota de 20 µL de cada repetição, que foram inoculadas em placas contendo meio de cultura BDA. As placas foram incubadas a 28 °C e, após 24 h, foi definida a concentração fungicida mínima (CFM) como a menor concentração do extrato em estudo capaz de causar a morte do inóculo, determinando atividade fungicida ou fungistática. O ensaio da CFM foi realizado em triplicata. A CFM foi determinada como a concentração capaz de matar 99,9 % ou mais das células do fungo *C. cassicola*.

4.4 Avaliação do efeito do extrato aquoso de *Piper marginatum* sobre a mancha-alvo em plantas de tomateiro em casa de vegetação.

Foi avaliado o efeito do extrato aquoso de *P. marginatum* que teve o melhor resultado nos testes *in vitro* sobre a severidade da mancha-alvo em tomateiro em casa de vegetação, no Setor de Produção da Faculdade de Ciências Agrárias/UFAM.

Foram utilizadas sementes de tomateiro do cultivar Santa Cruz Kada, que foram colocadas para germinar inicialmente em bandejas de isopor com 128 células contendo substrato comercial Vivatto®, e após 20 dias as mudas foram transplantadas para copos de polietileno de 500 mL contendo mistura de terriço e substrato comercial Vivatto® na proporção de 3:1, e sob irrigação diária. Os tratamentos avaliados estão apresentados na Tabela 3.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com 6 tratamentos e cinco repetições, sendo cada unidade experimental constituída de um copo de 500 mL com uma planta. As testemunhas foram plantas tratadas com água destilada esterilizada. Para a análise estatística os dados foram analisados com auxílio do teste de agrupamento de médias Scott Knott a 5 % de significância. A análise foi realizada pelo programa ASSISTAT versão 7.7 (SILVA e AZEVEDO, 2016).

Tabela 3 - Tratamentos aplicados no experimento da casa de vegetação

T1	Testemunha não inoculada com o fitopatógeno <i>C. cassiicola</i> .
T2	Testemunha inoculada com o fitopatógeno <i>C. cassiicola</i> .
T3	Extrato aquoso de <i>P. marginatum</i> aplicado uma única vez, 48 h antes da inoculação com o fitopatógeno.
T4	Extrato aquoso de <i>P. marginatum</i> aplicado uma única vez, 48 h após a inoculação com o fitopatógeno.
T5	Extrato aquoso de <i>P. marginatum</i> aplicado semanalmente após a inoculação com o fitopatógeno.
T6	Fungicida Impact 125 SC aplicado semanalmente após a inoculação com o fitopatógeno, quando do aparecimento dos sintomas.

Fonte: A autora (2018).

No tratamento T3, as plantas foram pulverizadas 48 h antes da inoculação com o fitopatógeno, com 5 mL da solução do extrato aquoso vegetal com o auxílio de um pulverizador manual Ball PP de 350 mL (Plasduran Plásticos), até antes do ponto de escorrimento. As plantas foram mantidas em câmara úmida por 24 h, à temperatura ambiente.

Um isolado fitopatogênico de *C. cassiicola* (número 23, pertencente à coleção do Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia/UFAM) foi utilizado para inocular as plantas. Este isolado estava mantido em microtubos contendo água destilada esterilizada. Discos contendo os micélios do fungo foram transferidos para placas de Petri contendo meio BDA, incubadas em BOD. Após 7 dias, os conídios foram cuidadosamente removidos das placas de Petri, utilizando um pincel de cerdas macias e preparada uma suspensão de inóculo na concentração de 10^4 conídios.mL⁻¹, ajustada em hemacitômetro.

As plantas dos tratamentos T2, T3, T4, T5 e T6 foram inoculadas aos trinta e quatro dias após a germinação e às 48 h após a pulverização com o extrato aquoso. Cerca de 3 mL da suspensão foram aplicados usando o pulverizador Ball PP de 350 mL (Plasduran Plásticos) às lâminas foliares adaxiais de cada planta antes de se observar o escorrimento. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida durante 24 h. Após este tempo, as plantas permaneceram em casa de vegetação durante o período do experimento.

As plantas dos tratamentos T4 e T5 foram pulverizadas com o extrato aquoso 48 h após a inoculação com o fitopatógeno. As pulverizações no T5 foram repetidas a cada sete dias.

No tratamento T6, foi utilizado o fungicida Impact 125 SC (triazol) na mesma dosagem recomendada para o controle químico da Pinta Preta (*Alternaria solani*) na cultura do tomate de 0,75 – 1 L de produto comercial.ha⁻¹.

As pulverizações foram realizadas no final da tarde, conforme a metodologia descrita por Lopes et al. (2005). A severidade da mancha-alvo foi avaliada no quarto par de folhas a partir da base, após oito dias da inoculação com o fitopatógeno; e para a obtenção da matéria seca, o material foi seco em estufa com ventilação forçada a 65 °C por 72 h.

4.4.3 Avaliação da severidade da mancha-alvo em tomateiro em casa de vegetação.

A severidade da doença foi avaliada em dias alternados pela quantificação do número de lesões e do tamanho da maior lesão, medidas com o auxílio de uma régua milimetrada, em cada planta por repetição de cada tratamento. Plantas com sintomas da doença foram levadas ao Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia da UFAM para reisolamento de *C. cassiicola*.

A avaliação da altura da parte aérea a partir do colo, do número de folhas e peso fresco/seco das folhas e raízes, foi realizada aos 53 dias após a semeadura em balança analítica de precisão, com o objetivo de se verificar a capacidade do extrato aquoso de *P. marginatum* em promover o crescimento de plantas de tomate.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação do potencial de fungos endofíticos isolados do guaranazeiro na inibição do crescimento micelial de *Corynespora cassiicola* in vitro.

Dos 141 isolados endofíticos que participaram do *screening* através da análise visual, apenas 13 apresentaram inibição, os quais foram selecionados para o confronto direto com o patógeno *C. cassiicola*, sendo três isolados oriundos de semente e dez de folhas de guaranazeiro (FIGURA 13).

Os isolados 3012 R1, 3031 R2, 751 R1, 777 (A) R2, 421 (B) R1, 602 (B) R2, 491 R2, 421 R2, 743 R1, 484 R2, 3024 R2, 776 R2, 302 R1, em ordem crescente de eficiência, inibiram o crescimento do fungo e criaram halo de inibição, quando comparados com a testemunha (TABELA 4).

Tabela 4 - Inibição formada de *Corynespora cassiicola* frente aos isolados endofíticos de guaranazeiro

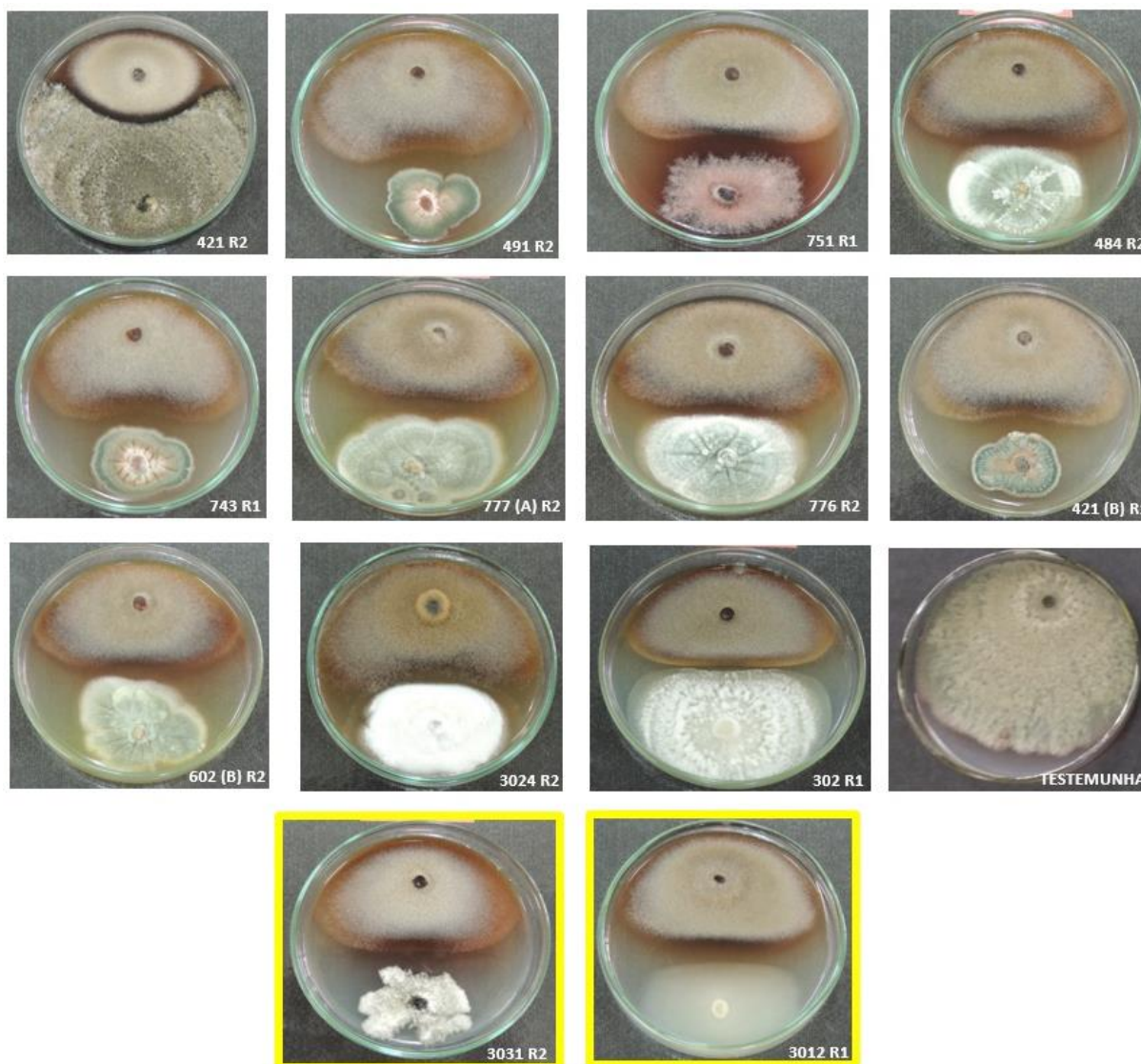
Isolado	Inibição (cm)	Identificação molecular
Testemunha	0,00 ⁱ	-
421 R2	0,55 ^{d, e}	-
3031 R2	1,07 ^{a, b}	<i>Phomopsis</i> sp.
751 R1	1,00 ^b	-
3012 R1	1,18 ^a	<i>Agaricales</i> sp.
743 R1	0,54 ^{d, e}	-
777 (A) R2	0,76 ^c	-
776 R2	0,35 ^{g, h}	-
421 (B) R1	0,68 ^{c, d}	<i>Aspergillus sydowii</i>
602 (B) R2	0,68 ^{c, d}	-
3024 R2	0,38 ^{f, g}	<i>Simplicillium lanosoniveum</i>
491 R2	0,65 ^{c, d, e}	-
484 R2	0,50 ^{e, f}	-
302 R1	0,20 ^h	-

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

- Sequenciamento molecular ainda não concluído.

Foi observado que, embora todos os isolados endofíticos tenham afetado estatisticamente o desenvolvimento do fungo *C. cassiicola*, 3012 R1 e 3031 R2, ambos isolados de sementes de guaranazeiro, quando comparados com a testemunha, apresentaram os maiores valores de inibição (FIGURA 13). Em contrapartida, o isolado 302 R1 apresentou o menor valor.

Figura 13 - Inibição formada entre o crescimento micelial de *Corynespora cassiicola* e dos isolados endofíticos do guaranazeiro



Fonte: A autora (2017).

Os 141 fungos endofíticos utilizados neste ensaio foram avaliados pelo método de culturas pareadas contra *C. cassiicola* e treze mostraram inibição, presumivelmente pela produção de metabólitos secundários porque inibiram a extensão na colônia sem contato micelial e reduziram a área de crescimento do fitopatógeno. A amplificação destes isolados endofíticos foi conduzida usando sequenciamento da região ITS – 1 e ITS - 4 do rDNA, dados estes que ainda estão sendo coletados pela Universidade do Minho (UM) em Portugal, parceira na realização deste projeto.

Apesar do resultado promissor dos ensaios de antagonismos *in vitro*, os isolados endofíticos não foram avaliados *in vivo*, pois não apresentaram produção de esporos suficiente para o ajuste das suspensões de conídios. Porém, é necessária a confirmação destes resultados através de ensaios *in vivo* envolvendo os treze endofíticos promissores, identificando e purificando os compostos presentes, para poder avaliar o potencial destes no controle da mancha-alvo.

Recentes estratégias de sequenciamento de genoma revelaram que o número de genes que codificam as enzimas biossintéticas em vários fungos e bactérias é, sem dúvida, maior que os metabólitos secundários conhecidos desses micro-organismos (SCHERLACH e HERTWECK, 2009; WINTER et al., 2011). É possível que os endofíticos descartados possam apresentar maior potencial que o demonstrado neste estudo, no entanto nas condições *in vitro* nas quais foram testados, somente podem ter sido ativados e/ou expressados de modo que apenas uma parcela menor do seu potencial biossintético real fosse aproveitada.

O estabelecimento, a atividade e a proliferação bem sucedidos de agentes de biocontrole fúngicos dependem de sua adaptação e desempenho em sistemas físicos, biologicamente e espacialmente complexos, onde ocorre uma ampla gama de interações interespecíficas tróficas e não tróficas (KNUDSEN e DANDURAND 2014). Entre os fungos benéficos, *Trichoderma* spp. são os agentes de biocontrole mais amplamente utilizados contra um amplo espectro de patógenos de raiz e pós-colheita (WOO et al., 2014). Outros fungos benéficos com capacidade de biocontrole incluem micorrizas arbusculares (AM), ectomicorrízias (ECM), endofíticos radiculares, leveduras, *Fusarium oxysporum* (cepas não patogênicas), *Cryphonectria parasitica* (cepas hipovirulentas) e *Muscodor albus* (GHORBANPOUR et al., 2018).

Lopes et al. (2017) com o objetivo de isolar e identificar fungos endofíticos de folhas e segmentos de haste sadias do capim citronela (*Cymbopogon nardus* L. Rendle) e avaliar o potencial antagonístico dos fungos isolados contra os fitopatógenos *Curvularia lunata*, *Bipolaris oryzae* e *Fusarium oxysporum*, conseguiram isolar doze representantes de fungos endofíticos e classificá-los em seis gêneros, sendo eles: *Fusarium* sp., *Curvularia* sp., *Bipolaris* sp., *Trichoderma* sp., *Epicoccum* sp. e *Pyricularia* sp. Os endofíticos *Trichoderma* sp. e *Fusarium* sp. apresentaram maior potencial antagonístico, sendo que os isolados de *Trichoderma* sp. inibiram o crescimento dos três fitopatógenos confrontados. Durante o confronto por compostos voláteis, estes isolados de *Trichoderma* spp. atravessaram a divisória da placa de Petri e

colonizaram o micélio do patógeno *Curvularia lunata* podendo caracterizar uma ação parasitária dos isolados.

Estudos genômicos recentes apontam que mais de 1100 estirpes de *Trichoderma* spp., obtidas a partir de 75 espécies, são capazes de desempenhar atividade microparasítica contra diferentes fitopatógenos (PINTO et al., 2015). Essa atividade parasitária e outros mecanismos de ação como produção de antibióticos voláteis e não-voláteis, competição por espaço e nutrientes e atividade enzimática hidrolítica tornam os fungos do gênero *Trichoderma* potentes no controle de fitopatógenos e na promoção do crescimento vegetal (MACHADO et al., 2012; BRITO et al., 2014).

5.2 Avaliação do potencial dos extratos brutos aquosos na inibição do crescimento micelial, produção e germinação de esporos de *Corynespora cassiicola* in vitro.

Ao observar os resultados das análises estatísticas foi constatado que os extratos brutos de *P. sprucei*, *C. zedoaria*, *C. cajucara* e *P. marginatum* apresentaram efeito na inibição do crescimento micelial, da esporulação e da germinação de conídios do patógeno *C. cassiicola* (TABELA 5), constatando-se que os efeitos dos fatores são dependentes, portanto a análise foi realizada para a interação entre eles. Dessa forma ajustaram-se equações de regressão aos níveis do fator concentração de cada extrato.

Tabela 5 - Porcentagem de inibição do crescimento micelial, da esporulação e da germinação de conídios de *Corynespora cassiicola* por extrato bruto de *Picrolemma sprucei*, *Curcuma zedoaria*, *Croton cajucara* e *Piper marginatum*

Concentração	Espécies de plantas											
	<i>Picrolemma sprucei</i>			<i>Curcuma zedoaria</i>			<i>Croton cajucara</i>			<i>Piper marginatum</i>		
	PIC (%)	PIE (%)	PIG (%)	PIC (%)	PIE (%)	PIG (%)	PIC (%)	PIE (%)	PIG (%)	PIC (%)	PIE (%)	PIG (%)
0 %	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
10 %	(+) 3,50 ^b	56,33 ^b	14,33 ^c	5,00 ^a	36,33 ^c	27,33 ^b	(+) 3,75 ^b	32,66 ^c	52,33 ^a	13,00 ^a	76,33 ^a	20,66 ^c
20 %	(+) 4,75 ^a	40,00 ^a	13,00 ^c	5,75 ^a	41,00 ^a	37,66 ^b	4,25 ^a	22,33 ^b	55,00 ^a	8,50 ^a	51,00 ^a	48,00 ^a
30 %	(+) 3,50 ^b	65,33 ^a	17,66 ^c	24,25 ^a	65,66 ^a	2,66 ^d	(+) 0,75 ^b	48,00 ^b	60,67 ^a	6,75 ^b	68,66 ^a	35,66 ^b
40 %	(+) 0,75 ^b	45,33 ^b	20,00 ^b	3,25 ^a	1,33 ^c	4,33 ^c	4,25 ^a	61,66 ^a	55,33 ^a	13,75 ^a	63,66 ^a	28,00 ^b
50 %	8,50 ^a	32,00 ^b	18,66 ^b	0,50 ^b	44,33 ^b	2,00 ^c	(+) 2,25 ^b	51,33 ^a	37,66 ^a	15,00 ^a	59,33 ^a	5,00 ^c
CV(%)	76,21	25,69	23,15	76,21	25,69	23,15	76,21	25,69	23,15	76,21	25,69	23,15

Médias seguidas pelas mesmas letras nas linhas não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5 %.

(+) Estimulou o crescimento micelial.

PIC = Porcentagem de inibição do crescimento micelial.

PIE = Porcentagem de inibição da esporulação.

PIG = Porcentagem de inibição da germinação de conídios.

Os extratos brutos de *P. marginatum* e de *C. zedoaria* destacaram-se a partir da menor concentração testada (10 %), com PIC de 13 % e 5 %, respectivamente, não havendo diferenças estatísticas entre eles.

Na concentração de 20 %, os extratos brutos que se destacaram com a maior PIC foram *P. marginatum*, *C. zedoaria* e *C. cajucara*, com 8,5 %, 5,75 % e 4,25 %, respectivamente. *C. zedoaria* na concentração de 30 % e *P. marginatum* nas concentrações de 40 % e de 50 % se sobressaíram aos demais tratamentos com uma PIC de 24,25 %, 13,75 % e 15 %, respectivamente; e os extratos brutos de *P. sprucei* na concentração de 50 % e de *C. cajucara* na concentração de 40 % inibiram o crescimento do patógeno em 8,5 % e 4,25 %, respectivamente.

Os extratos de *P. sprucei* nas concentrações de 10 % a 40 % e de *C. cajucara* nas concentrações de 10 %, 30 % e 50 % apresentaram menor PIC, promovendo o crescimento micelial do patógeno (TABELA 5). Estes resultados podem ser explicados pela possibilidade de presença de substâncias promotoras de crescimento do patógeno *C. cassicola* nestes extratos, significando que não houve inibição, mas estímulo no crescimento.

Nessa ótica, Morais (2009) acredita que a composição química pode ter influência direta nos resultados da inibição do fitopatógeno, pois a presença ou ausência de compostos químicos podem apresentar determinada ação fungitóxica influenciada por fatores genéticos, técnicos (coleta, estabilização e armazenamento), bióticos ou abióticos, o que também altera a qualidade e, conseqüentemente, resultados de tratamentos e testes biológicos sobre fitopatógenos (PIMENTEL et al., 2010).

Ferreira et al. (2012), verificando *in vitro* o efeito de diferentes temperaturas e a viabilidade da utilização de óleos essenciais de *Astrocaryum murumuru* Mart. (murmurú), *Oenocarpus bataua* Mart. (patauá) e *Mauritia flexouosa* L.f. (buriti), sobre o crescimento micelial de *Fusarium solani* nas concentrações de 1, 5, 10, 15, 20 e 50 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, verificaram em todas as concentrações analisadas a percentagem de inibição de crescimento (PIC) negativa quando comparadas com a testemunha, exceto na concentração 50 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, onde se verificou inibição positiva do crescimento micelial, sendo acentuado para o óleo de patauá com 10,81 %.

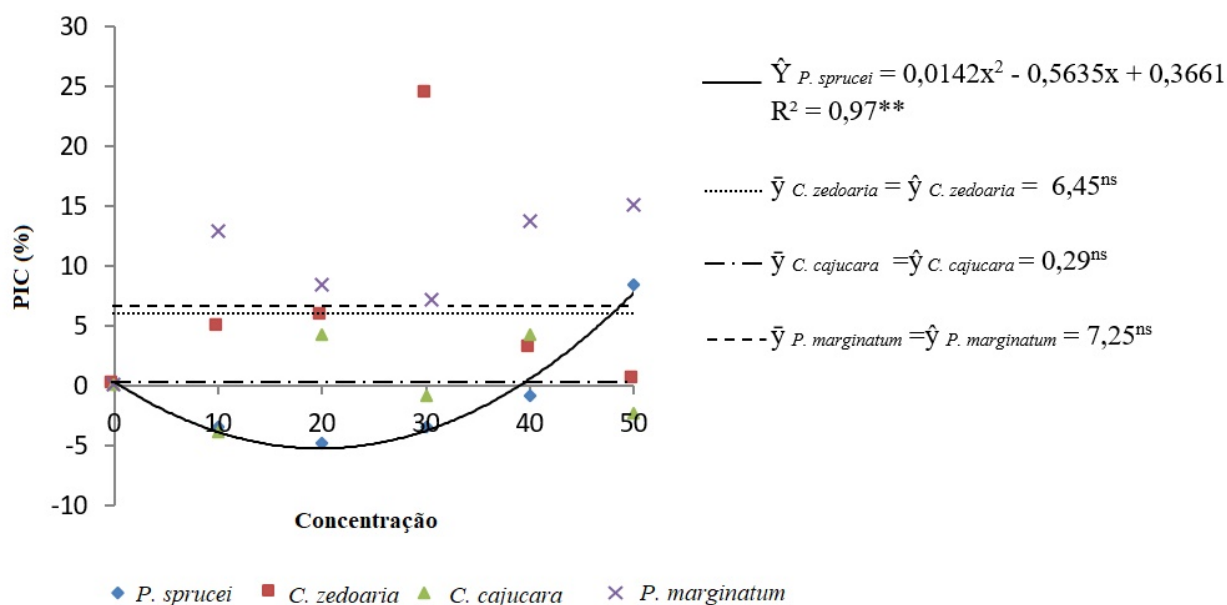
Avaliando o crescimento de isolados de fungos ectomicorrízicos em substratos contendo diferentes concentrações de metabólitos secundários, Ludley et al. (2008, 2009) observaram variação significativa, tanto de inibição como de estímulo dos isolados,

dependendo da espécie ectomicorrízica e da concentração dos metabólitos. Segundo os autores, o comportamento das espécies ectomicorrízicas frente à presença de metabólitos secundários é fundamental para a seleção de isolados capazes de formar simbiose com determinada comunidade de plantas. Segundo Ludley et al. (2009), os resultados referentes à ação de óleos essenciais no estímulo ou na inibição do crescimento de microrganismos não estão somente relacionados ao tipo de compostos presentes nos óleos, mas sim no comportamento dose-efeito. Segundo os autores, embora alguns metabólitos secundários sejam essenciais para o desenvolvimento e crescimento micelial, determinados compostos, quando em concentrações elevadas, causam retardo ou até mesmo limitam a expansão das hifas de isolados ectomicorrízicos. De acordo com Atanda et al. (2007), os óleos essenciais de *Cinnamomum cassia* Blume e *Laurus nobilis* L. estimularam o crescimento micelial *in vitro* de *Aspergillus parasiticus*.

A análise de regressão das concentrações dos extratos brutos mostrou-se significativa apenas para a planta caferana (*P. sprucei*), a qual obteve o valor de 8,5 % para a PIC na concentração de 50 % (FIGURA 14), sendo que nessa concentração pode haver substâncias antagônicas suficientes para reduzir o crescimento fúngico. Os extratos brutos das demais plantas não foram significativos, os erros da PIC não possuem variâncias constantes, em *C. zedoaria*, por exemplo, nota-se um comportamento crescente até a concentração de 30 % e decrescente nas de 40 % e 50 %. De forma inversa, *P. marginatum* apresentou diminuição da PIC até a concentração de 30 % e acréscimo nas concentrações de 40 % e 50 %.

Na espécie *C. cajucara*, foi observado o estímulo no crescimento micelial nas concentrações de 10 %, 30 % e 50 %.

Figura 14 - Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Corynespora cassiicola* em diferentes concentrações de extrato bruto aquoso de *Picrolemma sprucei*, *Curcuma zedoaria*, *Croton cajucara* e *Piper marginatum*. Médias dos dados originais sem transformação. **Significativo a 1 % pelo teste F



Fonte: A autora (2018).

De maneira geral, quando se aumenta a concentração dos extratos brutos no meio de cultura, maior é a inibição do crescimento micelial do fungo, destacando-se aqui os extratos de *C. zedoaria* e *P. marginatum* (TABELA 5), que se mostram mais eficientes, mesmo em baixas concentrações. Rozwalka et al. (2008) afirmam que o uso de diferentes concentrações de extratos vegetais podem resultar em maior ou menor eficiência de controle fúngico, assim como na credibilidade dos dados obtidos.

Chagas e Vieira (2007) explicaram que, às vezes, há problemas em alcançar uma correlação linear entre a concentração e eficácia porque, em um extrato, as substâncias bioativas podem não ser distribuídas homoganeamente no interior do material, ou pode ser afetado por meio da técnica ou processo usado para produzi-lo, o que possivelmente justificaria a diferença encontrada dentro da própria espécie nas diferentes concentrações.

Os esporos são unidades reprodutivas e infectivas dos fungos fitopatogênicos responsáveis por produzir propágulos que se disseminam e infectam a planta. Assim, quanto maior a inibição da formação de esporos, mais eficiente é o produto (SIMON et al., 2018), uma vez que a redução da produção e consequente disseminação pode resultar na menor taxa de progresso da doença em campo, sendo este um efeito epidemiologicamente desejável.

O extrato bruto de *C. zedoaria* e *C. cajucara* na concentração de 10 % apresentaram a menor PIE, correspondendo a 36,33 % e 32,66 %, respectivamente. Os extratos brutos de *P. marginatum* e de *P. sprucei* destacaram-se com a maior PIE, com valores de 76,33 % e 56,33 %, respectivamente, havendo diferenças estatísticas entre eles.

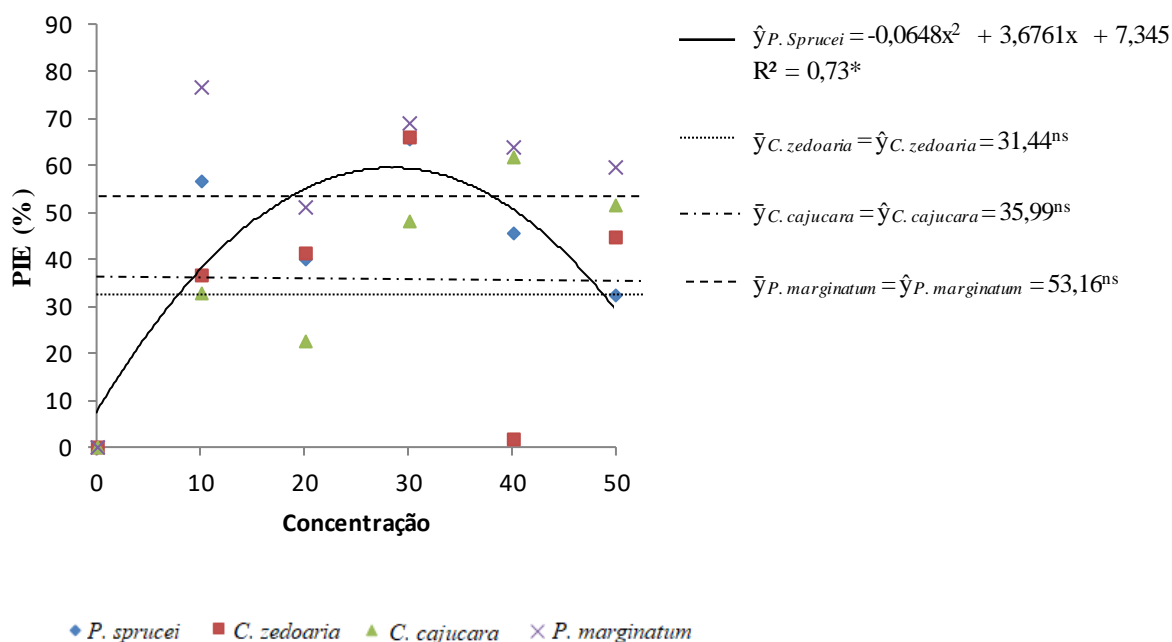
Nas concentrações de 20 % e 30 %, os extratos brutos que apresentaram os maiores valores de PIE foram *P. marginatum*, *C. zedoaria* e *P. sprucei*, representados por 51 %, 41 % e 40 %, para a concentração de 20 %. Para a concentração de 30 %, a PIE foi de 68,66 %, 65,66 % e 65,33 %, respectivamente. Por sua vez, o extrato bruto de *C. cajucara* nestas mesmas concentrações não apresentou resultado satisfatório em relação à PIE, apresentando apenas 22,33 % de inibição da esporulação na concentração de 20 %, e 48 % na concentração de 30 %.

O extrato bruto de *C. cajucara* apresentou menor PIE nas concentrações de 10 a 30 %, sendo mais efetivo nas concentrações de 40 e 50 % juntamente com *P. marginatum*, que apresentaram PIE de 61,66 % e 63,66 % na concentração de 40 %; e 51,33 % e 59,33 % na concentração de 50 %, respectivamente.

Foi observado que o extrato bruto de *P. marginatum* na concentração de 10 % apresentou a maior PIE, de 76,33 %, seguido das concentrações de 30 %, 40 % e 50 % com porcentagem de inibição de 68,66 %, 63,66 % e 59,33 %, respectivamente. Na concentração de 20 % não houve inibição significativa, sendo necessário que este experimento seja repetido para confirmação deste resultado.

A análise de regressão das concentrações dos extratos brutos mostrou-se significativa apenas para *P. sprucei* (caferana), a qual obteve o valor de 65,33 % para a PIE na concentração de 30 % (FIGURA 15), sendo que nessa concentração pode haver substâncias antagônicas suficientes para inibir a esporulação do patógeno. Os extratos brutos das demais plantas não foram significativos para esta variável, pois os erros da PIE não possuem variâncias constantes, apresentando seus pontos dispostos aleatoriamente em torno da linha traçada.

Figura 15 - Inibição da esporulação de conídios de *Corynespora cassiicola* em diferentes concentrações de extrato bruto aquoso de *Picrolemma sprucei*, *Curcuma zedoaria*, *Croton cajucara* e *Piper marginatum*. *Significativo a 5 % pelo teste F. ^{ns} Não significativo pelo teste F



Fonte: A autora (2018).

Na concentração de 10 %, a menor PIG foi observada no tratamento com extrato bruto aquoso de *P. sprucei* com 14,33 % e *P. marginatum* com 20,66 %. Na concentração de 20 %, a menor PIG foi para *P. sprucei* com 13 % de PIG e na concentração de 30 %, os extratos brutos de *P. sprucei* e *C. zedoaria* apresentaram PIG de 17,66 % e 2,66 %, respectivamente. Nas concentrações de 40 e 50 %, *C. zedoaria* apresentou a menor PIG, com valores de 4,33 % e 2 %, respectivamente.

Todas as concentrações avaliadas para o extrato de *C. cajucara* tiveram influência sobre a porcentagem de inibição da germinação de *C. cassiicola*, com PIG's que variaram de 37,66 % (na concentração de 50 %) e 60,67 % (na concentração de 30 %). *P. marginatum* também se destaca com uma PIG de 48 % na concentração de 20 % do extrato aquoso. Portanto, estes dois extratos testados nos ensaios para a germinação indicam potenciais inibidores e/ou controladores da atividade microbiana, com ação direta sobre o patógeno alvo, porém a PIG de conídios não foi proporcional ao aumento das concentrações dos extratos brutos.

Souza et al. (2006) com o objetivo de obter óleos fixos (OF) das cascas do caule de *C. cajucara*, e avaliar as propriedades fungicidas do OF obtido pelo procedimento de coluna cromatográfica (CC), puderam avaliar o efeito biológico do OF-CC no desenvolvimento *in vitro*

dos fungos fitopatogênicos *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. Foi observado que os fungos *R. solani* e *S. rolfsii* foram resistentes ao óleo testado, de modo que o percentual de inibição diminuiu com o transcorrer dos dias, principalmente para *S. rolfsii*. O fungo *F. oxysporum* foi o que sofreu efeito inibitório mais estável ao longo dos 5 dias de crescimento. Comparativamente, o fungo *S. rolfsii* sofreu a maior queda do efeito inibitório, enquanto o fungo *R. solani* sofreu maior inibição ao crescimento da colônia.

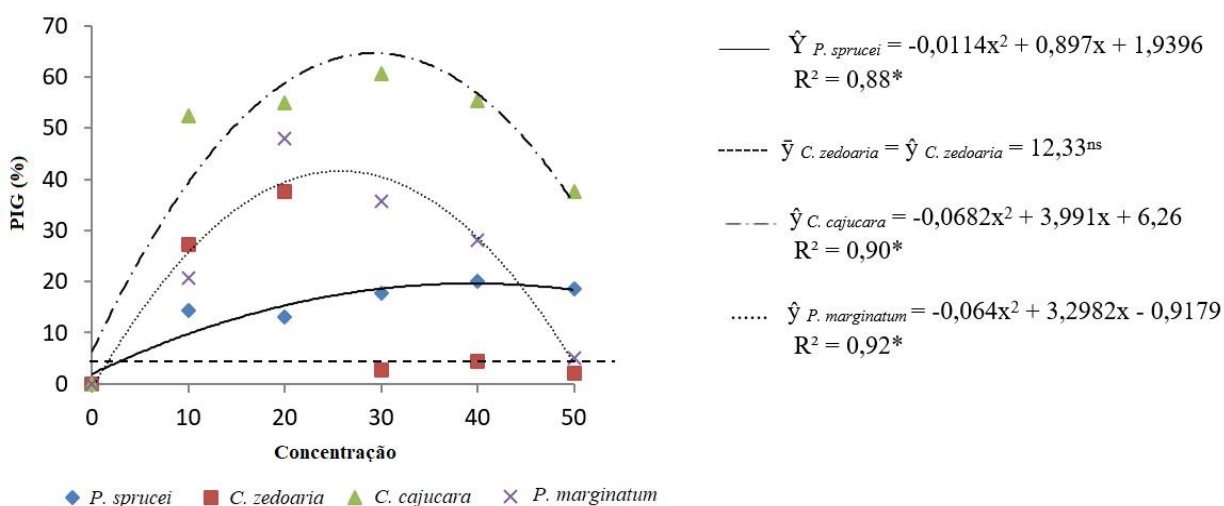
Croton cajucara é muito utilizada na medicina popular na região Amazônica, mas sua ação fungicida no controle de *C. cassiicola* ainda não é conhecida. Já foram demonstradas as suas atividades anti-inflamatória, antitumoral e antiestrogênica da transdesidrocrotonina, um 19-nor-diterpeno neutro majoritário nas cascas de árvores adultas - idade acima de 3 anos (MACIEL et al., 2000). Atividades antiespasmódica, anti-inflamatória e antinociceptiva do triterpeno ácido acetil aleuritólico, um ácido majoritário nas cascas de árvores jovens - idade até 2 anos, também foram observadas por Maciel et al. (2000).

Plantas do gênero *Piper* são amplamente estudadas devido às suas atividades biológicas. Silva e Bastos (2007) avaliaram a atividade de óleos de várias espécies de *Piper* no crescimento micelial e de basidiósporos de *Moniliophthora perniciosa*. As espécies e diluições mais eficientes dos óleos foram: *P. marginatum* var. *anisatum* ($0,5 \mu\text{L.mL}^{-1}$), *P. dilatatum* ($0,4 \mu\text{L.mL}^{-1}$) e *P. callosum* ($0,5 \mu\text{L.mL}^{-1}$), causando inibição total do crescimento. Os dados mostraram também que os basidiósporos são mais sensíveis que os micélios aos óleos estudados. Navickiene et al. (2006), relataram a alta atividade antifúngica do óleo de *P. aduncum* e *P. tuberculatum* contra os fungos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, com concentração inibitória mínima (CIM) de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Essas plantas também contêm safrol, o que sugere sua propriedade antimicrobiana. Zacaroni et al. (2009) observaram o efeito tóxico do óleo essencial de folhas de *P. hispidinervum* sobre *Bipolaris sorokiniana*, *F. oxysporum* e *C. gloeosporioides*. A inibição total ocorre em concentrações de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em *B. sorokiniana* e $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em *F. oxysporum* e *C. gloeosporioides*. Bastos e Albuquerque (2004) avaliaram o óleo essencial de *P. aduncum* no controle de *Colletotricum musae*, observando inibição total do crescimento micelial e germinação de conídios utilizando $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de óleo. Nas condições *in vivo*, apenas 1 % do óleo foi capaz de reduzir a podridão nos frutos de banana. Hanada et al. (2004) explicam o efeito inibitório do óleo essencial de *P. hispidinervum* sobre a germinação de conídios de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet à presença de safrol no óleo essencial. Parmar et al. (1997) encontraram safrole, miristicina, eugenol,

dillapiol e apiol como os principais compostos dos óleos essenciais da família Piperaceae. Todos estes compostos possuem propriedades antimicrobianas e antioxidantes.

Na análise de regressão da FIG, as equações quadráticas ajustadas em função das concentrações crescentes, mostraram ser significativas para todos os extratos, exceto para *C. zedoaria*, que obteve valores para a FIG próximos a zero nas concentrações de 30, 40 e 50 % (FIGURA 16).

Figura 16 - Inibição da germinação de conídios de *Corynespora cassiicola* em diferentes concentrações de extrato bruto aquoso de *Picrolemma sprucei*, *Curcuma zedoaria*, *Croton cajucara* e *Piper marginatum*. *Significativo a 5 % pelo teste F. ^{ns} Não significativo pelo teste F



Fonte: A autora (2018).

Borges et al. (2013), avaliando o efeito do extrato de *Curcuma longa* na germinação de urediniosporos de *Phakopsora pachyrhizi*, agente etiológico da ferrugem-asiática da soja verificaram sua eficiência com um percentual de 69,91 % de inibição, quando comparado com a testemunha. Balbi-Peña et al. (2006), utilizando extratos de curcuma e da curcumina (substância extraída da curcuma), observaram que os extratos brutos não autoclavados promoveram a inibição da germinação de esporos de *Alternaria solani* de até 15 %, o que não ocorreu com os extratos autoclavados, indicando a presença de algum composto termolábil, contrariando o resultado apresentado neste trabalho.

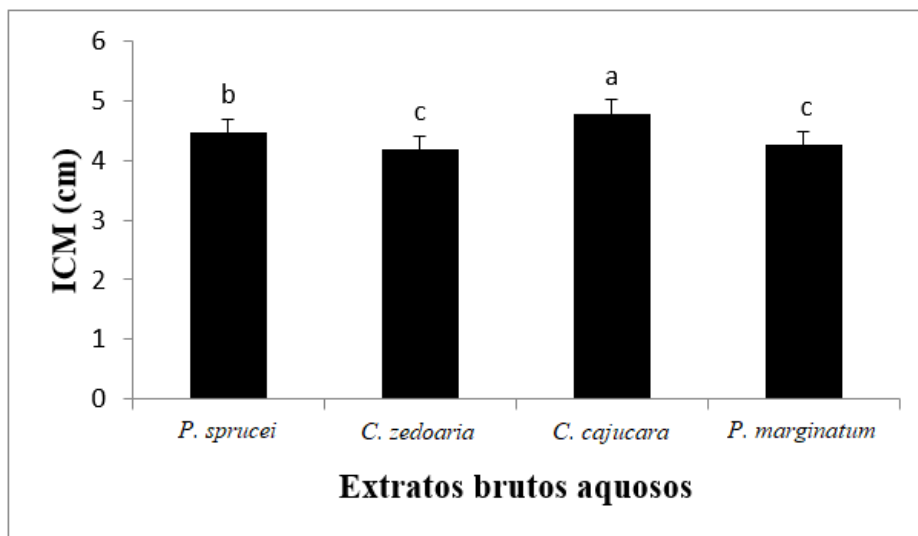
Analisando todas as variáveis juntas, conclui-se que a espécie *P. sprucei* foi a que obteve os melhores resultados de PIC, PIE e FIG.

Ainda não é conhecida a eficiência e a viabilidade do uso do extrato bruto de *P. sprucei* no controle da mancha-alvo em tomateiro, mas de acordo com os resultados obtidos neste trabalho, essa prática poderá se constituir em uma opção de manejo desta doença para os produtores do Estado do Amazonas, visto que esta espécie distingue-se pela presença nos seus tecidos de substâncias terpênicas altamente oxigenadas, conhecidas como quassinóides (THOMAS, 1990). Estudos químicos realizados em folhas de *P. sprucei* isolaram 15-desacetilsergeolida, sergeolida e isobruceína (POLONSKY et al., 1984). Os quassinóides, sergeolida, isobruceína e 15-desacetilsergeolida apresentaram potente atividade antifágica e inibição do crescimento do verme *Heliothis virescens* f. (lagarta do broto do tabaco ou lagarta-da-maça) e da praga do milho *Agrotis ipsilon* Hfn. (lagarta-rosca negra), sem provocar a morte dos insetos (LIDERT et al., 1987). Polonsky et al. (1989) demonstraram que a isobruceína apresenta forte atividade antifágica frente à espécie de pulgão *Myzus persicae* s.s (Sulzer) (Hemiptera, Aphididae), a uma concentração de 0,05 %, com uma baixa fitotoxicidade a *Brassia campestris* var. *Chinensis* (L.) Makino (repolho branco chinês – pak choi), enquanto que a sergeolida não se mostrou eficaz até uma concentração de 0,1 %; porém, causou danos consideráveis às folhas de repolho.

Com relação ao índice de crescimento micelial (ICM), não houve interação significativa entre as espécies de plantas e as concentrações dos extratos brutos. Esta variável foi influenciada significativamente pelas espécies de plantas (FIGURA 17), e pelas concentrações de forma linear decrescente (FIGURA 18), ambas analisadas separadamente.

O extrato de *C. cajucara* proporcionou ICM correspondente a 4,78 cm, diferindo estatisticamente das demais espécies; enquanto que *C. zedoaria* e *P. marginatum* foram as que proporcionaram menor ICM, iguais a 4,19 e 4,27 cm, respectivamente (FIGURA 18).

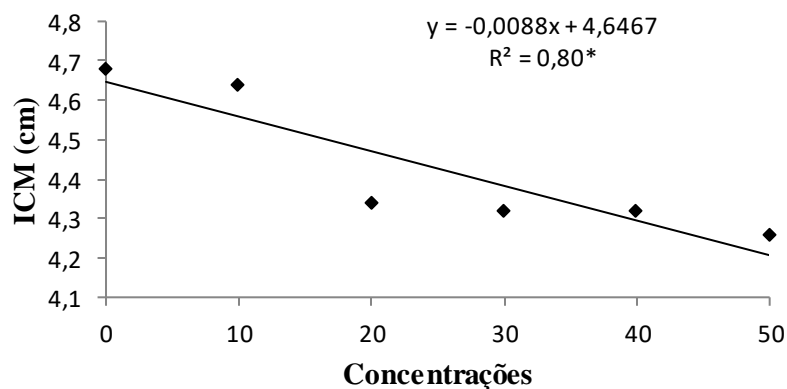
Figura 17 - Índice de crescimento micelial das espécies *Picrolemma sprucei*, *Curcuma zedoaria*, *Croton cajucara* e *Piper marginatum* utilizadas nos extratos brutos aquosos



Fonte: A autora (2018).

Foi possível analisar a equação de regressão pelo o Índice de Crescimento Micelial (ICM) para *C. cassiicola* submetido a diferentes concentrações dos extratos brutos de *P. sprucei*, *C. zedoaria*, *C. cajucara* e *P. marginatum*. Foi observado que a testemunha apresentou crescimento micelial superior quando comparado com as demais concentrações e que à medida que se aumentava as concentrações o crescimento foi reduzido (FIGURA 18).

Figura 18 - Efeito de seis concentrações de extratos brutos aquosos de *Picrolemma sprucei*, *Curcuma zedoaria*, *Croton cajucara* e *Piper marginatum* no índice de crescimento micelial (ICM) de *Corynespora cassiicola*, doze dias após a incubação. *Significativo a 5 % pelo teste F. Média Geral = 4.43219. CV % = 6.53



Fonte: A autora (2018).

Existem divergências na literatura em trabalhos que visam avaliar a atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o crescimento de fitopatógenos, mesmo aqueles que estudam a mesma planta. A diferença nestes resultados pode estar associada às condições edafoclimáticas em que as plantas foram cultivadas, ou ainda, à época do ano em que a mesma foi coletada. Di Stasi (1996) afirma ainda que a concentração de princípios ativos não se apresenta uniforme no decorrer do ciclo da planta, podendo apresentar variações conforme as condições de cultivo, a colheita e o processamento do material vegetal.

5.3 Avaliação do potencial de extratos fracionados na inibição do crescimento micelial, produção e germinação de esporos de *Corynespora cassiicola* in vitro.

As plantas apresentam uma enorme diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas. Extratos, frações e compostos isolados extraídos destas fontes têm sido estudados por pesquisadores por mostrarem significativas propriedades, entre estas a antimicrobiana (ALBERNAZ et al., 2010). Por esses motivos e pelos resultados encontrados frente aos ensaios realizados com os extratos brutos aquosos das plantas avaliadas, se aprofundou os estudos com os extratos orgânicos.

O rendimento total dos extratos obtidos com hexano, acetato de etila e metanol, a partir da extração líquido-líquido (que serão chamados de frações) está representado na Tabela 6. As frações metanólicas foram as que tiveram maior rendimento se comparado com as outras, isso porque grande parte dos açúcares e produtos glicosilados presentes no pó da folha são extraídos nesse solvente. O metanol é o solvente com maior polaridade e capaz de extrair distintas categorias de moléculas ativas, incluindo substâncias de diferentes graus de polaridade. Como o rendimento da fração acetato-etílica de *C. cajucara* apresentou o menor valor em gramas, serviu como base para o cálculo da quantidade de extrato necessária para o preparo de todas as soluções estoques dos ensaios antibióticos realizados.

Tabela 6 - Rendimento total das frações hexânicas, acetato-etílicas e metanólicas das espécies *Picrolemma sprucei*, *Curcuma zedoaria*, *Croton cajucara* e *Piper marginatum*

ESPÉCIE	SOLVENTE	RENDIMENTO (g)
<i>Picrolemma sprucei</i> Hook.f (caferana)	Hexano	2,01
	Acetato	2,47
	Metanol	9,84
<i>Curcuma zedoaria</i> (Christin.) Rosc (curcuma)	Hexano	2,62
	Acetato	2,35
	Metanol	4,84
<i>Croton cajucara</i> Benth. (sacaca)	Hexano	1,18
	Acetato	0,87
	Metanol	6,46
<i>Piper marginatum</i> Jacq. (capeba)	Hexano	1,35
	Acetato	2,36
	Metanol	7,13

Fonte: A autora (2018).

As frações das espécies de plantas estudadas interferiram nas porcentagens de inibição do crescimento micelial, da esporulação, da germinação e no índice de crescimento micelial do patógeno *C. cassicola*, constatando-se que os efeitos dos fatores são dependentes, portanto a análise foi realizada para a interação entre eles (TABELA 7).

Tabela 7 - Porcentagens de inibição do crescimento micelial, da esporulação, da germinação e índice de crescimento micelial do patógeno *Corynespora cassiicola* nas frações hexânicas, acetato-etílicas e metanólicas de *Picrolemma sprucei*, *Curcuma zedoaria*, *Croton cajucara* e *Piper marginatum*.

Solventes	Espécies de plantas															
	<i>Picrolemma sprucei</i>				<i>Curcuma zedoaria</i>				<i>Croton cajucara</i>				<i>Piper marginatum</i>			
	PIC (%)	PIE (%)	PIG (%)	ICM (cm)	PIC (%)	PIE (%)	PIG (%)	ICM (cm)	PIC (%)	PIE (%)	PIG (%)	ICM (cm)	PIC (%)	PIE (%)	PIG (%)	ICM (cm)
ADE	0 ^{a,C}	0 ^{a,C}	0 ^{a,B}	3,07 ^{a,A}	0 ^{a,B}	0 ^{a,C}	0 ^{a,B}	3,00 ^{a,A}	0 ^{a,B}	0 ^{a,C}	0 ^{a,B}	2,95 ^{a,A}	0 ^{a,B}	0 ^{a,C}	0 ^{a,D}	3,09 ^{a,A}
Hexano	18,66 ^{c,B}	74 ^{b,A}	4,25 ^{c,B}	2,83 ^{a,A}	37,33 ^{b,A}	66,33 ^{b,A}	1,69 ^{c,B}	1,50 ^{b,B}	2,00 ^{d,B}	4,66 ^{c,B}	38,57 ^{b,A}	2,52 ^{a,A}	72,66 ^{a,A}	95,00 ^{a,A}	76,08 ^{a,B}	0,67 ^{c,B}
Acetato de Etila	14,33 ^{c,B}	38,66 ^{b,B}	28,00 ^{b,A}	2,49 ^{a,B}	34,33 ^{b,A}	33,33 ^{b,B}	(+) 7,5 ^{c,C}	1,60 ^{b,B}	3,00 ^{c,B}	24,33 ^{b,A}	33,98 ^{b,A}	2,37 ^{a,A}	73,33 ^{a,A}	96,00 ^{a,A}	92,56 ^{a,A}	0,70 ^{c,B}
Metanol	32,66 ^{a,A}	51,00 ^{a,B}	(+) 4,25 ^{d,B}	2,48 ^{b,B}	30,33 ^{a,A}	16,66 ^{b,B}	63,59 ^{a,A}	2,04 ^{b,B}	16,00 ^{b,A}	41,00 ^{a,A}	39,94 ^{b,A}	2,44 ^{b,A}	0,66 ^{c,B}	19,66 ^{b,B}	31,87 ^{c,C}	2,97 ^{a,A}
CV(%)	33,97	23,4	11,48	13,06	33,97	23,4	11,48	13,06	33,97	23,4	11,48	13,06	33,97	23,4	11,48	13,06

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas colunas e minúscula nas linhas não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5 %.

(+) Estimulou o germinação de conídios.

PIC = Porcentagem de inibição do crescimento micelial.

PIE = Porcentagem de inibição da esporulação.

PIG = Porcentagem de inibição da germinação de conídios.

As frações hexânicas e acetato-etílicas de *P. marginatum* reduziram significativamente o crescimento micelial de *C. cassicola*, apresentando uma PIC de 72,66 % e 73,33 %, respectivamente, não diferindo entre si.

Resultado semelhante foi encontrado por Araújo et al. (2014) avaliando o efeito de extratos de capeba (*Piper marginatum*) e de nim (*Azadirachta indica*) sobre o fungo *Colletotrichum scovillei*. Os extratos metanólicos de folhas de *P. marginatum* a 250 ppm, de folhas de *A. indica* a 1.000 e 2.000 ppm e de sementes de *A. indica* a 500 ppm inibiram o crescimento micelial de *C. scovillei in vitro*; a fração acetato de etila do extrato metanólico de *P. marginatum* reduziu significativamente o crescimento *in vitro* de *C. scovillei*, e uma fração purificada da fração acetato de etila do extrato metanólico de *P. marginatum* reduziu o crescimento de *C. scovillei*, tanto *in vitro* como em pós-colheita, de modo mais eficiente do que o fungicida mancozeb.

Todas as frações de *C. zedoaria* apresentaram grande PIC, apresentando valores de 37,33 % para a fração hexânica; 34,33 % para a fração acetato-etílica e 30,33 % para a fração metanólica. Por sua vez, *P. sprucei* e *C. cajucara* foram significativas apenas na fração metanólica, com PIC's de 32,66 % e 16 %, respectivamente.

As frações hexânica e acetato-etílica de *P. marginatum* demonstraram ter melhor potencial inibidor do patógeno que as demais.

Resultados semelhantes foram encontrados por Santos et al. (2011), na qual testaram 10 µL de óleo essencial de *P. marginatum*, sobre *Fusarium oxysporum*, onde foi observado após 24 h de experimento, a inibição do crescimento do fungo, com colônias apresentando diâmetro médio de 22,5 mm no tratamento com óleo essencial. Enquanto que, no controle utilizando acetona, o diâmetro médio foi de 69,9 mm.

Prince e Prabakaran (2011) avaliaram diferentes espécies vegetais, entre as quais *Azadirachta indica* e *Piper betle* (Piperaceae), contra *Colletotrichum falcatum*, e verificaram que o extrato de nim foi o menos eficiente no controle do fitopatógeno *in vitro*, enquanto *P. betle* apresentou resultados significativos de inibição do fungo. Foi verificado no presente trabalho, que as espécies *P. sprucei*, *C. zedoaria* e *C. cajucara* em todas as frações avaliadas tiveram pouca ou nenhuma influência sobre a PIC de *C. cassicola*, especialmente em comparação ao efeito antifúngico das frações hexânica e acetato-etílicas de *P. marginatum*, que foram promissoras no controle do fitopatógeno.

Extratos de espécies do gênero *Piper* já foram testados contra diversos fitopatógenos *in vitro*: *P. chaba* Hunter inibiu o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici* Leonian., *Colletotrichum capsici*, *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. e *R. solani* (RAHMAN et al., 2011). *Piper auritum* Kunth e *Piper holtonii* C. DC. também inibiram o crescimento micelial de *C. acutatum* J. H. Simmonds, *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. e *Botryodiplodia theobromae* (PINEDA et al., 2012). Os resultados observados no presente trabalho, em que foi verificada a eficiência de *P. marginatum* no controle de um importante fungo fitopatogênico do tomateiro, corroboram com estes estudos.

Em relação à porcentagem de inibição da esporulação (PIE), as frações hexânica e acetato-etílica de *P. marginatum* foram as que apresentaram a maior PIE, diferindo estatisticamente em relação às demais espécies, com valores de 95 % e 96 %, respectivamente.

Picrolemma sprucei e *C. zedoaria* na fração hexânica apresentaram a maior PIE, com valores de 74 % e 66,33 %, respectivamente, quando comparadas com as demais frações, nas quais não foram observadas diferenças significativas. Na fração acetato-etílica, os valores de PIE não diferiram entre si para as espécies *P. sprucei*, *C. zedoaria* e *C. cajucara*, com valores de 38,66 %, 33,33 % e 24,3 %, respectivamente. Condição semelhante foi apresentada na fração metanólica para as espécies *P. sprucei* e *C. cajucara*, em que não diferiram estatisticamente, representadas por 51 % e 41 % de PIE, respectivamente.

De acordo com os resultados obtidos, *P. marginatum* apresenta compostos com potencial antifúngico. Alguns trabalhos já apresentaram relatos sobre compostos identificados e comprovados como antimicrobianos em espécies do gênero *Piper* (RAHMAN et al., 2011).

Piper marginatum da mesma forma que as outras variáveis anteriormente analisadas, apresentou a maior PIE de *C. cassiicola* nas frações hexânica e acetato-etílica, inibindo em 92,56 % e 76,08 % a germinação, respectivamente. Não houve diferença estatística entre as frações de *C. cajucara*, podendo-se dizer que todas elas inibiram, mas parcialmente a germinação de esporos de *C. cassiicola*.

A espécie *C. zedoaria* na fração metanólica também reduziu significativamente a germinação de *C. cassicola*, apresentando uma PIG de 63,59 %. O menor valor significativo de PIG (28 %), foi verificado junto a espécie *P. sprucei* na fração acetato-etflica.

Por outro lado, os extratos de *P. sprucei* na fração metanólica e de *C. zedoaria* na fração acetato-etflica apresentaram os menores valores de PIG, promovendo incitação na germinação do patógeno *C. cassicola* (TABELA 7), indicados pelo sinal positivo (+), significando que não houve inibição, mas estímulo na germinação.

A inibição da germinação de esporos, com extratos de plantas, é um dos objetivos do biocontrole de doenças de plantas (PARVU et al., 2010). Estes autores estudando o efeito do extrato hidroalcoólico da casca de *Berberis vulgaris* sobre conídios de *Botrytis cinerea* (mofo-cinzento) encontraram mudanças estruturais que levaram à perda da viabilidade. Contudo, este resultado não foi encontrado no trabalho de Cunico et al. (2012), que verificaram aumento na germinação dos conídios, quando comparado com a testemunha. O estímulo da germinação de esporos de *B. cinerea* pelo extrato etanólico de *Ottonia martiana* indica que este tipo de produto apresenta restrições de uso contra o mofo-cinzento. O estímulo pode ser explicado pela possibilidade de bioativos do extrato etanólico (EBEtOH) em estudo serem utilizadas como nutrientes pelo patógeno. Outra possibilidade está no fato deste fungo ser também saprófita podendo apresentar atividade de biotransformação dos compostos presentes no extrato conduzindo a inibição do efeito fungitóxico (MOREIRA, 2003). Este efeito estimulador da germinação de *B. cinerea* também foi verificado por Marques et al. (2002), com EBEtOH de folhas e botão floral de *Caryocar brasiliense* Camb.

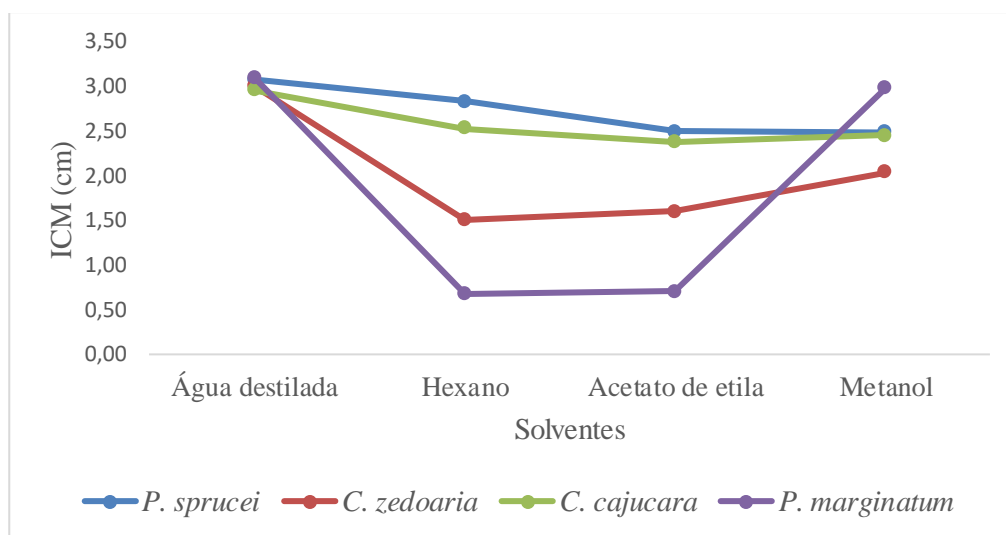
Borges et al. (2013) testando 61 extratos de plantas da flora nativa da região do Alto Rio Grande - Minas Gerais, e cinco óleos essenciais obtidos comercialmente sobre a germinação de urediniosporos de *Phakopsora pachyrhizi*, agente etiológico da ferrugem asiática da soja, determinaram que dois extratos vegetais apresentaram efeito estimulatório da germinação quando comparados com a testemunha, *Melissa officinalis* com 360 % de percentual de estímulo e *Urtica dióica* com estímulo um pouco menor, 155 %.

Não foi verificada diferença significativa entre as médias do ICM das frações de *C. zedoaria* quando comparadas à testemunha, que apresentaram valores de 1,5 cm para

a fração hexânica, 1,6 cm para a fração acetato-etílica e 2,04 cm para a fração metanólica, não sendo possível demonstrar a redução no crescimento micelial do patógeno. A inibição praticamente completa ocorreu nas frações hexânica e acetato-etílica de *P. marginatum*, sendo o ICM das mesmas iguais a 0,67 cm e 0,7 cm, respectivamente (FIGURA 19).

Este comportamento não foi semelhante dentro das frações de *C. cajucara* e de *P. sprucei* quando comparadas com a testemunha, ou seja, nessas frações nenhum efeito inibitório no crescimento do patógeno foi demonstrado pelo solvente.

Figura 19 - Efeito dos extratos de *Picrolemma sprucei*, *Curcuma zedoaria*, *Croton cajucara* e *Piper marginatum* a 5 mg.mL^{-1} , no índice de crescimento micelial (ICM) de *Corynespora cassiicola*, dez dias após a incubação



Fonte: A autora (2018).

Foi demonstrado no presente trabalho, que o crescimento micelial, esporulação e germinação das colônias de *C. cassiicola* se mostrou diferenciado com a adição dos extratos hexânico e acetato-etílico de *P. marginatum* ao meio de cultura, comparando-se com a testemunha (TABELA 7).

Por sua vez, a espécie *C. cajucara*, foi a que menos se expressou em relação a todas as variáveis, pois não teve um bom desempenho no crescimento micelial e promoveu alta esporulação e germinação de esporos. Esta espécie teve pouca influência sobre o desenvolvimento de *C. cassiicola*, especialmente em comparação ao efeito

antifúngico das frações hexânica e acetato-etilica de *P. marginatum*, que foram promissoras no controle do fitopatógeno.

A pouca eficiência desses extratos de plantas sobre o crescimento micelial de *C. cassiicola* pode ser atribuída a uma possível inadequação da dosagem testada (5 mg.mL⁻¹) para estas espécies, ou porque as mesmas não possuem compostos com ação fungitóxica frente ao fitopatógeno, o que é mais provável.

5.4 Cromatografia de camada delgada dos extratos de *Picrolemma sprucei*, *Curcuma zedoaria*, *Croton cajucara* e *Piper marginatum*.

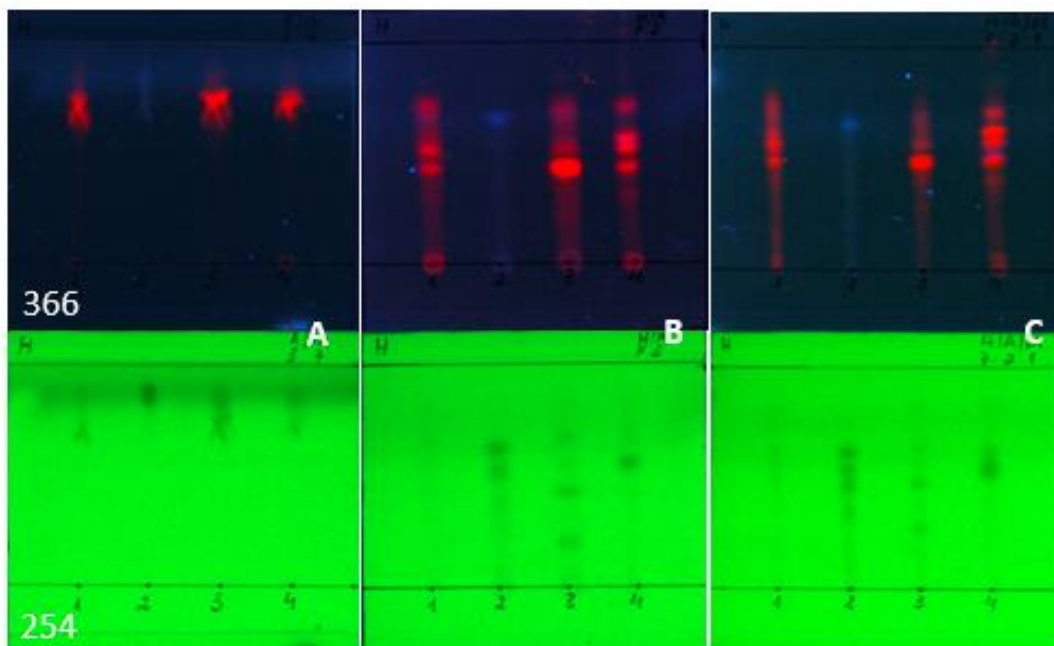
Para melhor ilustrar a técnica de CCD utilizada, a sequência empregada no spot das amostras foi sempre a mesma, enumeradas de 1 a 4 em todas as placas, que representam cada uma das quatro espécies. As Figuras de 20 a 23 apresentam o resultado das análises em CCD com todas as frações obtidas das folhas de *P. sprucei* (1), *C. cajucara* (3) e *P. marginatum* (4) e dos rizomas de *C. zedoaria* (2). Os aspectos considerados foram cor e altura dos Rf's após exame com luz UV 366 nm, pois dependendo da tonalidade predominante, a cor da imagem define o constituinte químico presente na amostra.

A Figura 20 apresenta o perfil cromatográfico das frações hexânicas testando três sistemas de eluição: AcoEt:MeOH 3:7; Hex: AcoEt 7:3 e Hex:AcoEt:MeOH 7:2:1. No sistema AcoEt:MeOH 3:7, os compostos das quatro espécies migraram marcadamente. Nas amostras 1 (Rf 0,79), 3 (Rf 0,80) e 4 (Rf 0,79), a coloração foi alaranjada. Na amostra 2, de *C. zedoaria* (Rf 0,92), foi observado um composto de fluorescência azulada, antes e depois da revelação com a vanilina, o que pode indicar a presença de compostos fenólicos. No sistema Hex: AcoEt 7:3 houve uma melhor distribuição das bandas, separando as possíveis moléculas. Na amostra 1, foram observadas 4 moléculas (Rf's variando de 0,46 a 0,75), na amostra 2 uma molécula (Rf 0,68), na amostra 3 três moléculas (Rf's variando de 0,46 a 0,73) e na amostra 4 quatro moléculas (Rf's de 0,35 a 0,74). A comparação da coloração indicou a presença da mesma cor nas amostras 1, 3 e 4. Um composto com coloração azul (Rf 0,92) foi detectado na amostra 2 (FIGURA 23).

No sistema Hex:AcoEt:MeOH 7:2:1 não foi possível separar bem as moléculas, devido à grande quantidade de compostos visíveis na luz ultravioleta, que permaneceram aglomerados. Foi constatado que o melhor sistema de eluição para a fração hexânica foi

o Hex: AcoEt 7:3. Os Rf's de cada um dos compostos, assim como suas colorações na luz ultravioleta (366 nm) após revelação com vanilina sulfúrica são encontrados na Tabela 8, separados por espécies de plantas.

Figura 20 - Cromatografia em camada delgada da fração hexânica das espécies *Picrolemma sprucei*, *Curcuma zedoaria*, *Croton cajucara* e *Piper marginatum* (de 1 a 4, respectivamente) em três sistemas de eluição: AcoEt:MeOH 3:7; Hex: AcoEt 7:3 e Hex:AcoEt:MeOH 7:2:1

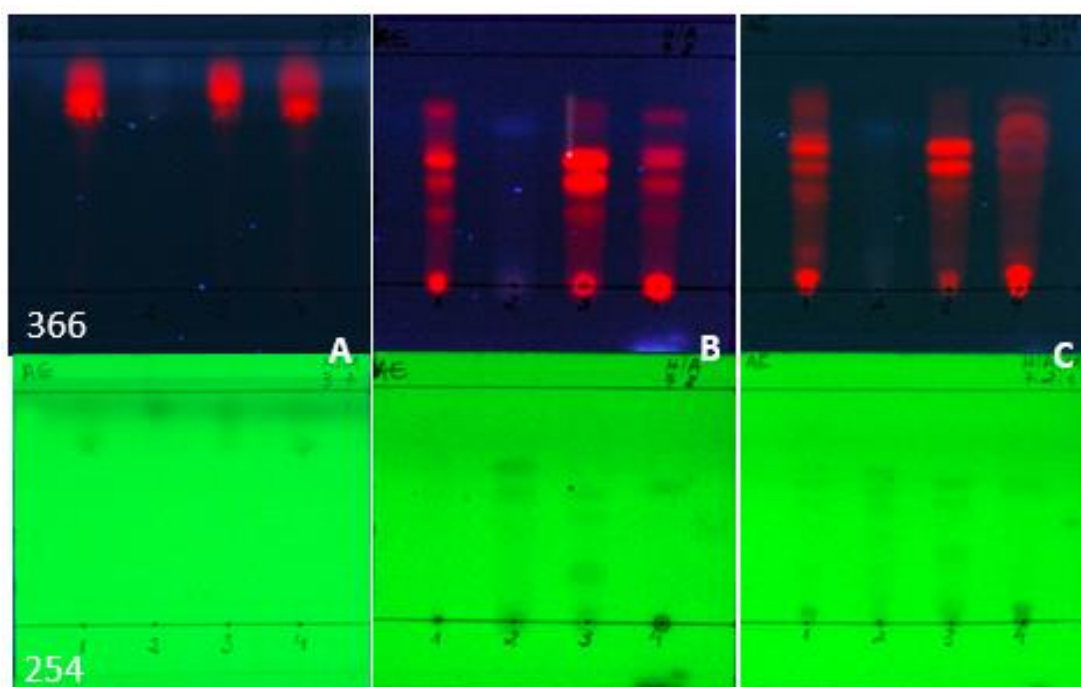


Fonte: A autora (2017).

A Figura 21 apresenta o perfil cromatográfico das frações acetato-etílicas testando três sistemas de eluição: AcoEt:MeOH 3:7; Hex: AcoEt 7:3 e Hex:AcoEt:MeOH 7:2:1. No sistema AcoEt:MeOH 3:7, os compostos migraram em todas as quatro espécies, bem mais do que as frações hexânicas anteriormente mencionadas. Nas amostras 1 (Rf 0,94), 3 (Rf 0,95) e 4 (Rf 0,95), a coloração foi alaranjada. Na amostra 2, de *C. zedoaria* (Rf 0,96), foi observado novamente um composto de fluorescência azulada, antes e depois da revelação com a vanilina. No sistema Hex:AcoEt:MeOH 7:2:1 houve uma melhor distribuição das bandas, separando bem as possíveis moléculas. Na amostra 1, foram observadas 5 moléculas (Rf's variando de 0,20 a 0,95), na amostra 2 uma molécula (Rf 0,71), na amostra 3 três moléculas (Rf's variando de 0,44 a 0,63) e na amostra 4 uma molécula (Rf 0,76). A comparação da coloração indicou a presença da mesma cor alaranjada nas amostras 1, 3 e 4. Um composto com coloração azul (Rf 0,71) foi detectado na amostra 2 (FIGURA 23).

No sistema Hex: AcoEt 7:3 não houve uma boa separação das moléculas em todas as amostras das espécies. O melhor sistema de eluição para a fração acetato-etílica foi o Hex:AcoEt:MeOH 7:2:1. Os Rf's de cada um dos compostos, assim como suas colorações na luz ultravioleta (366 nm) após revelação com vanilina sulfúrica são encontradas na Tabela 8, separados por espécies de plantas.

Figura 21 - Cromatografia em camada delgada da fração acetato-etílica das espécies *Picrolemma sprucei*, *Curcuma zedoaria*, *Croton cajucara* e *Piper marginatum* (de 1 a 4, respectivamente) em três sistemas de eluição: AcoEt:MeOH 3:7; Hex: AcoEt 7:3; Hex:AcoEt:MeOH 7:2:1

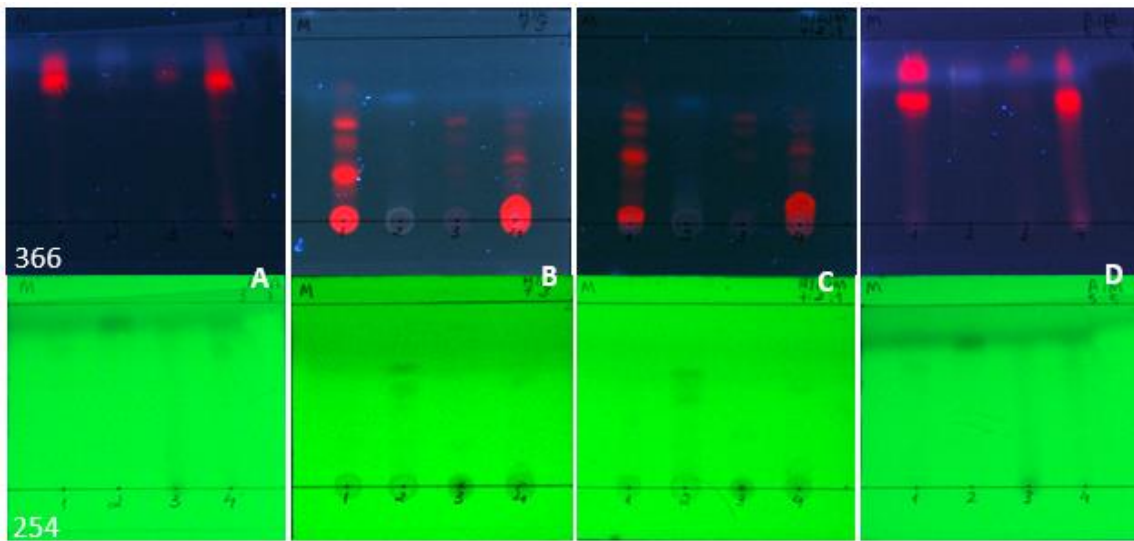


Fonte: A autora (2017).

A Figura 22 apresenta o perfil cromatográfico das frações metanólicas testando quatro sistemas de eluição: AcoEt:MeOH 3:7; Hex: AcoEt 7:3; Hex:AcoEt:MeOH 7:2:1 e AcoEt:MeOH 5:5. No sistema AcoEt:MeOH 3:7, os compostos migraram em todas as quatro espécies. Nas amostras 1 (Rf 0,79 e 0,88), 3 (Rf 0,82) e 4 (Rf 0,82), a coloração foi alaranjada. Na amostra 2, de *C. zedoaria* (Rf 0,92), observou-se novamente um composto de fluorescência azulada, antes e depois da revelação com a vanilina. No sistema Hex:AcoEt:MeOH 7:2:1 houve uma melhor distribuição das bandas, separando bem as possíveis moléculas. Na amostra 1, foram observadas 3 moléculas (Rf's variando de 0,41 a 0,63), na amostra 2 uma molécula (Rf 0,67), na amostra 3 uma molécula (Rf 0,60) e na amostra 4 uma molécula (Rf 0,45). A comparação da coloração indicou a presença da mesma cor alaranjada nas amostras 1, 3 e 4. Um composto com coloração azul (Rf 0,67) foi detectado na amostra 2 (FIGURA 23).

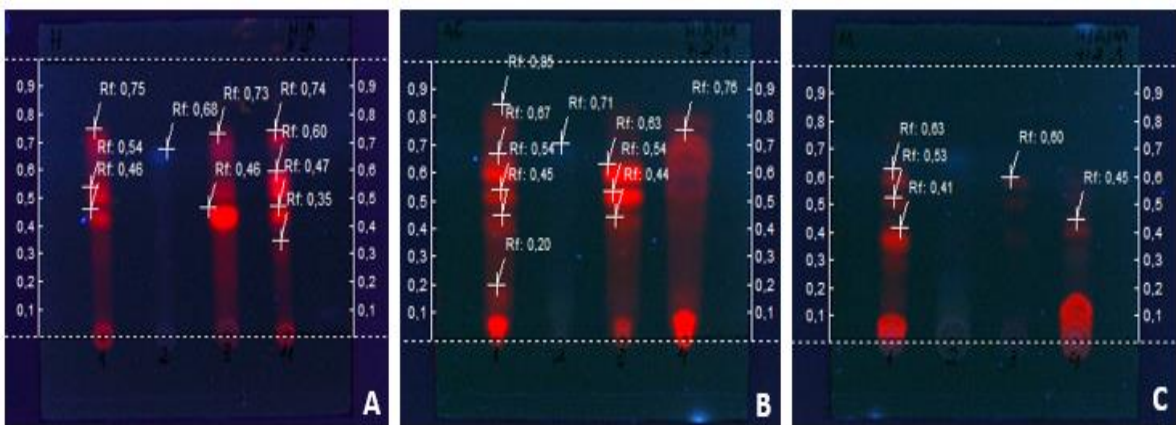
Nos sistemas Hex: AcoEt 7:3 e AcoEt:MeOH 5:5 não houve uma boa separação das moléculas em todas as amostras das espécies. Foi constatado que o melhor sistema de eluição para a fração acetato-etílica foi o Hex:AcoEt:MeOH 7:2:1. Os Rf's de cada um dos compostos, assim como suas colorações na luz ultravioleta (366 nm) após revelação com vanilina sulfúrica são encontradas na Tabela 8, separados por espécies de plantas.

Figura 22 - Cromatografia em camada delgada da fração metanólica das espécies *Picrolemma sprucei*, *Curcuma zedoaria*, *Croton cajucara* e *Piper marginatum* (de 1 a 4, respectivamente) em quatro sistemas de eluição: AcoEt:MeOH 3:7; Hex: AcoEt 7:3; Hex:AcoEt:MeOH 7:2:1 e AcoEt:MeOH 5:5



Fonte: A autora (2017).

Figura 23 - Representação dos Rf's dos três sistemas de eluição escolhidos para as frações hexânica (A), acetato-etílica (B) e metanólica (C)



Fonte: A autora (2017).

Tabela 8 - Rf's e colorações dos supostos compostos encontrados nas frações hexânica, acetato-etílica e metanólica das espécies estudadas, identificados na luz ultravioleta (366 nm) após revelação com vanilina sulfúrica

<i>Picrolemma sprucei</i>				
Fração	Sistemas	Moléculas	Rf's	Coloração
Hexânica	H7:A3	1	0,46	Alaranjada
		2	0,54	
		3	0,75	
	H7:A2:M1	1	0,52	
		2	0,63	
		3	0,82	
A3:M7	1	0,79		
Acetato-etílica	H7:A3	1	0,34	
		2	0,48	
		3	0,61	
		4	0,81	
	H7:A2:M1	1	0,2	
		2	0,45	
		3	0,54	
		4	0,67	
	A3:M7	1	0,94	
		5	0,85	
Metanólica	H7:A3	1	0,3	
		2	0,47	
		3	0,56	
	H7:A2:M1	1	0,41	
		2	0,53	
		3	0,63	
	A3:M7	1	0,79	
		2	0,88	
	A5:M5	1	0,71	
		2	0,92	

<i>Piper marginatum</i>					
Fração	Sistemas	Moléculas	Rf's	Coloração	
Hexânica	H7:A3	1	0,35	Alaranjada	
		2	0,47		
		3	0,6		
		4	0,74		
	H7:A2:M1	1	0,53		
		2	0,66		
		3	0,75		
	A3:M7	1	0,79		
	Acetato-etílica	H7:A3	1		0,34
			2		0,48
3			0,61		
4			0,76		
H7:A2:M1		1	0,76		
A3:M7		1	0,95		
Metanólica	H7:A3	1	0,37		
		2	0,55		
	H7:A2:M1	1	0,45		
	A3:M7	1	0,82		
	A5:M5	1	0,72		
		2	0,92		

<i>Curcuma zedoaria</i>				
Fração	Sistemas	Moléculas	Rf's	Coloração
Hexânica	H7:A3	1	0,68	Azul
	H7:A2:M1	1	0,7	
		A3:M7	1	
Acetato-etílica	H7:A3	1	0,73	
	H7:A2:M1	1	0,71	
	A3:M7	1	0,96	
Metanólica	H7:A3	1	0,69	
	H7:A2:M1	1	0,67	
	A3:M7	1	0,92	
	A5:M5	1	0,85	

<i>Croton cajucara</i>				
Fração	Sistemas	Moléculas	Rf's	Coloração
Hexânica	H7:A3	1	0,46	Alaranjada
		2	0,6	
		3	0,73	
	H7:A2:M1	1	0,52	
Acetato-etílica	H7:A3	1	0,36	
		2	0,49	
		3	0,61	
		4	0,82	
	H7:A2:M1	1	0,44	
		2	0,54	
		3	0,63	
Metanólica	A3:M7	1	0,95	
	H7:A3	1	0,57	
	H7:A2:M1	1	0,6	
	A3:M7	1	0,82	
A5:M5	1	0,91		

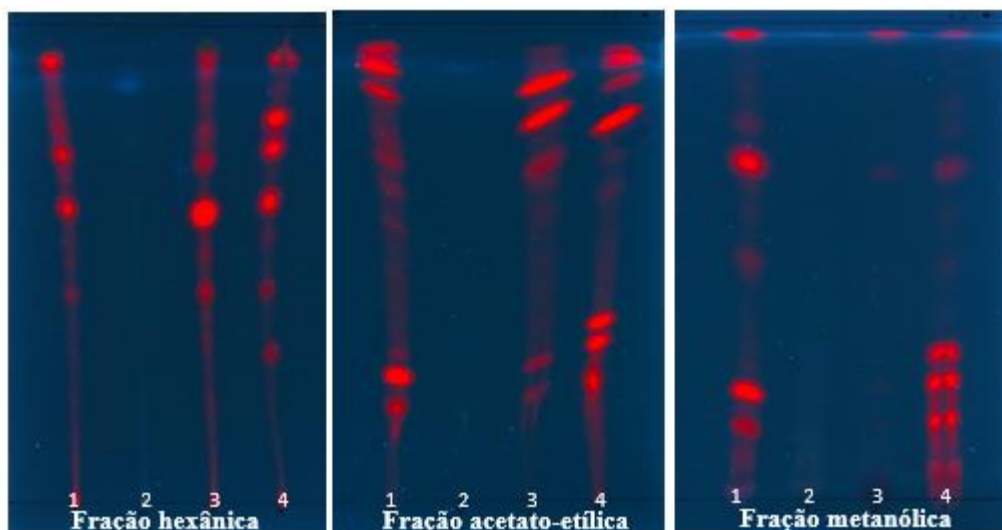
Fonte: A autora (2018).

5.4 Ensaio bioautográfico.

Entre todos os métodos bioautográficos, o mais amplamente aplicado é a bioautografia direta. O princípio deste método é que uma placa de CCD é mergulhada em uma suspensão de micro-organismos crescendo em meio apropriado e depois incubada em uma atmosfera úmida. Uma superfície de sílica da placa de CCD coberta com o meio de cultura torna-se uma fonte de nutrientes e permite o crescimento dos micro-organismos diretamente sobre ele. No entanto, nos locais onde os agentes antimicrobianos foram manchados, as zonas de inibição do crescimento do micro-organismo são formadas. A visualização dessas zonas é geralmente realizada utilizando reagentes de detecção de atividade da desidrogenase; os mais comuns são os sais de tetrazólio. A desidrogenase de micro-organismos vivos converte o sal de tetrazólio em formazano intensamente colorido. Como resultado, manchas brancas de creme aparecem contra um fundo roxo na superfície da placa de TLC, apontando a presença de agentes antibacterianos (CHOMA e GRZELAK, 2011).

As frações das quatro espécies vegetais estudadas foram submetidas à cromatografia e, em seguida, à bioautografia (FIGURA 24).

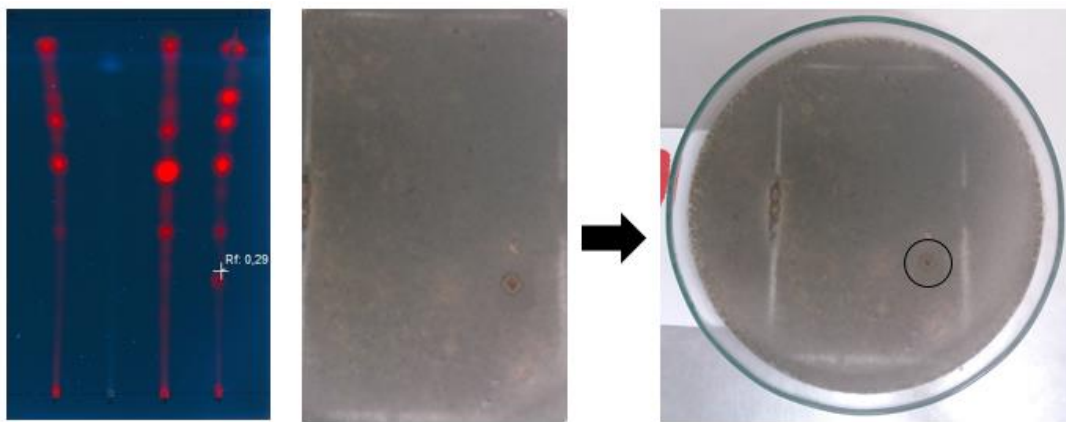
Figura 24 - Placas de CCD grandes reveladas em luz UV de 366 nm que serviram de controle para o ensaio bioautográfico



Fonte: A autora (2017).

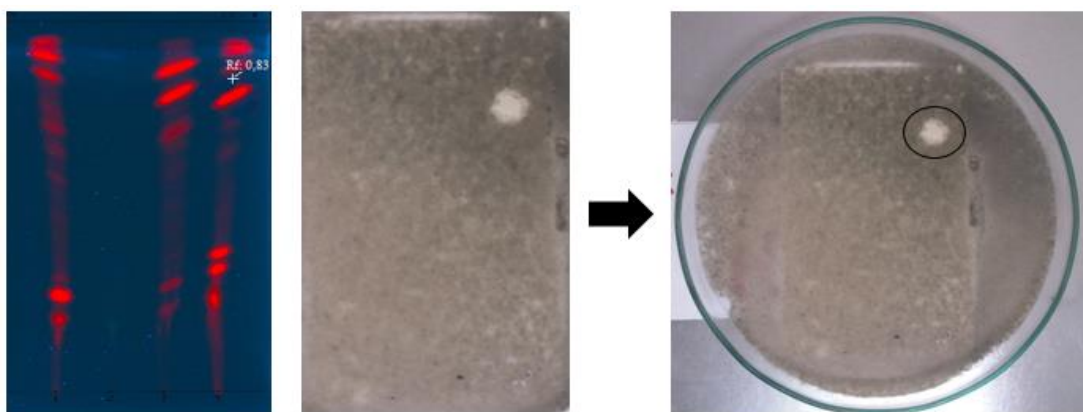
Zonas de leve inibição na esporulação de *C. cassicola* foram observadas no Rf de 0,29 da fração hexânica (FIGURA 25) e no Rf 0,83 da fração acetato-etílica de *P. marginatum* (FIGURA 26), respectivamente. Este resultado é importante, pois corrobora com a possibilidade de obtenção de novas substâncias, o que justificaria a atividade antifúngica destas frações. No caso da fração metanólica, nenhuma zona de inibição foi detectada no bioautograma (FIGURA 27).

Figura 25 - Bioautografia da fração hexânica de *Picrolemma sprucei*, *Curcuma zedoaria*, *Croton cajucara* e *Piper marginatum*



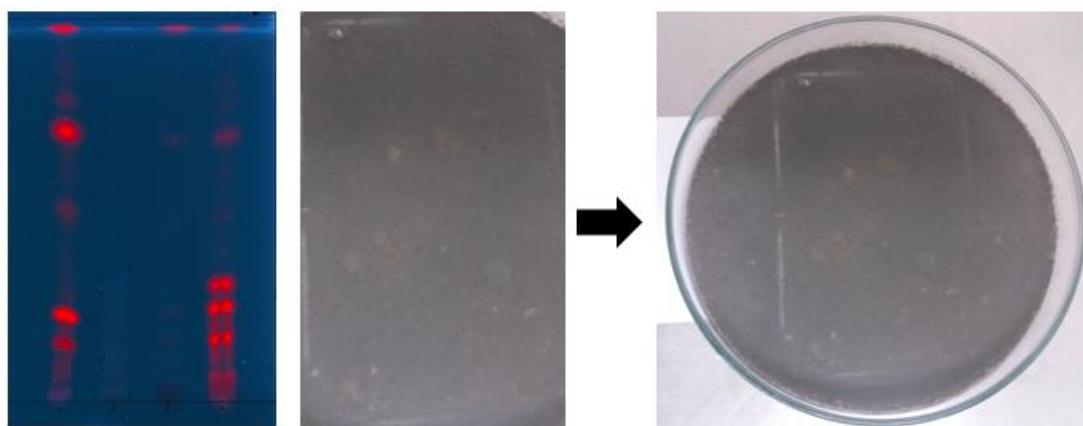
Fonte: A autora (2017).

Figura 26 - Bioautografia da fração acetato-etílica de *Picrolemma sprucei*, *Curcuma zedoaria*, *Croton cajucara* e *Piper marginatum*



Fonte: A autora (2017).

Figura 27 - Bioautografia da fração metanólica de *Picrolemma sprucei*, *Curcuma zedoaria*, *Croton cajucara* e *Piper marginatum*



Fonte: A autora (2017).

A bioautografia direta de CCD é útil para a triagem química e biológica rápida de extratos de plantas. Uma vez que uma atividade foi localizada na placa de CCD, a amostra pode ser analisada por cromatografia líquida - espectrometria de massa para estabelecer se conhecidos ou novos compostos e/ou classes de substância estão envolvidos. Esta estratégia de triagem diz respeito à detecção rápida de compostos antibacterianos e antifúngicos (DEWANJEE, 2015).

O perfil fitoquímico das espécies de *Piper* apresenta-se muito diversificado, sendo isolados compostos pertencentes às mais diferentes classes de metabólitos secundários (PARMAR et al., 1997). O número de metabólitos isolados pertencentes à classe dos alcalóides e amidas são os mais representativos da espécie, seguido de lignanas e neolignanas, terpenos, propenilfenóis, pironas, cromenos e derivados de ácidos benzóicos (NAVICKIENE et al., 2000).

Investigações anteriores realizadas com outras espécies do gênero *Piper*, relatam que dentre os componentes majoritários presentes no óleo essencial de *Piper* sp., os compostos Epatulenol e E-nerolidol, assim como o composto β -elemeno, estão presentes na composição química do óleo essencial da *Piper malacophyllum*. O óleo essencial desta espécie, assim como outros óleos de diferentes espécies deste gênero, tem apresentado significativa atividade contra diversos micro-organismos, dentre eles bactérias, fungos e protozoário (SANTOS et al., 2012).

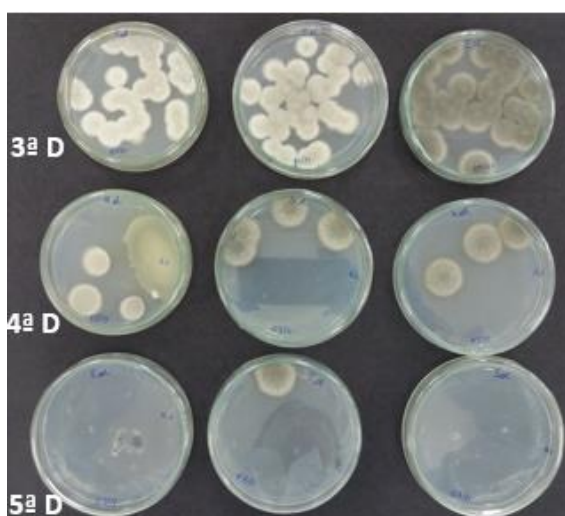
Outras espécies do gênero *Piper*, como a *P. tuberculatum*, *P. arboreum* e *P. caldense*, também apresentam óleos essenciais com composição química bastante semelhante à composição do óleo de *Piper* sp, destacando a presença dos compostos Bicyclogermacreno e γ -Muuroleno, responsáveis pela atividade tóxica contra o ácaro *Tetranychus urticae* (POTZERNHEIM et al., 2006; ARAÚJO, 2011).

Embora tenha se evidenciado zonas de inibição nas bioautografias, não foi possível prosseguir com o estudo e fazer a raspagem das zonas de inibição, ou seja, fazer o isolamento de tais substâncias fungitóxicas, devido o projeto encontrar-se em prazo limite para o seu término. Assim, trabalhos futuros devem ser realizados para tentar chegar à identificação das respectivas substâncias, e comparar os dados dos espectros de massas juntamente com os descritos na literatura.

5. 5 Determinação do número de conídios presentes na suspensão original para bioautografia.

A contagem de colônias foi feita a partir da observação das placas e contagem manual das colônias crescidas e quantificação da diluição original (FIGURA 28), ou seja, quantos conídios ou esporos haviam na suspensão original. O número de conídios presentes na suspensão original foi igual ao número de colônias multiplicado pelo fator de diluição, conforme descrito na Tabela 9.

Figura 28 - Diluição seriada da suspensão de esporos utilizada na bioautografia



Fonte: A autora (2018).

Tabela 9 - Número de conídios presentes na suspensão utilizada na bioautografia

Número de conídios em suspensão					
Diluição	1ª Repetição	2ª Repetição	3ª Repetição	Média	Conídios/mL
10 ⁻³	29	32	28	29,67	29,67 x 10 ³ = 29.670
10 ⁻⁴	4	3	3	3,33	3,33 x 10 ⁴ = 33.300
10 ⁻⁵	0	1	0	0,33	0,33 x 10 ⁵ = 3,33 x 10 ⁴ = 33.000

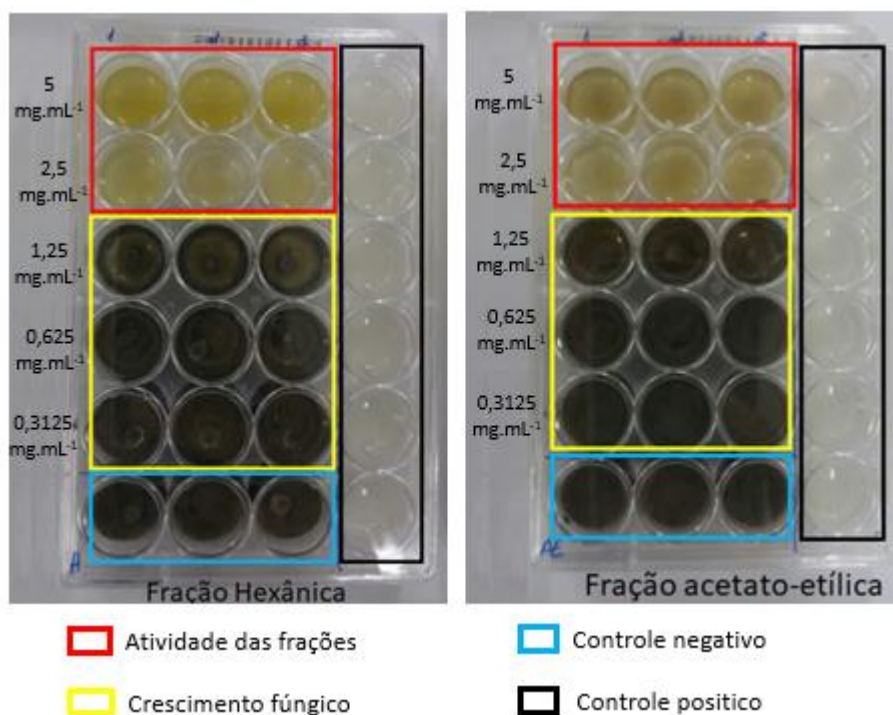
Fonte: A autora (2018).

5.6 Determinação da concentração mínima inibitória das frações hexânica e acetato-etílica de *Piper marginatum*.

Vários métodos são utilizados para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos e dos óleos vegetais. Neste estudo, o método escolhido foi o de microdiluição, por apresentar-se como uma técnica simples, de baixo custo, alta reprodutibilidade e possibilitando a utilização de pequenas quantidades de meio de cultura e muitas cepas fúngicas (OSTROSKY, 2008). Para as frações de *P. marginatum* a CIM foi definida como a menor concentração do agente antifúngico capaz de inibir o crescimento total do patógeno *C. cassicola*.

A Figura 29 apresenta a atividade antifúngica das frações hexânica e acetato-etílica de *P. marginatum*, cujos resultados foram determinados visualmente, de acordo com a turbidez provocada pelo crescimento do patógeno nos poços da microplaca. Pode-se observar que as duas frações, nas concentrações de 5 e 2,5 mg.mL⁻¹, inibem o crescimento de *C. cassicola*, verificando-se comportamento semelhante ao do fungicida utilizado como controle positivo na última coluna das placas de cultura de células.

Figura 29 - Concentração inibitória mínima das frações hexânica e acetato-etílica de *Piper marginatum*



Fonte: A autora (2017).

Na literatura não há uma classificação consensual sobre os valores de CIM. Aligiannis et al. (2001) apresentaram a seguinte classificação: CIM até 0,5 mg.mL⁻¹ são inibidores potentes; CIM entre 0,6 e 1,5 mg.mL⁻¹ são inibidores moderados; CIM acima de 1,6 mg.mL⁻¹ são inibidores fracos. Enquanto Webster et al. (2008) propuseram um valor de CIM satisfatório entre 1000 µg.mL⁻¹ ou menos. Seguindo as duas classificações, as frações hexânica e acetato-etílica de *P. marginatum* são inibidoras fracas, pois a menor concentração testada responsável pela inibição do crescimento de *C. cassicola* nos ensaios de CIM foi de 2500 µg.mL⁻¹, para as duas frações.

As variações referentes à determinação da CIM de extratos de plantas podem ser atribuídas a vários fatores. Dentre eles pode-se citar a técnica aplicada, o micro-organismo e a cepa utilizada no teste, a origem da planta, a época da coleta, se os extratos foram preparados a partir de plantas frescas ou secas e a quantidade de extrato testada. Assim, não existe método padronizado para expressar os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais.

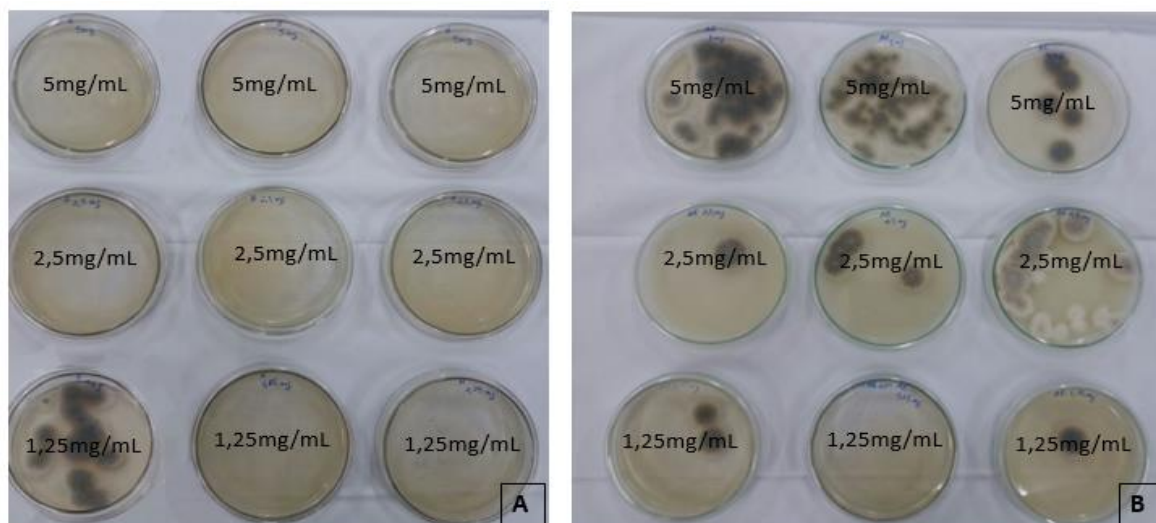
Duarte et al. (2004) com o objetivo de estudar a atividade antimicrobiana de extratos de 45 plantas medicinais, determinou através da concentração inibitória mínima (CIM) de até $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ que *P. marginatum* apresentou forte atividade bactericida contra *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*, que são bactérias Gram positivas de interesse médico, o que não é o objetivo deste trabalho. Vale ressaltar que quando o vegetal está seco, seus metabólitos fixos estão concentrados, enquanto que os óleos essenciais podem ter diminuído sua concentração devido a sua volatilidade. As frações que apresentaram resultados foram as hexânica e acetato-etílica o que indica serem apolares e de baixo peso molecular, porém a determinação destas moléculas ainda é desconhecida e como está em mistura nas frações não podemos precisar a quantidade, por isso a CIM pode ser bem maior que a encontrada para a fração.

5.7 Determinação da concentração fungicida mínima das frações hexânica e acetato-etílica de *Piper marginatum*.

Passados 10 dias do ensaio anterior, foram retirados 20 uL dos poços correspondentes às concentrações de 5 mg.mL^{-1} , $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $1,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ para verificar se a inibição do crescimento do patógeno anteriormente apresentada no ensaio da CIM teria efeito fungicida ou fungistático frente a *C. cassicola*.

A fração hexânica de *P. marginatum* apresentou atividade fungicida nas dosagens de 5 mg.mL^{-1} e de $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ (FIGURA 30A). Nenhuma das dosagens da fração acetato-etílica apresentou atividade fungicida, mas fungistática, pois o patógeno voltou a crescer no meio de cultura após três dias, em todas as concentrações (FIGURA 30B). Dessa forma, considera-se que a ação antifúngica da fração hexânica de *P. marginatum* foi, nas duas primeiras dosagens testadas, satisfatória; visto que, utilizando-se até $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ da substância teste, obteve-se valor de inibição efetivo.

Figura 30 – Determinação da concentração fungicida mínima da fração hexânica de *Piper marginatum* (A) e determinação da concentração fungistática mínima da fração acetato-etílica de *Piper marginatum* (B)



Fonte: A autora (2018).

Sánchez et al. (2012) estabeleceram o efeito bactericida do óleo de *Piper marginatum* Jacq. contra *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dawson e observaram que os compostos oxigenados, principalmente a mistura de isosafrol e notosminol, são os responsáveis por este efeito, sendo que o óleo apresentou uma forte atividade antibacteriana com concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) de $0,12 \text{ mg.mL}^{-1}$. Há possibilidades de desenvolvimento de óleo essencial de *P. marginatum* como um agente antibacteriano para controlar *X. albilineans* considerando a sua atividade bactericida contra esta bactéria fitopatogena importante, agente causal da escaldadura das folhas de cana-de-açúcar.

O interesse pela busca de novas substâncias ativas naturais é tendência atual, aliado ao desejo do consumidor em adquirir produtos com apelo natural. Muitos compostos aromáticos são atualmente obtidos sinteticamente, por razões econômicas ou por dificuldade na obtenção das plantas produtoras. Contudo, a busca pelos princípios ativos naturais tem feito crescer a demanda pelos produtos originais obtidos diretamente das plantas. Além do mais, há dificuldades para que os aromas sintéticos se aproximem com perfeição dos aromas naturais.

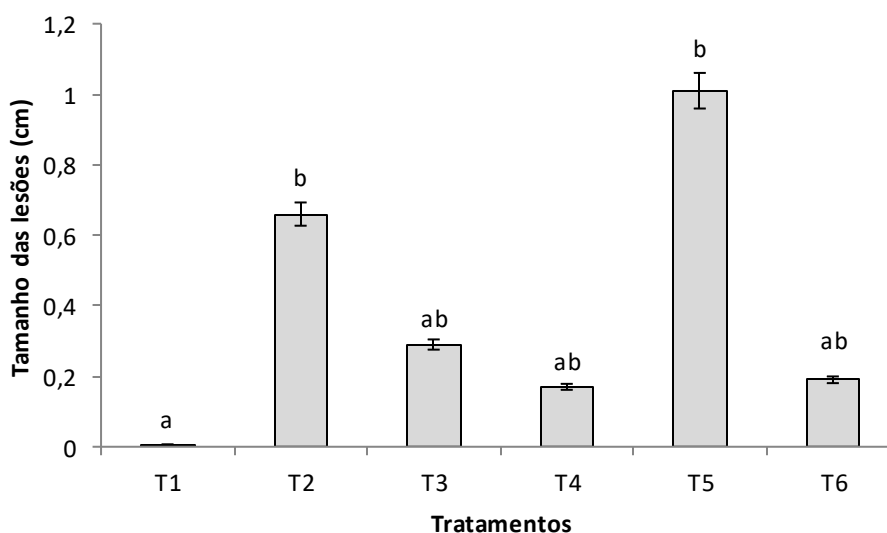
5.6 Avaliação do efeito do extrato bruto de *Piper marginatum* no controle da mancha-alvo em tomateiro em casa de vegetação.

Foi observada diferença significativa nas variáveis maior lesão (ML), número de lesões (NL), altura de plantas (AP), número de folhas (NF), peso da matéria seca de folhas

(PMSF), peso da matéria seca de raízes (PMSR), peso da matéria fresca de folhas (PMFF), peso da matéria fresca de raízes (PMFR), quando se aplicaram os diferentes tratamentos em casa de vegetação. A única variável que não indicou diferença significativa foi o comprimento da raiz (CR).

Em relação ao controle de *C. cassicola* em folhas de tomateiro foi observado que os tratamentos T3, T4 e T6 exerceram efeito positivo na inibição do tamanho das lesões do patógeno sobre as folhas, com valores de 0,29 cm, 0,17 cm e 0,19 cm, respectivamente, não diferindo estatisticamente da testemunha não inoculada com o patógeno (T1), que obteve 0,006 cm como média da maior lesão. O tratamento T5, que representa a aplicação do extrato bruto de *P. marginatum* semanalmente após a inoculação com o fitopatógeno, foi o que apresentou o maior tamanho da lesão (1,01 cm), equiparando-se ao T2 (0,66 cm), testemunha inoculada apenas com o fitopatógeno. Portanto, o tratamento T5 não é considerado eficiente no controle de *C. cassicola*, pois não houve diferença significativa quando comparado a T2 (FIGURA 31).

Figura 31 - Tamanho da maior lesão da macha-alvo em folhas de tomateiro. Médias com as mesmas letras nas colunas não diferem significativamente pelo teste de Kruskal-Wallis. As barras verticais correspondem ao erro de 5 %



Fonte: A autora (2018).

Nota: T1 = Testemunha não inoculada com o fitopatógeno, T2 = Testemunha inoculada com o fitopatógeno, T3 = Extrato aquoso de *P. marginatum* aplicado uma única vez, 48 h antes da inoculação com o fitopatógeno, T4 = Extrato aquoso de *P. marginatum* aplicado uma única vez, 48 h após a inoculação com o fitopatógeno, T5 = Extrato aquoso de *P. marginatum* aplicado semanalmente após a inoculação com o fitopatógeno e T6 = Fungicida Impact 125 SC aplicado semanalmente após a inoculação com o fitopatógeno.

Quanto à variável número de lesões (NL), o tratamento T2 (testemunha inoculada apenas com o fitopatógeno) foi o que apresentou o maior valor, com uma média de 477 lesões, sendo considerado o tratamento que causou 100 % de dano nas plantas de tomate (= 0 % de controle), para que os dados pudessem ser expressos em porcentagem.

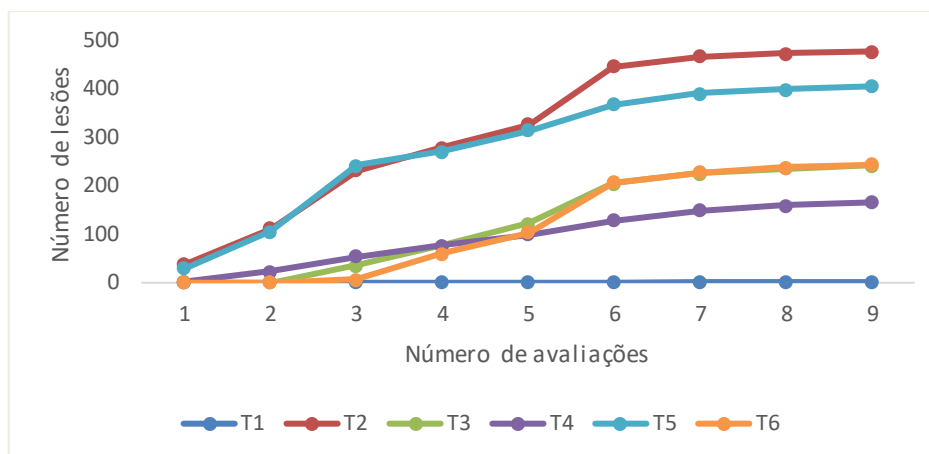
O extrato bruto aquoso de *P. marginatum* quando aplicado uma única vez 48 h antes da inoculação com o fitopatógeno (T3), reduziu em 49 % o número de lesões, não diferindo estatisticamente do tratamento T6 com fungicida Impact. Quando aplicado uma única vez, 48 h após a inoculação com o fitopatógeno (T4), reduziu em 66 % o número de lesões, sugerindo potencial para o controle da mancha-alvo.

Embora o extrato bruto aquoso de *P. marginatum* tenha proporcionado controle no crescimento micelial de *C. cassiicola in vitro*, não apresentou a mesma eficiência quando aplicado semanalmente nas plantas de tomate após a inoculação com *C. cassiicola* (T5), apresentando apenas 15 % de eficiência no controle da doença.

Portanto, a aplicação do extrato bruto aquoso de *P. marginatum* demonstrou ser mais eficiente quando aplicado uma única vez, 48 h após a inoculação com o fitopatógeno. Em aplicações semanais foi observado o aumento no número de lesões (T5) ao longo dos dias de avaliação, possivelmente devido ao acúmulo de moléculas presentes no extrato e à ocorrência de interação negativa entre estas e sítios receptores na planta, que podem levar a inibição da expressão de respostas de defesa da planta.

Isto sugere que o extrato bruto aquoso pode ser usado como alternativa ao controle de *C. cassiicola* integrando-se a outras práticas de campo, minimizando a utilização de agrotóxicos, e até mesmo a quantidade de extrato bruto (FIGURA 32).

Figura 32 - Curvas de progresso da doença baseado no número de lesões



Fonte: A autora (2018).

Nota: T1 = Testemunha não inoculada com o fitopatógeno, T2 = Testemunha inoculada com o fitopatógeno, T3 = Extrato aquoso de *P. marginatum* aplicado uma única vez, 48 h antes da inoculação com o fitopatógeno, T4 = Extrato aquoso de *P. marginatum* aplicado uma única vez, 48 h após a inoculação com o fitopatógeno, T5 = Extrato aquoso de *P. marginatum* aplicado semanalmente após a inoculação com o fitopatógeno e T6 = Fungicida Impact 125 SC aplicado semanalmente após a inoculação com o fitopatógeno.

As diferenças observadas no número de lesões nas folhas podem ter ocorrido por atividade antimicrobiana direta do extrato bruto de *P. marginatum*, já que *in vitro*, na concentração de 50 % foi capaz de inibir em 15 % o crescimento micelial do patógeno e em 59,33 % a germinação de esporos de *C. cassiicola*. De qualquer forma, os resultados aqui obtidos podem ser enquadrados no conceito de controle alternativo de doenças, o qual envolve o uso de produtos com atividade antimicrobiana direta e/ou indutora de resistência (SCHWAN-ESTRADA et al., 2003).

Na literatura, há trabalhos verificando o potencial de diversos extratos de plantas no controle de várias doenças no tomateiro, mas não há nenhum relato sobre o uso de *P. marginatum* no controle de *C. cassiicola*. Ainda assim, a grande maioria relata os obtidos em ensaios *in vitro*, sendo escassos aqueles realizados em condições de casa de vegetação ou campo.

Os ensaios *in vitro* servem para uma avaliação prévia do efeito de caldas e extratos sobre os agentes patogênicos. Entretanto, a eficácia destes no controle das doenças causadas pelos respectivos agentes somente pode ser aferida em testes em condições de campo ou de estufa. Nestas condições, são inseridos outros componentes do

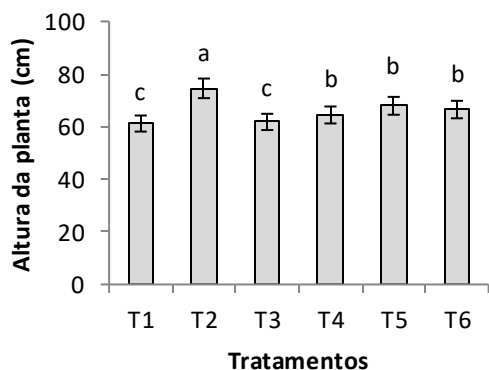
sistema como a interação planta x patógeno e o efeito do ambiente que podem afetar a resposta do patógeno, a reação da hospedeira e a própria ação do produto. Os extratos vegetais, por exemplo, produzem compostos voláteis que podem estimular ou inibir a germinação ou o crescimento de micro-organismos, ou desencadear alterações no desenvolvimento das plantas (FRENCH, 1992).

A aplicação de caldas e de extratos de plantas é uma das poucas estratégias curativas permitidas pela legislação para a agricultura orgânica. No entanto, como muitas vezes tem o seu preparo caseiro, ou sem a observação de protocolos na preparação, podem existir variações.

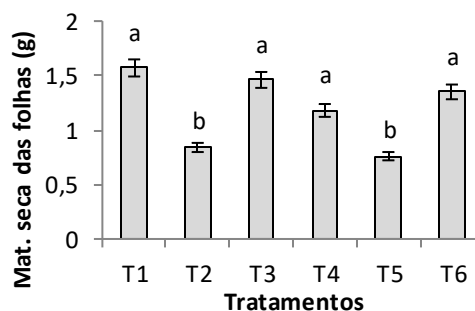
Apesar de se observar diferença significativa na maioria das variáveis avaliadas, o que poderia representar indícios de promoção de crescimento, não se obteve incremento na variável comprimento da raiz que foi não significativo.

Um fato curioso foi que o controle sem aplicação do extrato bruto (T2), na variável AP, em que se esperava a inibição no crescimento das plantas por ser o tratamento que foi inoculado apenas com o patógeno, foi o que apresentou a maior altura das plantas (AP) e o menor peso da matéria seca das folhas (PMSF). Por isso, optou-se por não discutir sobre estas variáveis coletadas, por entender que, nas condições avaliadas, não houve efeito curativo nos tomateiros infectados com o patógeno, tampouco desenvolvimento das plantas de tomate, podendo os resultados serem reflexo das condições de crescimento das plantas em casa de vegetação (FIGURA 33).

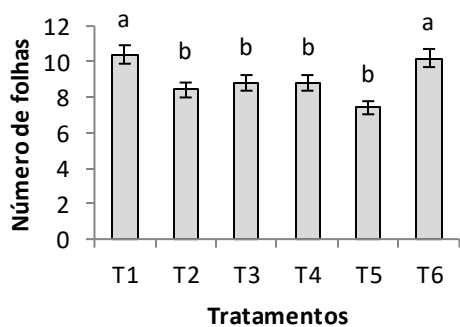
Figura 33 - Variáveis não incluídas na discussão dos resultados em casa de vegetação



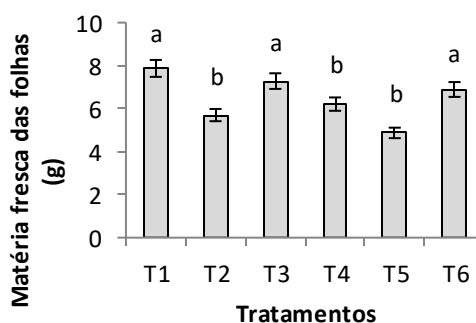
Médias com as mesmas letras nas colunas não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott. Média Geral = 66,06. (CV%) = 5,62



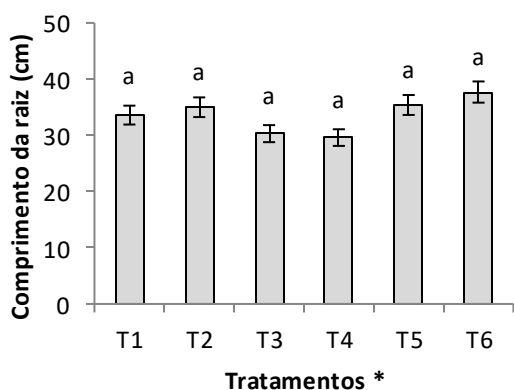
Médias com as mesmas letras nas colunas não diferem significativamente pelo teste Scott-Knott. Média geral = 1,19. (CV%) = 24,13



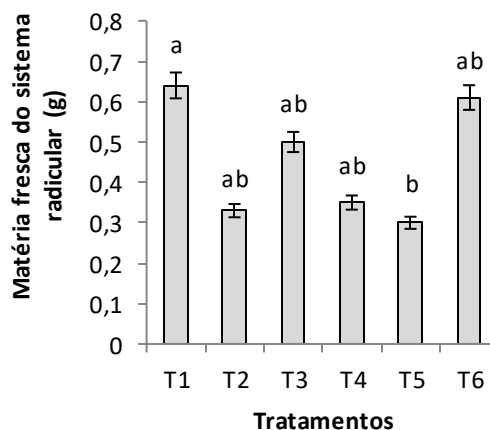
Médias com as mesmas letras nas colunas não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%. Média Geral = 9. (CV%) = 15,71



Médias com as mesmas letras nas colunas não diferem significativamente pelo teste Scott-Knott. Média Geral = 6,47. (CV%) = 20,36

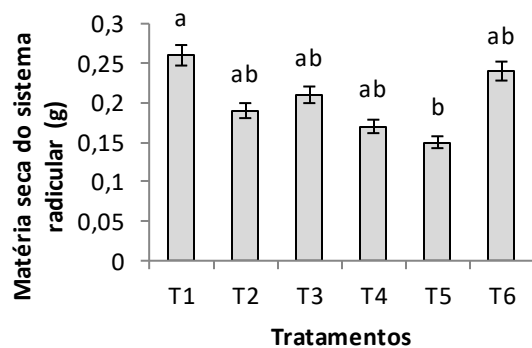


Médias com as mesmas letras nas colunas não diferem significativamente pelo teste Scott-Knott Média Geral = 33,60. (CV%) = 19,47. *ns



Médias com as mesmas letras nas colunas não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5%. Média Geral = 0,45 (CV%) = 37,20

Figura 33 (continuação) - Variáveis não incluídas na discussão dos resultados em casa de vegetação



Médias com as mesmas letras nas colunas não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5 %. Média geral = 0,20. (CV%) = 22,65

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos pelo método de culturas pareadas selecionou dois isolados endofíticos promissores na inibição do crescimento micelial de *C. cassiicola*, 3012 R1 e 3031 R2, pertencentes à Ordem *Agaricales* sp. e Gênero *Phomopsis* sp., respectivamente, que apresentaram forte ação antagônica contra o fitopatógeno.

As porcentagens de inibição do crescimento micelial (PIC) e da esporulação (PIE), através da análise de regressão das concentrações dos extratos brutos de *P. sprucei*, *C. zedoaria*, *C. cajucara* e *P. marginatum*, se mostraram significativas apenas para *P. sprucei*, a qual obteve o valor de 8,5 % para a PIC na concentração de 50 % e 65,33 % para a PIE na concentração de 30 %, demonstrando que pode haver nestas concentrações substâncias antagônicas suficientes para inibir o crescimento e a esporulação do patógeno, que sugere seu potencial no controle biológico de *C. cassiicola*, indicando, portanto, boas perspectivas para uso experimental de extratos vegetais. A porcentagem de inibição da germinação (PIG) mostrou ser significativa para todos os extratos brutos, exceto para *C. zedoaria*, que obteve valores para a PIG próximos a zero nas concentrações de 30, 40 e 50 %.

As frações hexânica e acetato-etílica de *P. marginatum* inibiram quase que totalmente o crescimento micelial de *C. cassiicola*, sendo responsáveis também pelas maiores porcentagens de PIC, PIE e PIG, tendo suas concentrações inibitórias mínimas (CIM's) definidas em 2,5 mg.mL⁻¹, com ação fungicida para a fração hexânica e fungistática para a fração acetato-etílica.

O potencial antifúngico das frações hexânica, acetato-etílica e metanólica sobre o desenvolvimento do fitopatógeno *C. cassiicola* foi investigado por bioautografia, o que permitiu inferir a existência de duas substâncias, uma na fração hexânica (Rf 0,29) e outra na fração acetato-etílica (Rf 0,83), que houve inibição na esporulação do fungo, através do clareamento nestas zonas.

Sugere-se a ampliação dos estudos principalmente com testes *in vivo* como apoio para testar a aplicabilidade dos extratos brutos e fracionados como prováveis defensivos agrícolas naturais, tendo em vista que o experimento em casa de vegetação teve seus resultados comprometidos devido às condições de crescimento das plantas de tomate.

REFERÊNCIAS

- ABABOUCHE, L. H. et al. Inhibition of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells by fatty acids and glyceryl monododecanoate. **Food Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 327-336, 1994.
- ALBERNAZ, L. C. et al. Investigation of plant extracts in traditional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts. **Journal of ethnopharmacology**, v. 131, n. 1, p. 116-121, 2010.
- ALFENAS, A. C. et al. Isolamento de fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (Ed.). Métodos em fitopatologia. Viçosa, MG: **Editora da UFV**, Cap. 2. p. 53-90, 2007.
- ALIGIANNIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 4168-4170, 2001.
- ALVES, M. L. B. et al. Ocorrência de *Corynespora cassiicola* em caráter epidêmico em tomates de Manaus. **Fitopatologia Brasileira**, v. 10, p. 229, 1985.
- AMORIM, L. et al. Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. **São Paulo**, 2011.
- ANDRADE, E. H. A. et al. Variability in Essential-Oil Composition of *Piper marginatum* sensu lato. **Chemistry & biodiversity**, v. 5, 1, p. 197-208, 2008.
- ANDRADE, W. P.; VIEIRA, G.H.C. Efeito dos óleos essenciais sobre a antracnose *in vitro* e em frutos de mamoeiro. **Revista Brasileira de Plantas Medicináveis**, v. 18, n. A00101s1, p. 367-372, 2016.
- ARAÚJO, E. R. et al. Extracts of *Piper marginatum* and *Azadirachta indica* for the control of *Colletotrichum scovillei* in bell pepper. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 2, p. 88-94, 2014.
- ARAÚJO, I.B. et al. Efeito do extrato de alga e da argila silicatada na severidade da alternariose e na produtividade da cebolinha comum (*Allium fistulosum* L.). **Tropical Plant Pathology**, v. 37, n. 5, p. 363-367, 2012.
- ARAÚJO, M. J. C. et al. Potencial acaricida de óleos essenciais de espécies do gênero *Piper* sobre o ácaro rajado *Tetranychus urticae* Koch (Acari: *Tetranychidae*). **Dissertação de Mestrado** – UFRPE. 2011.
- ARAÚJO, W. L. et al. Guia prático: Isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos. Piracicaba: **Calo**, v. 167, 2010.
- ATANDA, O. O. et al. The potential of some spice essential oils in the control of *A. parasiticus* CFR 223 and aflatoxin production. **Food control**, v. 18, n. 5, p. 601-607, 2007.
- BALBI-PENÑA, M. I. et al. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina-II. Avaliação *in vivo*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 4, p. 401-404, 2006.
- BANDEIRA, R. A.; LIMA, R. A. Efeito do Extrato Etanólico dos Frutos de *Solanum grandiflorum* RUIZ sobre *Fusarium oxysporum* KÜHN *in vitro*. **Saúde e Pesquisa**, v. 6, n. 1, 2013.

- BARBOSA, W. L. R. et al. Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais. **Revista científica da UFPA**, v. 4, n. 5, p. 1-19, 2004.
- BASTOS, C. N.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana. **Fitopatologia brasileira**, v. 29, n. 5, p. 555-557, 2004.
- BONALDO, S. M. et al. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 128-134, 2004.
- BORGES, D. I. et al. Efeito de extratos e óleos essenciais de plantas na germinação de uredinósporos de *Phakopsora pachyrhizi*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 3, p. 325-331, 2013.
- BRITO, J. P. C. et al. Peptaibols from *Trichoderma asperellum* TR356 strain isolated from Brazilian soil. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 600, 2014.
- BRITO, N. M.; NASCIMENTO, L. C. Potencial fungitóxico de extratos vegetais sobre *Curvularia eragrostidis* (P. Henn.) Meyer in vitro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 2, p. 230-238, 2015.
- BRÚ, J.; GUZMAN, J. D. Folk medicine, phytochemistry and pharmacological application of *Piper marginatum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26.6: 767-779, 2016.
- CAMPOS, M. C.O. et al. *Croton cajucara* crude extract and isolated terpenes: activity on *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, v. 107, n. 5, p. 1193-1204, 2010.
- CELOTO, M. I. B. et al. Atividade antifúngica de extratos de *Momordica charantia* L. sobre *Colletotrichum musae*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, p. 337-341, 2011.
- CERKAUSKAS, R. 2005. **Tomato disease**: Target spot. AVRDC (Visiting Scientist from Agriculture and Agri-Food Canada). Disponível em: <www.avrdc.org>. Acesso em: 15 de março de 2016.
- CHAGAS, A. C. S.; VIEIRA, L. S. Ação de *Azadirachta indica* (Neem) em nematódeos gastrintestinais de caprinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, n. 1, p. 49-55, 2007.
- CHOMA, I. M.; GRZELAK, E. M. Bioautography detection in thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 19, p. 2684-2691, 2011.
- CLEMENTE, F. M. V. T; BOITEUX, L. S.; BRASÍLIA, D. F. Produção de tomate para processamento industrial. **CEP**, v. 70, p. 970, 2012.
- COELHO NETTO, R. A. et al. Avaliação de práticas de manejo da mancha-de-*Corynespora* na cultura do tomate. **Tropical Plant Pathology**, v. 37, n. 3, p. 185-190, 2012.
- COLLINS, C. H. V. O Desenvolvimento da Cromatografia em Camada Delgada. **Scientia Chromatographica**, v. 1, p. 5-12, 2010.
- COLLINS, C.H. et al. **Introdução a Métodos Cromatográficos**, v. 6, p. 13-19, 1990.

- CUNICO, M. M. et al. Avaliação do extrato etanólico de *Ottonia martiana* Miq. para o controle de duas doenças florestais. Embrapa Florestas - **Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2012.
- DA CRUZ CABRAL, L. et al. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 166, n. 1, p. 1-14, 2013.
- DEWANJEE, S. et al. Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 5, n. 2, p. 75-84, 2015.
- DI STASI, L. C.L. Química de produtos naturais: Princípios constituintes ativos. **Plantas Medicinais: Arte e Ciência Um guia de estudo interdisciplinar**, Ed. Unesp, São Paulo, 1996.
- DUARTE, M. C. T. et al. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcolicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 14, p. 6-8, 2004.
- ELLIS, M. B. et al. *Dematiaceous hyphomycetes*. **Dematiaceous hyphomycetes.**, 1971.
- FAO - **Food and Agriculture Organization**. **The State of Food and Agriculture**, 2014. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 22 de dezembro de 2016.
- FARR, D.F.; ROSSMAN, A.Y. **Fungal Databases**, Systematic Mycology Microbiology Laboratory, ARS, USDA. 2016. Disponível em: <<https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases>>. Acesso em: 20 de setembro de 2016.
- FERREIRA, J. B. et al. Efeito da temperatura e óleos essenciais sobre o crescimento micelial de *Fusarium solani* isolado de mudas de *Euterpe oleracea* Mart (açai). **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 14, p. 453-465, 2012.
- FIERRO-CRUZ, J. E. et al. Fungal endophytes isolated from *Protium heptaphyllum* and *Trattinnickia rhoifolia* as antagonists of *Fusarium oxysporum*. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 49, n. 3, p. 255-263, 2017.
- FONSECA, M. C. M. et al. Potencial de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de fitopatógenos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, p. 45-50, 2015.
- FRENCH, R. C. Volatile chemical germination stimulators of rust and other fungal spores. **Mycologia**, v. 84, n. 3, p. 277-288, 1992.
- GEBHARDT, C. The historical role of species from the Solanaceae plant family in genetic research. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 129, n. 12, p. 2281-2294, 2016.
- GHORBANPOUR, M. et al. Mechanisms underlying the protective effects of beneficial fungi against plant diseases. **Biological Control**, v. 117, p. 147-157, 2018.
- GUO, Z. et al. Biologically active quassinoids and their chemistry: potential leads for drug design. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 2, p. 173-190, 2005.
- HAMDI, A. et al. Cytotoxic constituents from the rhizomes of *Curcuma zedoaria*. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

- HANADA, R. E. et al. Eficiência de desinfestantes na erradicação de conídios de *Mycosphaerella fijiensis* aderidos à superfície de bananas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 1, p. 94-96, 2004.
- HUANG, H. K. et al. Subcutaneous infection caused by *Corynespora cassiicola*, a plant pathogen. **Journal of Infection**, v. 60, n. 2, p. 188-190, 2010.
- HUGHES, A. F. S. et al. Antifungal Activity from Stem Extract and Endophytic Fungi of *Opuntia humifusa* (Raf.) Raf. **Planta Medica**, v. 79, n. 05, p. 26, 2013
- IBGE - **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, 2018. Disponível em: www.sidra.ibge.gov.br. Acesso em: 20 de janeiro de 2018.
- JOHNNY, L. et al. Antifungal activity of selected plant leaves crude extracts against a pepper anthracnose fungus, *Colletotrichum capsici* (Sydow) butler and bisby (Ascomycota: *Phyllachorales*). **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 20, p. 4157-4165, 2011.
- JONES, J. B. et al. Compendium of tomato diseases. **The American Phytopathological**. 1997.
- JUNG, E. B. et al. Curcuzedoalide contributes to the cytotoxicity of *Curcuma zedoaria* rhizomes against human gastric cancer AGS cells through induction of apoptosis. **Journal of ethnopharmacology**, v. 213, p. 48-55, 2018.
- KANCHISWAMY, C. N. et al. Bioprospecting bacterial and fungal volatiles for sustainable agriculture. **Trends in Plant Science**, v. 20, n. 4, p. 206-211, 2015.
- KENDRICK, B. **The fifth kingdom**. Hackett Publishing, 2017.
- KNUDSEN, G. R.; DANDURAND, L. C. Ecological complexity and the success of fungal biological control agents. **Advances in Agriculture**, v. 2014, 2014.
- KUNOH, H. Endophytic actinomycetes: attractive biocontrol agents. **Japanese Journal of Phytopathology**, v. 68, n.2, p. 124-127, 2002.
- LIDERT, Z. et al. Insect antifeedant and growth inhibitory activity of forty-six quassinoids on two species of agricultural pests. **Journal of Natural Products**, v. 50, n. 3, p. 442-448, 1987.
- LOBO, R. et al. *Curcuma zedoaria* Rosc.(white turmeric): a review of its chemical, pharmacological and ethnomedicinal properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, n. 1, p. 13-21, 2009.
- LOPES, C. A.; REIS, A. Doenças do tomateiro cultivado em ambiente protegido. **Embrapa Hortaliças. Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2011.
- LOPES, E. A. et al. Efeito dos extratos aquosos de mucuna preta e de manjeriço sobre *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*. **Nematologia Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 67-74, 2005.
- LOPES, J. C. et al. Fungos endofíticos isolados do capim citronela e seleção de antagonistas a fitopatógenos. **Biota Amazônia**, v. 7, n. 3, p. 84-88, 2017.
- LUDLEY, K. E. et al. Differential response of ectomycorrhizal and saprotrophic fungal mycelium from coniferous forest soils to selected monoterpenes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 3, p. 669-678, 2008.

- LUDLEY, K. E. et al. Potential for monoterpenes to affect ectomycorrhizal and saprotrophic fungal activity in coniferous forests is revealed by novel experimental system. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, n. 1, p. 117-124, 2009.
- LUZ, F. J. F. et al. O cultivo do tomate em Roraima. **Embrapa Roraima, Boa Vista**, 2002.
- MACHADO, D. F. M., et al. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 274-288, 2012.
- MACIEL, M. A. M. et al. Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 70, n. 1, p. 41-55, 2000.
- MAPA – **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 2018. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>> Acesso em: 14 de janeiro de 2018.
- MARQUES, M. C. S. et al. Efeito fungitóxico dos extratos de *Caryocar brasiliense* Camb. sobre os fungos *Botrytis cineria*, *Colletotrichum truncatum* e *Fusarium oxysporum*. **Ciência e agrotecnologia**, v. 26, p. 1410-1419, 2002.
- MATSUDA, H. et al. Hepatoprotective constituents from zedoariae rhizoma: absolute stereostructures of three new carabran-type sesquiterpenes, curcumenolactones A, B, and C. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 4, p. 909-916, 2001.
- MELO, M. M.; REIS, E. M. Efeito de substratos, luz e sobreposição de papel de filtro na esporulação de *Corynespora cassiicola*. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 3, 2010.
- MELO, P. et al. Extracts of *Caesalpinia ferrea* and *Trichoderma* sp. on the control of *Colletotrichum* sp. transmission in *Sideroxylon obtusifolium* seeds. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 494-501, 2016.
- MORAES, M. M. et al. Circadian variation of essential oil from *Piper marginatum* Jacq. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 13, n. 3, 2014.
- MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. In: Embrapa Meio Ambiente-Artigo em anais de congresso (ALICE). **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, n. 2, p. S3299-S3302, ago. 2009. CD-ROM. Suplemento. Trabalho apresentado no 49. Congresso Brasileiro de Olericultura, Águas de Lindóia, SP., 2009.
- MOREIRA, C.G.A. Caracterização parcial de frações eliciadoras presentes em extratos de *Cymbopogon nardus*. **PhD Thesis**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) –Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2003.
- M'PIGA, P. et al. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. radicle-lycopersicium in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 50, n. 5, p. 301-320, 1997.
- NAVICKIENE, H. M. D. et al. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 621-626, 2000.
- NAVICKIENE, H. M. D. et al. Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 467-470, 2006.

- NISA, H. et al. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: a review. **Microbial Pathogenesis**, v. 82, p. 50-59, 2015.
- OLIVEIRA, R. R. et al. Chlamydospore formation by *Corynespora cassicola*. **Tropical Plant Pathology**, v. 37, n. 6, p. 415-418, 2012.
- ONESIROSAN, P. et al. Increasing sporulation of *Corynespora cassicola*. **Mycopathologia**, v. 55, n. 2, p. 121-123, 1975.
- OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.
- PARMAR, V. S. et al. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, n.4, p. 597-673, 1997.
- PARVU, M. et al. Changes in *Botrytis cinerea* conidia caused by *Berberis vulgaris* extract. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 38, n. 3, p. 15, 2010.
- PERAZZO, F. F. et al. Comparative anti-inflammatory and antinociceptive effects of terpenoids and an aqueous extract obtained from *Croton cajucara* Benth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 521-528, 2007.
- PIMENTEL, F. A. et al. Ação fungitóxica do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. e K. Shum sobre o *Aspergillus flavus* isolado da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*). **Embrapa Agroindústria Tropical**-Artigo em periódico indexado (ALICE), 2010.
- PINEDA, R. M. et al. Chemical composition and antifungal activity of *Piper auritum* Kunth and *Piper holtonii* C. DC. against phytopathogenic fungi. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 72, n. 4, p. 507, 2012.
- PINTO, S. G. B. et al. Identificação e utilização de *Trichoderma* spp. armazenados e nativos no biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Revista Caatinga**, 28.4, 2015.
- POLONSKY, J. et al. 15-deacetylsergeolide, a potent antileukemic quassinoid from *Picrolemma pseudocoffea*. **Journal of Natural Products**, v. 47, n. 6, p. 994-996, 1984.
- POLONSKY, J. et al. Activity of quassinoids as antifeedants against aphids. **Journal of Chemical Ecology**, v. 15, n. 3, p. 993-998, 1989.
- POTZERNHEIM, M. C. L. et al. Análise dos óleos essenciais de três espécies de *Piper* coletadas na região do Distrito Federal (Cerrado) e comparação com óleos de plantas procedentes da região de Paraty, RJ (Mata Atlântica). **Rev Bras Farmacogn**, v. 16, 2006.
- PRINCE, L.; PRABAKARAN, P. Pelagia research library. **Asian Journal of Plant Science and Research**, v. 1, n. 1, p. 84-87, 2011.
- RAHMAN, A. et al. Antifungal activity of essential oil and extracts of *Piper chaba* Hunter against phytopathogenic fungi. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, n. 4, p. 573-579, 2011.
- REIGADA, J. B. et al. Chemical constituents from *Piper marginatum* Jacq.(Piperaceae) - antifungal activities and kinetic resolution of (RS)-marginatumol by *Candida antarctica* lipase (Novozym 435). **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 18, n. 9, p. 1054-1058, 2007.

- REIS FILGUEIRA, F. A. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. **Viçosa, MG: Editora UFV**, p. 421, 2013.
- REIS, A.; BOITEUX, L. S. Mancha-de-corinéspora do tomateiro. **Embrapa Hortaliças- Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2007.
- REIS, A.; MADEIRA, N. R. Diagnóstico dos principais problemas no cultivo de hortaliças no Estado do Amazonas. **Embrapa Hortaliças. Circular Técnica**, 2009.
- REIS, E. M. et al. Controle de doenças de plantas pela rotação de culturas. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 3, p. 85-91, 2011.
- RODRIGUES, E. et al. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de alface em sistema de cultivo orgânico contra *Sclerotinia sclerotiorum* pelo extrato de gengibre. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 2, p. 124-128, 2007.
- RODRIGUES, G. R. et al. Treatment with aqueous extract from *Croton cajucara* Benth reduces hepatic oxidative stress in streptozotocin-diabetic rats. **BioMed Research International**, v. 2012, 2012.
- ROZWALKA, L. C. et al. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, 2008.
- SÁNCHEZ, Y. et al. Efecto del aceite esencial de *Piper marginatum* Jacq. y sus componentes sobre *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dawson. **Revista de Protección Vegetal**, v. 27, n. 1, p. 39-44, 2012.
- SANTOS, M. R. A. et al. Atividade fungicida do óleo essencial de *Piper marginatum* L.(Piperaceae) sobre *Fusarium oxysporum* (Schlecht) in vitro. **Saúde e Pesquisa**, v. 4, n. 1, 2011.
- SANTOS, T. G. et al. Composição química e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Piper malacophyllum* (C. Presl.) C. DC. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 477-481, 2012.
- SARAIVA, R. C. G. et al. Anatomia foliar e caulinar de *Picrolemma sprucei* HOOK (Simaroubaceae). **Acta Amazônica**, [S.l.], v. 33, n. 2, p. 213-220, 2003.
- SCHERLACH, K.; HERTWECK, C. Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 7, n. 9, p. 1753-1760, 2009.
- SCHLUB, R. L. et al. An overview of target spot of tomato caused by *Corynespora cassiicola*. In: **Acta Horticulturae**, 808: p. 25-28, 2009.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005.
- SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. et al. M. E. S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta**, v. 30, n. 1/2, 2000.
- SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. et al. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. sSuplemento, 2003.

- SELEGUINI, A. et al. A. Número de hastes e racimos por planta de tomateiro de crescimento indeterminado, em condições de ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, 2003.
- SILVA, D. M. H.; BASTOS, C. N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 143-145, 2007.
- SILVA, E. C. C. et al. Biological activity of neosergeolide and isobrucein B (and two semi-synthetic derivatives) isolated from the Amazonian medicinal plant *Picrolemma sprucei* (Simaroubaceae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 48-56, 2009.
- SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 39, p. 3733-3740, 2016.
- SILVA, V. M. G. et al. Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves. **Fitoterapia**, v. 70, n. 1, p. 32-34, 1999.
- SIMON, J. M. et al. Atividade fungitóxica de extratos vegetais e produtos comerciais contra *Diplocarpon rosae*. **Summa Phytopathologica**, v. 42, n. 4, p. 351-356, 2018.
- SOUSA, F. M. G.; SILVA BENTES, J. L. Variabilidade de isolados de *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei procedentes do Amazonas, em meios de cultura. **Summa Phytopathologica**, v. 40, n. 1, p. 84-87, 2014.
- SOUZA, M. A. A. et al. Composição química do óleo fixo de *Croton cajucara* e determinação das suas propriedades fungicidas. **Rev Bras Farmacogn**, v. 16, n. sSupl, 2006.
- TANAKA, K. et al. Pleosporales in Japan (5): Pleomassaria, Asteromassaria, and Splanchnonema. **Mycoscience**, v. 46, n. 4, p. 248-260, 2005.
- THOLKAPPIYAVATHI, K. et al. A concise review on *Curcuma Zedoaria*. **Int J Phyther**, v. 2, p. 1-4, 2013.
- THOMAS, W. W. The American genera of Simaroubaceae and their distribution. **Acta Botanica Brasilica**, v. 4, n. 1, p. 11-18, 1990.
- VAN WEES, S. C. M. et al. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge. **Plant Molecular Biology**, v. 41, n. 4, p. 537-549, 1999.
- VARMA, A. et al. *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 2741-2744, 1999.
- VENTUROSO, L. R. et al. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 1, p. 18-23, 2011.
- VIEIRA, S. M. et al. Gastro-protective effects of isobrucein B, a quassinoid isolated from *Picrolemma sprucei*. **Fitoterapia**, v. 95, p. 8-15, 2014.
- WEBSTER, D. et al. Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 140-146, 2008.

WINTER, J. M. et al. Genomics-inspired discovery of natural products. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, n. 1, p. 22-31, 2011.

WOO, S. L. et al. *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. **The Open Mycology Journal**, v. 8, n. 1, 2014.

YAMADA, H. et al. Rare case of fungal keratitis caused by *Corynespora cassiicola*. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 19, n. 6, p. 1167-1169, 2013.

ZACARONI, L. M. et al. Potencial fungitóxico do óleo essencial de *Piper hispidinervum* (pimenta longa) sobre os fungos fitopatogênicos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Amazônica**, v. 39, n. 1, p. 193-198, 2009.

ZAMBOLIM, L. Proteção de plantas: Manejo Integrado de Doenças de Plantas. **Viçosa**, p. 88, 2010.

ZOTTI, S. C. et al. Biocontrole in vitro de *Didymella bryoniae* por fungos endofíticos isolados de folhas de *Piper amalago* L. **Revista Uningá Review**, v. 23, n. 1, 2018.

ANEXOS

Anexo 1 - Resumo da análise de variância para a variável halo de inibição

FV	GL	QM	F	p
Tratamentos	13	0.32396	123.5820 **	<0,0001
Resíduo	28	0.00262		
Total	41			

** significativo a 1% pelo teste F.

Anexo 2 - Resumo da análise de variância para a variável porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) de *Corynespora cassiicola* nos extratos brutos aquosos de *Picrolemma sprucei*, *Curcuma zedoaria*, *Croton cajucara* e *Piper marginatum*

FV	GL	QM	F
Espécies	3	574,23	8,32**
Concentração	5	91,29	1,32 -
Espécies X Concentração	15	166,51	2,41**
Tratamentos	23	203,34	2,94**
Resíduo	72	68,94	-
Total	95	-	-

** significativo ao nível de 1% pelo teste F. -- Os tratamentos são quantitativos. O Teste F não se aplica.

Anexo 3 - Médias da porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) de *Corynespora cassiicola* em diferentes concentrações de extrato bruto aquoso de *Picrolemma sprucei*, *Curcuma zedoaria*, *Croton cajucara* e *Piper marginatum*. Dados transformados para $x = x+C$, sendo $C = 7$

Espécies	Concentração (%)					
	0	10	20	30	40	50
<i>P.sprucei</i>	(0) 7 a	(+3,5) 3,5 b	(+4,75) 2,25 b	(+3,5) 3,5 b	(+0,75) 6,25 b	(8,5) 15,5 a
<i>C.zedoaria</i>	(0) 7 a	(5) 12 a	(5,75) 12,75 a	(24,25) 31,25 a	(3,25) 10,25 a	(0,5) 7,5 b
<i>C.cajucara</i>	(0) 7 a	(+3,75) 3,25 b	(4,25) 11,25 a	(+0,75) 6,25 b	(4,25) 11,25 a	(+2,25) 4,75 b
<i>P.marginatum</i>	(0) 7 a	(13) 20 a	(8,5) 15,5 a	(+6,75) 13,75 b	(13,75) 20,75 a	(15) 22 a

Colunas - letras minúsculas. Média geral (MG) = 10,89. Coeficiente de variação (CV%) = 76,21. + Estimulou o crescimento. OBS: O valor real é negativo, por exemplo, +3,5 = -3,5, o sinal positivo só indica que houve estímulo.

Anexo 4 - Resumo da análise de variância para a variável porcentagem de inibição da esporulação (PIE) de *Corynespora cassiicola* nos extratos brutos aquosos de *Picrolemma sprucei*, *Curcuma zedoaria*, *Croton cajucara* e *Piper marginatum*

FV	GL	QM	F
Espécies	3	1.575,22	14,83**
Concentração	5	5.388,82	50,75 -
Espécies x Concentração	15	651,15	6,13**
Tratamentos	23	1.801,61	16,96**
Resíduo	48	106,16	-
Total	71	-	-

**significativo ao nível de 1% pelo teste F. -- Os tratamentos são quantitativos. O Teste F não se aplica.

Anexo 5 - Médias da porcentagem de inibição de esporulação de *Corynespora cassiicola* em diferentes concentrações de extrato bruto aquoso de *Picrolemma sprucei*, *Curcuma zedoaria*, *Croton cajucara* e *Piper marginatum*

Espécies	Concentração (%)					
	0	10	20	30	40	50
<i>P. sprucei</i>	0 a	56,33 b	40,00 a	65,33 a	45,33 b	32,00 b
<i>C. zedoaria</i>	0 a	36,33 c	41,00 a	65,66 a	1,33 c	44,33 b
<i>C. cajucara</i>	0 a	32,66 c	22,33 b	48,00 b	61,66 a	51,33 a
<i>P. marginatum</i>	0 a	76,33 a	51,00 a	68,66 a	63,66 a	59,33 a

Colunas - letras minúsculas. Média geral (MG) = 40,11. Coeficiente de variação (CV%) = 25,69.

Anexo 6 - Resumo da análise de variância para a variável porcentagem de inibição da germinação (PIG) dos extratos brutos aquosos de *Picrolemma sprucei*, *Curcuma zedoaria*, *Croton cajucara* e *Piper marginatum*

FV	GL	QM	F
Espécies	3	3.695,59	128,48**
Concentração	5	2.168,03	75,37--
Espécies x concentração	15	435,62	15,14**
Tratamentos	23	1.237,44	43,02**
Resíduo	48	28,76	-
Total	71	-	-

**significativo ao nível de 1% pelo teste F. -- Os tratamentos são quantitativos. O Teste F não se aplica.

Anexo 7 - Médias da porcentagem de inibição da germinação de *Corynespora cassiicola* em diferentes concentrações de extrato bruto aquoso de *Picrolemma sprucei*, *Curcuma zedoaria*, *Croton cajucara* e *Piper marginatum*

Espécies	Concentração (%)					
	0	10	20	30	40	50
<i>P. sprucei</i>	0 a	14,33 c	13,00 c	17,66 c	20,00 b	18,66 b
<i>C. zedoaria</i>	0 a	27,33 b	37,66 b	2,66 d	4,33 c	2,00 c
<i>C. cajucara</i>	0 a	52,33 a	55,00 a	60,67 a	55,33 a	37,66 a
<i>P. marginatum</i>	0 a	20,66 c	48,00 a	35,66 b	28,00 b	5,00 c

Colunas - letras minúsculas. Média geral (MG) = 23,16. Coeficiente de variação (CV%) = 23,15.

Anexo 8 - Resumo da análise de variância para a variável índice de crescimento micelial (ICM) dos extratos aquosos de *Picrolemma sprucei*, *Curcuma zedoaria*, *Croton cajucara* e *Piper marginatum*

FV	GL	QM	F
Espécies	3	1,63	19,53**
Concentração	5	0,53	6,37--
Espécies x Concentração	15	0,13	1,55 ^{ns}
Tratamentos	23	0,41	4,94**
Resíduo	72	0,08	-
Total	95	-	-

**significativo ao nível de 1% pelo teste F. -- Os tratamentos são quantitativos. O Teste F não se aplica. Não houve interação entre fatores então a análise foi realizada separadamente para os fatores 1 (espécies) e 2 (concentrações).

Anexo 9 - Resumo da análise de variância para a variável porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) de *Corynespora cassiicola* nas frações hexânicas, acetato-etílicas e metanólicas de *Picrolemma sprucei*, *Curcuma zedoaria*, *Croton cajucara* e *Piper marginatum*

FV	GL	QM	F
Espécies	3	2.139,02	42,20**
Solventes	3	2.733,36	53,92**
Espécies x Solventes	9	1.380,30	27,23**
Tratamentos	15	1.802,66	35,56**
Resíduo	32	50,68	-
Total	47	-	-

**significativo ao nível de 1% pelo teste F.

Anexo 10 - Médias da porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) de *Corynespora cassiicola* nas frações hexânicas, acetato-etílicas e metanólicas de *Picrolemma sprucei*, *Curcuma zedoaria*, *Croton cajucara* e *Piper marginatum*

Espécies	Extratos			
	ADE	H	AE	M
<i>P. sprucei</i>	0 aC	18,66cB	14,33 cB	32,66 aA
<i>C. zedoaria</i>	0 aB	37,33bA	34,33 bA	30,33 aA
<i>C. cajucara</i>	0 aB	2 dB	3 Cb	16 bA
<i>P. marginatum</i>	0 aB	72,66 aA	73,33 aA	0,66 cB

Colunas - letras minúsculas. Linhas - letras maiúsculas. Média geral (MG) = 20,95. Coeficiente de variação (CV%) = 33,97.

Anexo 11 - Resumo da análise de variância para a variável porcentagem de inibição da esporulação (PIE) de *Corynespora cassiicola* nas frações hexânicas, acetato-etílicas e metanólicas de *Picrolemma sprucei*, *Curcuma zedoaria*, *Croton cajucara* e *Piper marginatum*

FV	GL	QM	F
Espécies	3	3.085,90	28,89**
Solventes	3	8.477,79	62,90**
Espécies x Solventes	9	2.065,52	15,32**
Tratamentos	15	3.552,05	26,35**
Resíduo	32	134,77	-
Total	47	-	-

**significativo ao nível de 1% pelo teste F.

Anexo 12 - Médias da porcentagem de inibição da esporulação (PIE) de *Corynespora cassiicola* nas frações hexânicas, acetato-etílicas e metanólicas de *Picrolemma sprucei*, *Curcuma zedoaria*, *Croton cajucara* e *Piper marginatum*. Dados transformados para $x = x + C$, sendo $C = 14$.

Espécies	Extratos			
	ADE	H	AE	M
<i>P. sprucei</i>	(0)14,00 aC	(74) 88 bA	(38,66) 52,66 bB	(51) 65 aB
<i>C.zedoaria</i>	(0)14,00 aC	(66,33) 80,33 bA	(33,33) 47,33 bB	(16,66) 30,66 bB
<i>C.cajucara</i>	(0)14,00 aC	(4,66) 18,66 cB	(24,33) 38,33 bA	(41) 55 aA
<i>P.marginatum</i>	(0)14,00 aC	(95) 109 aA	(96) 110 aA	(19,66) 33,66 bB

Colunas - letras minúsculas. Linhas - letras maiúsculas. Média geral (MG) = 49,60. Coeficiente de variação (CV%) = 23,40. Valores entre parênteses são as médias originais.

Anexo 13 - Resumo da análise de variância para a variável porcentagem de inibição da germinação (PIG) de *Corynespora cassiicola* nas frações hexânicas, acetato-etílicas e metanólicas de *Picrolemma sprucei*, *Curcuma zedoaria*, *Croton cajucara* e *Piper marginatum*. Dados transformados para $x = x + C$, sendo $C = 16$

FV	GL	QM	F
Espécies	3	4.312,68	196,58**
Solventes	3	3.373,90	153,79**
Espécies x Solventes	9	2.300,39	104,88**
Tratamentos	15	2.917,55	132,99**
Resíduo	32	21,93	-
Total	47	-	-

**significativo ao nível de 1% pelo teste F.

Anexo 14 - Médias da porcentagem de inibição da germinação de *Corynespora cassiicola* nas frações hexânicas, acetato-etílicas e metanólicas de *Picrolemma sprucei*, *Curcuma zedoaria*, *Croton cajucara* e *Piper marginatum*

Espécies	Extratos			
	ADE	H	AE	M
<i>P. sprucei</i>	16 aB	20 cB	44 bA	11,33 dB
<i>C. zedoaria</i>	16 aB	17,66 cB	8,33 cC	79,23 aA
<i>C. cajucara</i>	16 aB	54,66 bA	49,66 bA	56 bA
<i>P. marginatum</i>	16 aD	91,66 aB	108,66 aA	47,66 cC

Colunas - letras minúsculas. Linhas - letras maiúsculas. Média geral (MG) = 40,81. Coeficiente de variação (CV%) = 11,48.

Anexo 15 - Resumo da análise de variância para a variável índice de crescimento micelial (ICM) de *Corynespora cassiicola* nas frações hexânicas, acetato-etílicas e metanólicas de *Picrolemma sprucei*, *Curcuma zedoaria*, *Croton cajucara* e *Piper marginatum*

FV	GL	QM	F
Espécies	3	2,05	22,78*
Solventes	3	3,98	44,17*
Espécies x Solventes	9	1,22	12,49*
Tratamentos	15	1,88	20,88*
Resíduo	32	0,09	-
Total	47	-	-

**significativo ao nível de 1% pelo teste F.

Anexo 16 - Médias do índice de crescimento micelial de *Corynespora cassiicola* nas frações hexânicas, acetato-
 etílicas e metanólicas de *Picrolemma sprucei*, *Curcuma zedoaria*, *Croton cajucara* e *Piper marginatum*

Espécies	Extratos			
	ADE	H	AE	M
<i>P.sprucei</i>	3,07 aA	2,83 aA	2,49 aB	2,48 bB
<i>C.zedoaria</i>	3,00 aA	1,50 bB	1,60 bB	2,04 bB
<i>C.cajucara</i>	2,95 aA	2,52 aA	2,37 aA	2,44 bA
<i>P.marginatum</i>	3,09 aA	0,67 cB	0,70 cB	2,97 aA

Colunas - letras minúsculas. Linhas - letras maiúsculas. Média geral (MG) = 2,29. Coeficiente de variação (CV%) = 13,06.

Anexo 17 - Resumo da análise de variância para a variável maior lesão

Kruskal-Wallis		
H	H-crítico	p-valor
18,64	15,08**	<0,01

** significativo ao nível de 1% pelo teste de Kruskal-Wallis.

Anexo 18 - Resumo da análise de variância para a variável número de lesões

FV	GL	QM	F
Tratamentos	5	144.687,29	79,30**
Resíduo	24	1.824,43	-
Total	29	-	-

**significativo ao nível de 1% pelo teste F.

Anexo 19 - Médias do número de lesões ao longo dos dias de avaliação

Espécies	Épocas de avaliação								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
T1	0 a	0 b	0 b	0 c	0 c	0 e	1,4 e	1,4 e	1,4 e
T2	37,5 a	112,3 a	232,7 a	279,7 a	327,6 a	447,3 a	468,1 a	473,9 a	477,5 a
T3	0,1 a	0,8 b	35,3 b	76,9 b	121,8b	205,2 c	226 c	236,8 c	242,7 c
T4	2,3 a	23,9 b	54,8 b	77,3 b	99,6 b	128,5 d	149,3 d	160,1 d	165,9 d
T5	28,9 a	105,2 a	241,2 a	270,9 a	313,8 a	367,1 b	389,9 b	399,7 b	405,5 b
T6	0,2 a	0,4 b	7,2 b	61 b	103 b	206 c	226,8 c	237,6 c	243,4 c

Colunas - letras minúsculas. Média geral (MG) = 156,96. Coeficiente de variação (CV%) = 23,45.

Anexo 20 - Resumo da análise de variância para a variável altura da planta

FV	GL	QM	F	p
Tratamentos	5	120,48	8,74**	<0,0001
Resíduo	24	13,77		
Total	29			

** significativo a 1% pelo teste F.

Anexo 21 - Resumo da análise de variância para a variável número de folhas

FV	GL	QM	F	p
Tratamentos	5	6,40	3,201*	0,0218
Resíduo	24	2,00		
Total	29			

* significativo a 5% pelo teste F.

Anexo 22 - Resumo da análise de variância para a variável comprimento da raiz

FV	GL	QM	F	p
Tratamentos	5	48,90	1,14 ^{ns}	0,3655
Resíduo	24	42,80		
Total	29			

^{ns} não significativo pelo teste F ($p \geq 0,05$).

Anexo 23 - Resumo da análise de variância para a variável matéria fresca das folhas

FV	GL	QM	F	p
Tratamentos	5	5,99	3,45*	0,0171
Resíduo	24	1,73		
Total	29			

* significativo a 5% pelo teste F.

Anexo 24 - Resumo da análise de variância para a variável matéria fresca do sistema radicular

FV	GL	QM	F	p
Tratamentos	5	0,10	3,75*	0,0117
Resíduo	24	0,02		
Total	29			

* significativo ao nível de 5% pelo teste F.

Anexo 25 - Resumo da análise de variância para a variável matéria seca das folhas

FV	GL	QM	F	p
Tratamentos	5	0,54	6,56**	0,0005
Resíduo	24	0,08		
Total	29			

** significativo a 1% pelo teste F.

Anexo 26 - Resumo da análise de variância para a variável matéria seca do sistema radicular

FV	GL	QM	F	p
Tratamentos	5	0,009	4,33**	0,0059
Resíduo	24	0,002		
Total	29			

** significativo ao nível de 1% pelo teste F.