

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO CURITIBANOS
MAYARA MAIA DA SILVA

OBTENÇÃO DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Lithraea molleoides* E *Lithraea brasiliensis* E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA CONTRA *Sphaceloma ampelinum*

Curitibanos
2016

MAYARA MAIA DA SILVA

OBTENÇÃO DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Lithraea molleoides* E *Lithraea brasiliensis* E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA CONTRA *Sphaceloma ampelinum*

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Agronomia, do Centro Curitibanos da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientador: Dr. Prof. Cristian Soldi.

Curitibanos
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva, Mayara Maia da

Obtenção de extratos e frações de *Lithraea molleoides* e *Lithraea brasiliensis* e avaliação da atividade antifúngica contra *Sphaceloma ampelinum* / Mayara Maia da Silva ; orientador, Cristian Soldi - Curitibanos, SC, 2016.
36 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus
Curitibanos. Graduação em Agronomia.

Inclui referências

1. Agronomia. 2. *Lithraea molleoides*. 3. Antracnose. 4. *Lithraea brasiliensis*. I. Soldi, Cristian. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Agronomia. III. Título.



SERVIÇO FEDERAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO CURITIBANOS

Coordenação do Curso de Graduação em Agronomia

Rodovia Ulisses Gabeardi, km3 - Zona Rural - CEP: 89520-000 - Curitiba/SC

CEP 89520-000 - Curitiba - SC

TELEFONE: (48) 3721-4168 Email: agronomia.cbs@contato.ufsc.br

MAYARA MAIA DA SILVA

**OBTENÇÃO DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Lithraea molleoides* E
Lithraea brasiliensis E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA
CONTRA *Sphaceloma ampelinum***

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Agronomia, do Centro Curitibanos da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Cristian Soldi.

Data da defesa: 15 de julho de 2016

MEMBROS COMPONENTES DA BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cristian Soldi
Orientador

Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Adriana Tarumi Itako
Membro da banca examinadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Joni Stolberg
Membro da banca examinadora
Universidade Federal de Santa Catarina

À *Deus*,
E à todos que doaram um pouco de si
para que este sonho se tornasse realidade!

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

*Primeiramente à **Deus**, pela dádiva da vida, por estar sempre comigo por toda força e coragem que me concede à cada dia, pela luz que coloca em meu caminho e por ser o maior mestre que possa existir!*

*À minha mãe **Magna Silvane Pereira Maia** por ser minha base, por ser uma mãe batalhadora que sempre me deu suporte, me oferecendo todo o seu amor sublime.*

Mãe, que Deus permita-me ser um terço da pessoa guerreira que és!

*Ao meu amor **Luiz Augusto Melo** que esteve ao meu lado me apoiando e incentivando, sendo essencial durante a fase de conclusão deste trabalho, sempre amoroso e disposto a ajudar. Meu amor e admiração por ti são infinitos. Que seu futuro seja brilhante, assim como tu és!*

*Aos meus irmãos **Gislaine e Edson**, gratidão, lhes desejo tudo de bom!*

*Aos meus orientadores **Dr. Prof. Cristian Soldi e Dr^a. Prof^a. Adriana Terumi Itako** pela paciência e compreensão que me dispuseram na confecção deste trabalho. A sabedoria e dedicação de ambos foram fundamentais para o alcance dos meus objetivos!*

*À **Dr^a. Prof^a. Glória Botelho**, que no momento mais difícil da minha vida acadêmica, me incentivou a continuar e me entendeu, dando suporte para a continuação de minha jornada, muito obrigada, seu incentivo e motivação foram cruciais!*

*Meus sinceros agradecimentos aos **Mestres**, que tive a oportunidade de conhecer ao longo da minha vida acadêmica!*

*Aos meus amigos que tive a oportunidade de adquirir em toda minha jornada, principalmente à **Bruna, Jacqueline, Fernanda e Marlete**. Obrigada por todas as conversas, trabalhos, risadas e sonhos compartilhados!*

*Meus sinceros agradecimentos à **todos** que de alguma maneira me ajudaram para que este sonho se tornasse realidade!*

“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá!”

(Ayrton Senna)

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Crescimento micelial (cm) do *S. ampelinum*, após tratamento com diferentes concentrações de extrato de *L. molleoides* nas frações solúveis em acetato de etila e hexano.....22
- Tabela 2.** Crescimento micelial (cm) do *S. ampelinum* após tratamento com diferentes concentrações de extrato de *L. brasiliensis* na fração solúvel em acetato de etila e na fração solúvel em hexano (este último com DMSO).....23
- Tabela 2.** Crescimento micelial (cm) do *S. ampelinum* após tratamento com diferentes concentrações de extrato de *L. molleoides* na fração alcoólica.....24

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	9
2.1 ASPECTOS GERAIS DA DOENÇA ANTRACNOSE.....	9
2.2 USO DE EXTRATOS DE ORIGEM VEGETAL.....	10
2.2.1 Extrato de <i>L. brasiliensis</i> e <i>L. molleoides</i>	11
3 MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 PROCEDIMENTOS FITOQUÍMICOS.....	13
3.2 PREPARO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES.....	13
3.2.1 Extrato hidroalcoólico bruto	13
3.2.2 Obtenção das frações	14
3.3 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	16
3.3.1 Ensaios com autoclavagem do extrato	17
3.3.2 Extrato diluído em 5% de DMSO	18
3.3.3 Inoculação do <i>S. ampelinum</i>	18
3.3.4 Extrato filtrado com membrana	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5 CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS.....	27

RESUMO

Devido os problemas causados pelo uso de grande quantidade de agroquímicos, vem se buscando novos produtos que tenham um efeito mais eficiente no combate a esses organismos causadores de doenças e que não sejam prejudiciais ao meio ambiente. Surge então a proposta da utilização de extratos de Bugreiro (*Lithraea brasiliensis*) e da Aroeira Brava (*Lithraea molleoides*) no controle da antracnose da videira (*Sphaceloma ampelinum*), que demonstram resultados positivos no combate a doenças e portanto é um produto com grande potencial para o controle de fitopatógenos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de produtos alternativos no controle da antracnose da videira causada pelo fungo *S. ampelinum*. Foi avaliado *in vitro* a sensibilidade do agente causal aos extratos de *L. brasiliensis* e de *L. molleoides*. O delineamento experimental foi realizado com cinco tratamentos: os extratos hidroalcoólicos brutos (EHB) obtidos das duas espécies combinados com o fracionamento em três distintos solventes: 1) fração solúvel em hexano (FH); 2) fração solúvel em acetato de etila (FA) e; 3) fração aquosa (FAq) de *L. molleoides* e com cinco repetições cada tratamento. O experimento foi conduzido em laboratórios de Química e Fitopatologia localizados na Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Curitibanos. Dados de desenvolvimento das colônias foram submetidos à análise de variância, e ao teste de Tukey a 5%. Os resultados obtidos com a realização deste projeto demonstraram que os efeitos que os extratos de *L. brasiliensis* e *L. molleoides* têm sobre o desenvolvimento de *S. ampelinum* não foram satisfatórios para a inibição do referido fungo nas concentrações testadas.

Palavras-chave: Doença fúngica. *Lithraea brasiliensis*. *Lithraea molleoides*. *Sphaceloma ampelinum*.

ABSTRACT

Although vineyards are growing around the world, vine cultivation generally suffers with diseases which may be triggered by environmental conditions favorable for the development of pathogens. Anthracnose, caused by the fungus *Sphaceloma ampelinum*, is one of the most important diseases that affect the development of vines. In order to control the causal agent, large amounts of chemicals are used in the vineyards. Due to the problems caused by the use of large amounts of agrochemicals, we have been looking for new products which are not harmful to people and environment. In this sense, we propose to evaluate the antifungal activity against *Sphaceloma ampelinum* using Bugreiro (*Lithraea brasiliensis*) and Brava Aroeira (*Lithraea molleoides*) extracts as alternative products in the control of this disease. The experiments were carried out with five treatments: crude hydroalcoholic extracts (EHB), hexanes soluble fractions (FH), ethyl acetate soluble fractions (FA) and aqueous fraction (FAq) with five repetitions each treatment for both species. The experiment was conducted in chemistry and plant pathology laboratories at the Federal University of Santa Catarina, center of Curitibanos. The data for the growing of the colonies were subjected to analysis of variance, and the 5% Tukey test. The results obtained with the realization of this design have shown that the effects of the extracts of *L. brasiliensis* and *L. molleoides* have on the development of *S. ampelinum* were unsatisfactory for inhibiting the fungus at the concentrations tested.

Key words: Fungal disease. *Lithraea brasiliensis*. *Lithraea molleoides*. *Sphaceloma ampelinum*.

1 INTRODUÇÃO

Entre as doenças que acometem a cultura da videira, a antracnose é uma das mais importantes. É causada pelo fungo *Elsinoe ampelina* (de Bary) Schear, a qual é uma forma sexuada de *Sphaceloma ampelinum* de Bary e tem origem na Europa, com ocorrência em todas as regiões produtoras de uva do mundo. No Brasil a referida doença está presente principalmente na região sul do país (SÔNEGO; GARRIDO; JUNIOR GRIGOLETTI, 2003).

No manejo convencional das doenças percebe-se o uso contínuo de agroquímicos visando a maximização dos lucros, maior produtividade e qualidade para o produto final. No entanto, o uso abusivo de agrotóxicos pode ser problemático devido aos riscos ambientais (desequilíbrio ecológico) e toxicológicos (alta concentração nos alimentos), além do custo elevado para o produtor (MEINERZ *et al.*, 2008).

Dentre os mais utilizados para a cultura podemos destacar o Difenconazole, Clorotalonil, Mancozeb, Hidróxido de Cobre e Oxicloreto de Cobre (EMBRAPA, 2005). Em toxicidade o Difenconazole é classe I, o Clorotalonil é classe III, o Mancozeb é classe III. Por consequência desses e outros problemas gerados a partir do uso de produtos químicos agressivos, tem-se incentivado a busca por métodos alternativos para o controle de doenças (SILVA; TRECENTE; BOSQUÊ, 2007).

Extratos e compostos provenientes de plantas têm sido investigados quanto aos seus efeitos antimicrobianos e muitos desses materiais têm se mostrado efetivos em inibir o crescimento fúngico. Extrato de própolis foi testado para o controle da antracnose e teve efeito positivo no controle micelial deste (MARINI *et al.*, 2012).

Neste sentido, grande esforço tem sido direcionado na busca de métodos alternativos, seguros e de baixo custo, para o controle de doenças em plantas utilizando óleos essenciais, extratos e compostos isolados de plantas. (FRANZENER *et al.*, 2007). Aroeira Brava e Bugreiro são exemplos de espécies que apresentam atividade antimicrobiana, antiviral e citotóxica (RUFFA *et al.*, 2002).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ASPECTOS GERAIS DA DOENÇA ANTRACNOSE

A antracnose é considerada como uma das mais importantes doenças que acometem a cultura da videira, causando danos severos à produção. Afeta o vigor da planta, reduz de forma expressiva tanto a qualidade quanto a quantidade de frutos e compromete as safras seguintes (SÔNEGO, 2005; KIMATI; GALLI, 1997).

A referida doença é originária da Europa e está presente em regiões chuvosas e úmidas. Ocorre em todas as regiões vitícolas do Brasil principalmente na região sul (SÔNEGO; GARRIDO; GRIGOLETTI JUNIOR, 2005).

O agente causal da antracnose é o fungo *Elsinoe ampelina*, que é um ascomiceto e a fase assexuada é *Sphaceloma ampelinum* (GALLOTTI; GRIGOLETTI JUNIOR; SONEGO, 2002). Kono *et al.*(2009) destacam que os conídios de *Sphaceloma ampelinum* são unicelulares, hialinos, oblongos a ovóides, formados sobre conidióforos curtos e cilíndricos, em acérvulos, sobre uma base estromática. Os conídios são produzidos na fase de crescimento vegetativo da videira, sob condições favoráveis, como a umidade, sendo estes responsáveis pela continuação da doença em safras seguintes (AMORIM *et al.*, 2005).

O fungo consegue sobreviver de um ano para o outro ficando alojado nas lesões dos sarmentos e gavinhas e também nos restos culturais. No fim do ciclo da cultura, pode ocorrer formação de estruturas de resistência chamadas de escleródios, que ao início da primavera, sob condições de umidade, irão dar origem aos conídios (NAVES *et al.*, 2006).

Quando os conídios atingem tecidos jovens sob 2°C a até 32°C, eles germinam e infectam o hospedeiro, sendo o ótimo de temperatura para o desenvolvimento da doença de 24 a 26°C. Há necessidade de no mínimo 12 horas de água sobre o tecido vegetal para que ocorra a infecção do patógeno na planta (AMORIM *et al.*, 2005; BOTELHO *et al.*, 2009).

O fungo tem capacidade de infectar todas as partes verdes da planta, sendo no desenvolvimento inicial da videira, mais prejudicial inicialmente aparecem manchas castanhas, deprimidas nas folhas e nervuras, causa o encarquilhamento da folha. As áreas afetadas ficam necrosadas, podendo ocorrer à perfuração do tecido foliar (SÔNEGO; GARRIDO; GRICOLETTI JUNIOR, 2003).

No pecíolo causa cancrios profundos de contorno irregular. Após o desenvolvimento de cachos, os sintomas podem aparecer no pedúnculo e nas bagas. (AMORIM *et al.*, 2005).

2.2 USO DE EXTRATOS DE ORIGEM VEGETAL

O uso indiscriminado de produtos químicos favorece o aparecimento de resistência no patógeno, desde 1982 foram verificadas populações patogênicas resistentes a fungicidas, em videiras em países produtores (LEROUX; CLERJEAU, 1985; PEARSON; GOHEEN, 1988).

Extratos são basicamente preparações concentradas, oriundos de plantas frescas ou secas, que podem ter sofrido algum tratamento prévio, como a moagem e até mesmo a inativação enzimática, preparados com solvente para isolar os princípios ativos (SALES, 2004).

Segundo Salles & Rech (1999) a azadiractina é um dos compostos naturais mais promissores, ela é extraída de plantas de nim (*Azadirachta indica*) e do cinamomo (*Melia azedarach*).

Extrato de *Allium Sativum* L. também foi testado e apresentou controle eficaz da antracnose reduzindo o crescimento micelial e diminuindo a severidade da doença (LEITE *et al.*, 2009).

Extratos aquosos estão sendo utilizados no controle de doenças, como o extrato de rizomas frescos de gengibre (*Zingiber officinale*) que apresentou resultado positivo para o controle do oídio em ervilha, diminuindo em até cinquenta por cento a severidade da referida doença (SINGH *et al.*, 1991). O mofo branco também foi controlado com o extrato de *Z. Officinale* (RODRIGUES *et al.*, 2007).

O extrato aquoso de cânfora (*Artemisia camphorata*) também apresentou resultado positivo, este no controle do agente causal da mancha marrom no trigo (*Bipolaris sorokiniana*) apresentando uma redução de até vinte e nove por cento no tamanho das lesões e de sessenta por cento do índice de ataque desta doença (FRANZENER *et al.*, 2003).

2.2.1 Extrato de *L. brasiliensis* e *L. molleoides*

A família Anacardiaceae e está representada no Rio Grande do Sul por duas espécies, *L. brasiliensis* e *L. molleoides*, popularmente conhecidas como Aroeira-Brava e Bugreiro. A espécie *L. molleoides* pode apresentar atividade antimicrobiana, antiviral e citotóxica (RUFFA *et al.*, 2002).

Extratos vegetais auxiliam muitas vezes no controle de doenças em diversas espécies de plantas, alguns possuem atividade antimicrobiana e outros têm a capacidade de ativar mecanismos de defesa nas plantas quais são aplicados.

O extrato em diclorometano de *L. molleoides* foi reportado como tendo atividade anti-proliferativa, sendo este estudo realizado na medicina humana (FERNANDEZ *et al.*, 2002).

Há estudos que comprovam que a *L. molleoides* possui diversas propriedades e dentro disso averiguou-se e obteve-se respostas quanto a atividades hemostáticas e propriedades medicinais que atuam contra a artrite (TOURSARKISSIAN, 1980; MUÑOZ, 1990).

Investigações em diferentes extratos relataram suas propriedades antivirais (KOTT *et al.*, 1999), antimicrobianas (PENNA *et al.*, 2001). Diferentes autores encontraram como resultado em ensaios com a *L. molleoides*, o resultado de compostos que possuem atividades citotóxicas, estes atuando na alteração ou destruição de células (FERNANDEZ *et al.*, 2002; RUFFA *et al.*, 2002).

Os compostos de diferentes extratos de *Lithraea molleoides* e de *Lithraea brasiliensis* foram caracterizados como derivados de pirocatecol, o mas dentre as substâncias que foram isoladas, muitas ainda não foram totalmente identificadas (ALÉ *et al.*, 1997).

As substâncias alergênicas contidas na resina dessas plantas, são comumente conhecidas como urushiol, são um grupo de catecóis diferindo principalmente no comprimento e grau de insaturação das suas cadeias alquílicas laterais (SELVA, *et al.*,1997).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PROCEDIMENTOS FITOQUÍMICOS

O experimento foi realizado nos Laboratórios de Química e Fitopatologia da Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Curitibanos, localizada às margens da Rodovia Municipal Ulysses Gaboardi, km 3, em Curitibanos - SC.

Inicialmente foi realizada a coleta de folhas de Aroeira Brava (*Lithraea molleoides*) e Bugreiro (*Lithraea brasiliensis*) no primeiro semestre de 2015. Coletadas na mata nativa da região de Curitibanos SC localizada a 27° 16' 16,52'' S de latitude e a 50° 30' 15,15'' W de longitude e na mata nativa de Frei Rogério SC a 27° 10' 24'' S de latitude e longitude de 50° 48' 16'' W, respectivamente. O próximo procedimento foi a identificação botânica, realizada com o auxílio do Professor Dr. José Floriano Barea Pastore.

O material coletado foi identificado com base em exsiccatas contidas no herbário da UFSC Curitibanos, e posteriormente seco a 40° C durante 48 hrs. O material seco foi então moído em centrífuga de alimentos para a preparação dos extratos.

3.2 PREPARO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES

3.2.1 Extrato hidroalcoólico bruto

Para a preparação dos extratos hidroalcoólicos brutos de *L. molleoides* e *L. brasiliensis* foi utilizado o mesmo processo baseado na maceração em etanol 92° INPM. O material seco e moído (76 g *L. molleoides* e 94 g de *L. brasiliensis*) foi submetido à maceração utilizando etanol 92° INPM por um período de uma semana em temperatura ambiente. O etanol é satisfatório para uma preliminar extração (DI STASI, 1996).

A mistura do material vegetal com etanol foi filtrada através de papel filtro e o solvente foi submetido à evaporação à pressão reduzida utilizando um rotaevaporador, com banho de água controlado à temperatura igual ou inferior à 40 °C.

O álcool recuperado desta destilação foi reutilizado para uma segunda maceração de uma semana. O resíduo após evaporação do solvente foi reservado. Este procedimento foi repetido por quatro vezes até a massa do resíduo resultante no fundo do balão volumétrico, após a evaporação, ser praticamente zero.

Os resíduos obtidos após cada uma das evaporações foram reunidos e secos sob ventilação de secador de cabelos e em dessecador obtendo-se 14,89 g de extrato hidroalcoólico bruto (EHB) de *L. brasiliensis* e 12,09 g de EHB de *L. molleoides* ambos na forma de resíduo pastoso na coloração verde-escuro.

3.2.2 Obtenção das frações

Uma porção do EHB (9,08 g) de *L. brasiliensis* e uma porção do EHB (7,2 g) de *L. molleoides* foi redissolvida em 100 mL de uma solução aquosa a 20% com etanol e colocada em um funil de separação. À esta solução, adicionou-se 50 mL de hexano. A mistura foi agitada e a fase orgânica foi separada. À fase aquosa foi adicionado mais 50 mL de hexano e o procedimento foi repetido mais uma vez (total de solvente: $3 \times 50 = 150$ mL). As fases orgânicas foram reunidas, secas com sulfato de sódio anidro, filtradas e o solvente foi evaporado rendendo 0,503 g após totalmente seca, de um resíduo pastoso escuro identificado como fração solúvel em hexano de *L. brasiliensis* e 0,63 g de *L. molleoides*, os processos foram feitos primeiramente com *L. brasiliensis* e posteriormente com *L. moleoides*.

Após ter sido obtido no processo anterior a fração solúvel em hexano, realizou-se o processo para a obtenção da fração solúvel em acetato de etila através do mesmo procedimento relatado anteriormente, apenas trocando o solvente anterior pelo solvente acetato de etila. As massas utilizadas foram distintas, devido a obtenção de diferentes concentrações no procedimento anterior.

Nesta fase a obtenção de todos compostos solúveis em acetato de etila foi mais demorada, pois a separação das fases foi bem lenta, já a quantidade de solvente adicionada foi maior, pela demanda de realizar o processo diversas vezes (quatro) totalizando 200 mL de solvente. As fases orgânicas foram reunidas, secas com sulfato de sódio anidro, filtradas e o solvente foi, de igual forma, evaporado. A massa deste rendeu em 3,046 g de um resíduo pastoso escuro de *L. brasiliensis* e 0,36 g

de *L. molleoides*. As frações foram identificadas como solúveis em acetato de etila, após totalmente secas.

Após a eliminação dos solventes, conseguiu-se obter a fase aquosa separada uma da outra, devido as diferentes solubilidades dos solventes utilizados, por extração líquido-líquido após o processo, qual ocorreu o contato dos solventes e realização de agitação lenta. O solvente foi recuperado e guardado para uso em outros procedimentos do laboratório e a fração aquosa mantida no dessecador. Após estes procedimentos os extratos de todas as frações foram mantidos no dessecador que é uma vidraria que contem um agente de secagem, no caso sílica, para diminuir a umidade, fechado com sua tampa vedante, até o momento de utilização nos ensaios *in vitro*.

A estratégia utilizada para investigar a atividade fungitóxica está baseada na preparação do EHB e frações baseadas na diferença de solubilidade dos componentes em solventes como hexano, acetato de etila e água. Os extratos são então avaliados quanto a atividade fungitóxica e as frações mais ativas normalmente são investigadas com maiores detalhes orientando o isolamento de compostos ativos puros.

Na produção dos extratos vegetais utilizou-se da seguinte ordem de preparação: coleta, preparação do material vegetal com a secagem e moagem, extração com etanol, concentração dos extratos com evaporação do etanol, obtendo nesta fase o EHB, fracionamento dos extratos com solventes de distintas polaridades (obtendo as frações solúveis em hexano, acetato de etila e fração aquosa), estas sendo visualmente demonstradas abaixo (figura 1 e figura 2), de ambas espécies, secagem e armazenamento para posterior aplicação nos ensaios com o agente causal da antracnose da videira *in vitro* (MOREIRA *et al*, 2008; COSTA, 1986).

Os fluxogramas abaixo apresentam a sequência de extrações para melhor visualização e entendimento dos resultados obtidos:

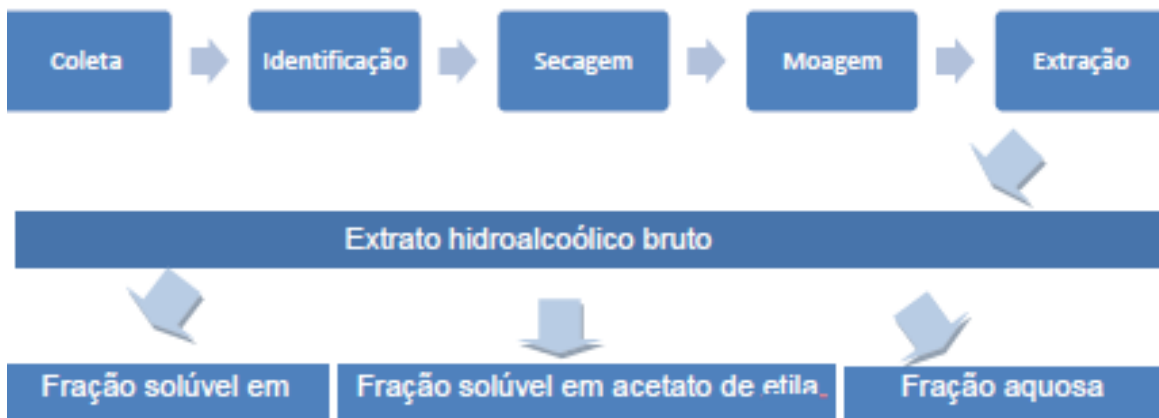


Figura 1. Fluxograma da obtenção dos extratos de *L. brasiliensis*.

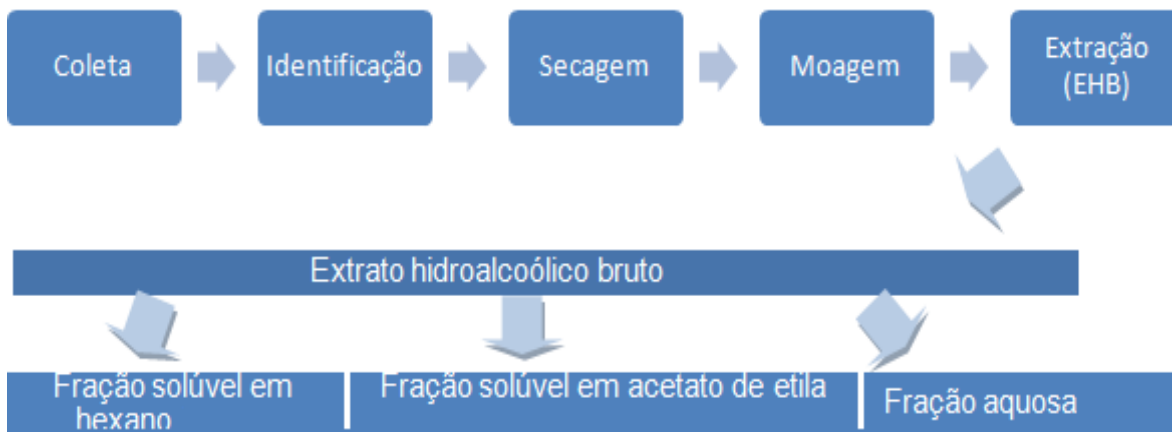


Figura 2. Fluxograma da obtenção dos extratos de *L. molleoides*.

3.3 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Na instalação dos ensaios utilizou-se para a preparação do meio de cultura 15,6 g de BDA (Batata-Dextrose-Ágar) adicionado em um recipiente, antibiótico e água (400 mL), sendo este dividido em cada tratamento (ficando cada tratamento com 100 mL) e agitou-se cada recipiente (sendo quatro recipientes, devido ao número de tratamentos) para homogeneização, por cerca de dez segundos (até a visualização de aspecto homogêneo) à temperatura ambiente.

Este procedimento de preparo do meio de cultura foi o mesmo para todos os tratamentos, exceto o tratamento de *L. molleoides* na fração solúvel em acetato de etila, quais os procedimentos foram descritos ao decorrer deste trabalho.

3.3.1 Ensaios com autoclavagem do extrato

O primeiro ensaio foi realizado com a fração solúvel em acetato de etila de *L. molleoides*. Previamente foi preparado 180 mg de extrato (solúvel em acetato de etila), na qual uma alíquota de 5 mL da solução 1,8 mg/mL foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL o qual foi completado com água destilada para a preparação de uma solução mais diluída a 0,9 mg/mL. Uma terceira solução mais diluída foi preparada transferindo uma alíquota de 5 mL da solução 0,9 mg/mL para um balão volumétrico de 10 mL, o qual foi completado para 10 mL com água destilada, para preparar uma solução 0,45 mg/mL.

No meio de cultura acrescentou-se volume de solução suficiente para as concentrações de: 0,16 mg/mL, 0,08 mg/mL e 0,014 mg/mL da solução com o extrato na fração solúvel em acetato de etila, respectivamente e a testemunha apenas com o meio, ambos em recipientes separados (Cada tratamento continha 100 mL de solução com BDA), então ficando a solução final que continha os extratos com (110 mL).

Com a fração solúvel em acetato de etila de *L. brasiliensis* inicialmente foi realizado a pesagem de 500 mg de extrato (solúvel em acetato de etila) da fração e foi preparado uma solução aquosa de concentração 5mg/mL. Esta solução foi diluída em outras duas soluções obtendo-se uma solução aquosa da fração solúvel em acetato de etila de concentração 1,6 mg/mL e outra de concentração 0,90 mg/mL.

No meio de cultura acrescentou-se estas concentrações 0,45 mg/mL, 0,22 mg/mL, 0,11 mg/mL respectivamente, e a testemunha apenas com o meio. Ambos em recipientes separados (Cada tratamento continha 100 mL de solução com BDA), então ficando a solução final que continha os extratos com (110 mL). Neste procedimento a diluição foi demorada pelo extrato ser de baixa solubilidade em

água, realizou-se a agitação deste no meio de cultura ainda no estado líquido, agitando-o pré e pós autoclavagem para melhor dissolução do extrato.

Na fração solúvel em hexano, previamente foi preparado 300 mg de extrato (solúvel em hexano de *L.molleoides*), aonde uma alíquota de 5 mL da solução 3 mg/mL foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL o qual foi completado com água destilada para a preparação de uma solução mais diluída a 1,5 mg/mL. Uma terceira solução mais diluída foi preparada transferindo uma alíquota de 5 mL da solução 1 mg/mL para um balão volumétrico de 10 mL, o qual foi completado para 10 ml com água destilada, para preparar uma solução 0,5 mg/mL.

No meio de cultura acrescentou-se volume de solução suficiente para as concentrações de 0,27 mg/mL, 0,13 mg/mL, 0,06 mg/mL, respectivamente, da solução com o extrato, e a testemunha apenas com o meio, ambos em recipientes separados.

3.3.2 Extrato diluído em 5% de DMSO

Neste ensaio foi preparada uma solução utilizando 240 mg da fração solúvel em hexano de *L. brasiliensis* com uma solução com DMSO. A solução feita com o DMSO foi de 5% v/v de DMSO em água destilada. Para o preparo de 100 mL de solução, foi adicionado no balão volumétrico de 100 mL e transferiu-se 5 mL de DMSO para este balão, e então completou-se com água destilada até a marca de 100 mL do balão volumétrico, e repetiu-se o procedimento de distribuição das alíquotas. Obtendo uma solução com concentração 2,4 mg/mL e um volume final de 110 mL, as concentrações foram de 0,21 mg/mL, 0,10 mg/mL, 0,05 mg/mL respectivamente e a testemunha apenas com o meio.

3.3.3 Inoculação do *S. ampelinum*

Para a realização do procedimento de inoculação do fungo no meio, o material utilizado para a realização dos ensaios, como as vidrarias, placas de Petri, os frascos contendo meios de cultura com os extratos em diferentes concentrações, material para preparo dos tratamentos, foram autoclavados (120°C por 30 minutos) para evitar contaminação bacteriana e posteriormente em câmara asséptica de fluxo

laminar transferiu-se o meio para as placas de petri. Enquanto solidificava o meio, as placas de Petri foram identificadas com numeração e detalhes do tratamento utilizado em cada uma.

Após a solidificação pequenos discos com meio de cultura contendo micélios do *S. ampelinum* previamente isolado, foram transferidos para as placas de Petri com o BDA contendo o extrato e antibiótico, e de igual forma para placas contendo o BDA apenas, esta sendo configurada como a testemunha (NOZAKI, M.H; CAMARGO, M; BARRETO, M., 2004).

Após este procedimento, cada placa de Petri foi vedada e levada para B.O.D qual é uma câmara climatizada, os tratamentos ficaram sob temperatura de 22°C – 25°C à 12 horas por dia de fotoperíodo, sendo distribuídos aleatoriamente nesta. Em ambos os ensaios a avaliação do crescimento micelial do *S. ampelinum* foi feita através da observação do desenvolvimento do referido fungo através de medição, com a média obtida através de medidas opostas diametralmente, estas realizadas diariamente, considerando um dia após o procedimento de aplicação das frações, tomando-se como padrão o crescimento no meio sem *L. brasiliensis* e *L. molleoides*. Estas foram realizadas até as colônias fúngicas cobrirem totalmente a superfície do meio de cultura.

3.3.4 Extrato filtrado com membrana

Neste ensaio foi utilizada a fração aquosa de *L. molleoides*, no desenvolvimento *in vitro* do fungo, com outro procedimento, não sendo autoclavado com o meio, para verificar-se a eficiência do extrato em dose maior e verificar também a possibilidade de maior controle micelial com este método, acreditando-se que a autoclavagem pode em alguns casos degradar substâncias que podem ter efeito benéfico no controle de doenças.

Previamente foi preparado 160 mg de extrato (fração aquosa) utilizando esta massa total, dissolvendo-a no mínimo de água mili-Q possível e transferidos para um balão volumétrico de 10 mL. O volume foi então completado para 10 mL. Uma alíquota de 4 mL desta primeira solução foi transferida para outro balão volumétrico de 10 mL e o volume foi então aferido para 10 ml com água mili-Q. Uma terceira solução mais diluída foi preparada transferindo-se 4 mL da segunda solução para

outro balão volumétrico de 10 mL e completando o volume para 10 mL com água mili-Q. estas soluções obtidas foram usadas, adicionando-as nas placas de petri, sendo as concentrações de 1,6 mg/L, 0,64 mg/L e 0,25 mg/L e a testemunha apenas com o meio.

Na preparação do meio de cultura deste, utilizou-se 15,6 g de BDA em 400 mL de água, e foi levado para esterilização nas mesmas condições de autoclavagem dos ensaios descritos anteriormente. O extrato foi esterilizado utilizando o método de filtração com membrana Millipore 0,22 μ , usado para evitar contaminações bacterianas, Em câmara asséptica de fluxo laminar. O BDA esterilizado previamente foi acrescido de antibiótico e vertido em placas de Petri, qual se esperou solidificar.

Logo após este procedimento, foi repicado para o centro da placa de Petri, um disco de meio de cultura contendo micélio do fungo (obtido do ensaio realizado anteriormente) e as placas foram vedadas e levadas para B.O.D, sendo distribuídas aleatoriamente. A medição foi realizada conforme descrito anteriormente.

As frações obtidas foram utilizadas para preparar as soluções a serem testadas quanto a atividade fungitóxica contra o fungo *S. ampelinum*. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, devido a ser realizado em ambiente controlado. Nos testes estatísticos foi utilizada a metodologia descrita por BASTOS (1997). Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro tratamentos e cinco repetições, para ambos os ensaios. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e ao teste de Tukey à 5%, foi realizada análise de regressão. A análise de variância foi realizada utilizando o software estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As espécies utilizadas para avaliação de seus extratos no controle do *S. ampelinum* foram a *L. molleoides* e *L. brasiliensis* pelas atividades que elas apresentam em humanos, pois acreditou-se que poderiam apresentar outras substâncias quais tivessem compostos que poderiam vir a controlar doenças fúngicas em plantas. Dentre as atividades que estas apresentam podemos citar a *L. molleoides* que apresenta atividade antimicrobiana, antiviral e citotóxica (RUFFA *et al.*, 2002).

Não há relatos da aplicação de extratos tanto de *L. molleoides* quanto de *L. brasiliensis* no controle de doenças de videiras *in vitro*. Os compostos de diferentes extratos de *L. molleoides* e de *L. brasiliensis* foram caracterizados como derivados de pirocatecol, mas não foram totalmente identificados, tendo poucos estudos sobre seus compostos (ALE *et al.*, 1997).

Na obtenção dos extratos de *L. brasiliensis* e *L. molleoides* conseguiu-se com sucesso as frações requeridas, inicialmente obtendo o EHB de ambas as espécies e deste obteve-se as frações: solúvel em hexano, a fração solúvel em acetato de etila e a fase aquosa. Estas obtidas a partir de extração líquido-líquido utilizando hexano e acetato de etila.

As quantidades obtidas foram: 14,89 g de extrato hidroalcoólico bruto (EHB) (19,59% rendimento da massa de EHB em relação à massa seca) de *L. brasiliensis*, 12,09 g de EHB (15,11% rendimento da massa de EHB em relação à massa seca) de *L. molleoides*.

Na fração solúvel em hexano obteve-se 0,503 g de *L. brasiliensis* e 0,63 g nesta mesma fração de *L. molleoides*. Obteve-se também 3,046 g de *L. brasiliensis* e 0,36 g de *L. molleoides*, nas frações solúveis em acetato de etila. Na fase aquosa de *L. molleoides* obteve-se 1,6 g e em *L. brasiliensis* 0,203 g.

Pela análise de variância (ANOVA) o crescimento micelial de *S. ampelinum* (Tabela 1) não apresentou diferença significativa em nenhuma concentração da fração solúvel em acetato de etila de *L. molleoides*, em comparação com a testemunha (sem adição de extrato). De igual forma a fração solúvel em hexano não

demonstrou diferença significativa entre os tratamentos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey 5%.

Tabela 1. Crescimento micelial (média do crescimento final obtido nos tratamentos em cm) do *S. ampelinum*, após tratamento com diferentes concentrações de extrato de *L. molleoides* nas frações solúveis em acetato de etila e hexano.

Extratos de <i>L. molleoides</i>	Conc.	Fração	Conc.	Fração
	(mg/mL)	Ac. Etila	(mg/mL)	Hexano
	0	6,87 a	0	7,43 a
Autoclavados com o meio	0,014	6,27 a	0,06	7,79 a
	0,08	6,20 a	0,13	7,50 a
	0,16	6,62 a	0,27	7,33 a

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O resultado obtido pode ter sido devido à autoclavagem em alta temperatura. Venturoso *et al.* (2010) afirmaram que o extrato autoclavado juntamente com o meio de cultura à 120° não apresentou inibição, no controle do *Fusarium solani* quando comparado com o extrato adicionado ao meio após a autoclavagem.

Outro fator que pode ter interferido no resultado obtido, é a parte da planta coletada, neste trabalho foi utilizado somente folhas, em ambas as espécies avaliadas. Lopes *et al.* (2003) testaram o efeito citotóxico de *Lithraea brasiliensis* e *Lithraea Molleoides* em linhagens celulares advindas de tumores humanos e obtiveram resultados positivos para atividade citotóxica em ambas espécies nos galhos e folhas de *L. brasilliensis* e em galhos de *L. molleoides*.

Os extratos na fração em acetato de etila de *L. brasiliensis* (Tabela 2) não apresentaram diferença significativa pela análise de variância. Yin & Tsao (1999) relatam que a temperatura qual o extrato foi obtido interfere na eficiência do mesmo, havendo em determinadas temperaturas a decomposição de componentes antifúngicos presentes no mesmo. Os extratos deste trabalho foram obtidos em temperatura ambiente.

Tabela 2. Crescimento micelial (média do crescimento final obtido nos tratamentos em cm) do *S. ampelinum* após tratamento com diferentes concentrações de extrato de *L. brasiliensis* na fração solúvel em acetato de etila e na fração solúvel em hexano (este último com DMSO).

Extratos de <i>L. brasiliensis</i>	Conc. (mg/mL)	Fração Ac. Etila	Conc. (mg/mL)	Fração Hexano
Autoclavados com o meio	0	6,10 a	0	7,65 c
	0,11	5,68 a	0,05	7,77 c
	0,22	5,78 a	0,10	5,38 b
	0,45	6,09 a	0,21	0,74 a
			DMSO	0,64 a

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O crescimento micelial de *S. ampelinum* testado na fração solúvel em hexano de *L. brasiliensis* apresentou diferença significativa, na fração solúvel em DMSO (5% v/v em água destilada) e nas frações de extrato que o continham. O DMSO foi utilizado neste trabalho apenas na diluição do extrato de *L. brasiliensis* na fração solúvel em hexano, por ser um solvente, característico polar, este foi aplicado devido à dificuldade de diluição especificamente deste extrato.

Na tabela acima, foi testado um bloco com o meio contendo apenas o DMSO, para verificação de qual sua ação no crescimento micelial afim de, confirmar que este não interferiria no resultado, mas conforme análise estatística verificou-se que este interferiu, de modo que controlou o crescimento micelial. Benfatti *et al.* (2010) obtiveram um resultado similar, testaram em extratos de plantas a atividade microbiana com DMSO e no tratamento que continha apenas DMSO, obtiveram resultado inibitório ao crescimento sobre os micoplasmas.

Há diversos diluentes que podem ser empregados neste processo de diluição, como o dimetil sulfóxido (DMSO), a dimetil formamida (DMF), a N-metil pirrolidinona (NMP),- a 1,3-dimetil --2-imidazolidinona (DMI) (BARBOSA *et al.*, 2003). Destes o solvente utilizado neste trabalho foi o DMSO.

O experimento com *L. brasiliensis* foi encerrado ao obter as medidas finais, mas não foi realizada a contagem de esporos, devido à reação alérgica causada na autora deste trabalho, devido a realização dos ensaios em câmara de fluxo laminar, onde há um contínuo fluxo de ar para evitar a contaminação, este causou o fluxo de compostos do extrato de *L. brasiliensis* no ar, assim provocando efeitos alergênicos. Em ambos os ensaios com *L. brasiliensis*, os efeitos alergênicos causaram reação,

somente na autora. As demais pessoas envolvidas no processo de confecção dos ensaios e também as pessoas que circulavam pelo laboratório não apresentaram nenhuma reação à esta planta.

Pereira *et al.* (2006) avaliaram o efeito inibitório do alecrim (*Rosmarinus officinalis*) na forma de óleo essencial sob fungos (*Aspergillus ochraceus*, *Fusarium* sp, *Aspergillus flavus*), e observaram a inibição do desenvolvimento micelial, conforme o aumento das dosagens. Como a *L. brasiliensis* o *Rosmarinus officinalis* também pode provocar reações alérgicas, em sua composição há presença de flavonoides quais são compostos (Ar-C3) por condensações de unidades discarbonadas (BRUNETON, J. 2001). Em dosagens elevadas pode até provocar morte se ingerido, causa espasmos, irritação nervosa, aborto, sonolência e outros (LORENZI, H.; MATOS, F., 2002).

Resultados semelhantes foram obtidos por Bonamonte *et al.* (2001) qual observaram quadro de dermatite causada pelo contato com a hortelã (*Mentha* sp). Lorenzi & Matos (2002) observam que a hortelã possui propriedades tanto antibacterianas quanto antifúngicas, além de ser utilizada como tratamento de inúmeras doenças na medicina.

O extrato de *L. molleoides* na fração aquosa apresentou resultado contrário ao esperado (Tabela 3), demonstrando um estímulo no desenvolvimento micelial. O resultado obtido pode ser devido à presença de componentes presentes no extrato quais podem ter sido fonte de nutrientes para o fungo, como já visualizado em hidrolatos de plantas com efeito curativo (FRANZENER *et al.*, 2007).

Tabela 3. Crescimento micelial (média do crescimento final obtido nos tratamentos em cm) do *S. ampelinum* após tratamento com diferentes concentrações de extrato de *L. molleoides* na fração aquosa.

Extratos de <i>L. molleoides</i>	Conc. (mg/mL)	Fração
		Aquosa
	0	4,32 a
Filtrado com membrana	0,25	7,26 b
	0,64	7,54 b
	1,6	7,76 b

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Romanazzi *et al.* (2006) afirmam que alguns compostos presentes nas plantas podem induzir a atividade de enzimas e respostas biológicas relacionadas aos mecanismos de defesa. Aziz *et al.* (2006) cita essa capacidade de indução em videiras. Podendo assim os compostos presentes na *L. molleoides* e na *L. brasiliensis* serem ativos ao serem aplicados diretamente na videira, e não na aplicação direta ao agente causal.

Com os resultados observados no presente trabalho, pode-se verificar que os extratos tanto de *L. molleoides* e de *L. brasiliensis*, não apresentam eficiência sobre o crescimento micelial de *S. ampelinum in vitro*, nas doses testadas.

5 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos na realização deste trabalho pode-se concluir que:

Os extratos de *L. brasiliensis* e *L. molleoides* nas frações solúveis em acetato de etila, hexano e aquosa foram obtidos com sucesso.

Os extratos de *L. brasiliensis* e *L. molleoides* nas frações solúveis em acetato de etila, hexano e aquosa não controlaram o agente causal da antracnose da videira *in vitro*, nas concentrações testadas.

O DMSO inibiu o crescimento micelial do *S. ampelinum*.

O extrato de *L. molleoides* na fração solúvel em acetato de etila apresentou um aumento do crescimento micelial do fungo reportado, servindo como provável substrato para o fungo.

REFERÊNCIAS

ALÉ, S. I.; *et al.* Allergic Contact Dermatitis Caused by *Lithraea molleoides* and *Lithraea brasiliensis*: Identification and Characterization of the Responsible Allergens. **American Journal Of Contact Dermatitis: Official Journal of The American Contact Dermatitis Society**. Montevideo, p. 144-149. Set. 1997. Disponível em: <http://journals.lww.com/dermatitis/Abstract/1997/09000/Allergic_Contact_Dermatitis_Caused_by_Lithraea.4.aspx>. Acesso em: 17 set. 2014.

AMORIM, L *et al.* **Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Ceres, v. 2. p. 639-652. 2005.

AZIZ, A.; TROTEL-AZIZ, P.; DHUICQ, L.; JEANDET, P.; COUDERCHET, M.; VERNET, G. Quitosana e sulfato de cobre induzem reações de defesa e resistência ao mofo cinzento e míldio em videira. **Fitopatologia**, São Paulo. v. 96, n. 11, p. 1188-1194, 2006.

BARBOSA, L.C.A., Química Orgânica, uma introdução para as ciências agrárias e biológicas, Editora UFV, 2003.

BASTOS, C.N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipelis* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p.441-443, 1997.

BENFATTI, C.S.; *et al.* Atividade antibacteriana *in vitro* de extratos brutos de espécies de *Eugenia* sp frente a cepas de mollicutes. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.1, n.2, p.33-9, 2010.

BOTELHO, R. V.; *et al.* Efeito do extrato de alho na quebra de dormência de gemas de videiras e no controle *in vitro* do agente causal da antracnose (*Elsinoe ampelina* Shear). **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 31, n. 1, p.96-102, 2009.

BRUNETON, J. **Farmacognosia Fitoquímica**. Plantas Medicinales. Ed.I ACRIBIA S.A/ Zaragoza, Espanha, 2. ed , 1099 pg., 2001.

BONAMONTE, D. *et al.* Allergic contact dermatitis from *Mentha spicata*. **Contact Dermatitis**. 2001.

CAMARGO, U. A.; Cultivares para a viticultura tropical no Brasil. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 19, n. 194, p.15-19, set. 1998.

CAMARGO, U. A.; MAIA, J. D. G.; RITSCHER, P. ; **Embrapa Uva e Vinho: novas cultivares brasileiras de uva**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2010. 64 p.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1986. v. 1, 1031 p.

DI STASI, L. C.; **Plantas medicinais: arte e ciência**. Editora Unesp, 1996, P. 125, 129-155.

EMBRAPA: **Controle alternativo**. Brasília: Embrapa, 2005. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_23_299200692526.html>. Acesso em: 30 set. 2014.

FERREIRA, D.F.;. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia (UFLA)**, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FERNANDEZ T *et al.* Immunomodulating properties of Argentine plants with ethnomedicinal use. **Phytomedicine**. v. 9, p. 546–552. 2002.

FRANZENER, G.; *et al.* Atividades antibacteriana, antifúngica e indutora de fitoalexinas de hidrolatos de plantas medicinais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 1, p.29-38, mar. 2007.

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

GALLOTTI, G.J.M.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; SONEGO, O.R. Controle das doenças da videira. In: ZAMBOLIM, L *et al.* **Controle de doenças de plantas frutíferas**- Vicosa: Suprema Gráfica e Editora, p.939-985. 2002.

GIOVANNINI, E. **Produção de uvas para vinho, suco e mesa**. Porto Alegre: Renascença, 2008, 364p.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em:<<http://www.sidra.ibge.gov.br>> Acesso em: 08 set. 2014.

KIMATI, H.; GALLI, F. Doenças da videira. In: KIMATI, H; AMORIM, L; A BERGAMIN FILHO,. **Manual de fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Ceres, 1997. Cap. 67. p. 693-695.

KOTT, V *et al.* Antiviral activity in Argentine medicinal plants. **J Ethnopharmacology**. p.79–84. Jan.1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10075125>>. Acesso em: 17 set. 2014.

LEITE, C. D.; BOTELHO, R. V.; FARIA, C. M. D. R.; MAIA, A. J. Efeitos do extrato de alho sobre agentes causais da antracnose (*Elsinoe ampelina*) e da escoriose (*Phomopsis viticola*) da videira. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n. 2, p.1409- 1412, 2009.

LEROUX, P.; CLERJEAU, M. Resistance of *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola* to fungicides in the French vineyards. **Crop Protection**, v.4, n.2, p.137-160, 1985. Disponível em: <[http://www.researchgate.net/publication/248415710_Resistance_of_Botrytis_cinerea_Pers._and_Plasmopara_viticola_\(Berk._Curt.\)_Berl._and_de_Toni_to_fungicides_in_French_vineyards.](http://www.researchgate.net/publication/248415710_Resistance_of_Botrytis_cinerea_Pers._and_Plasmopara_viticola_(Berk._Curt.)_Berl._and_de_Toni_to_fungicides_in_French_vineyards.)>. Acesso em: 18 set. 2014.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2002, 512p.

LOPES, R. M.; *et al.* Avaliação da atividade citotóxica de *Lithraea brasiliensis* e *Lithraea molleoides*. **Revista de ciências ULBRA**. n. 2 (2003).

MARINI, D. *et al.* Efeito antifúngico de extratos alcoólicos de própolis sobre patógenos da Extrato etanólico de própolis Rev. **Bras. de Agroecologia**. 8(1): 170-178 (2013) 177 videira. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v.79, n.2, p.305-308, 2012.

MEINERZ, C.C *et al.* Atividade elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja por derivados de avenca (*Adiantum capillus-veneris* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, n.2, p.26-31, 2008.

MOREIRA, C. G. A., Caracterização parcial de frações obtidas de extratos de *Cymbopogon nardus* com atividade elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja e efeito sobre *Colletotrichum lagenarium*. **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v. 34, n. 4, p. 332-337, 2008.

MUÑOZ, J. Usos principales de las especies de Anacardiaceae, Particularmente del Paraguay. **Candollea**, v. 45, p. 671-680. 1990. Disponível em: <<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=19815117>>. Acesso em: 27 set. 2014.

NOZAKI, M.H., CAMARGO, M. & BARRETO, M. Caracterização de *Diaporthe citri* em meios de cultura e diferentes condições de temperatura e luminosidade. **Fitopatologia Brasileira** 29:429-432. 2004.

PEARSON, R.C.; GOHEEN, A.C. **Compendium of Grape Disease**. St. Paul: APS Press. 1988. 121 p.

PENNA, C. *et al.* Antimicrobial activity of Argentine plants used in treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. **Journal Ethnopharmacology**, v. 77, p. 37-40. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11483376>>. Acesso em: 02 out. 2014.

PEREIRA, C.P. *et al.* Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciênc.Agrotec**.v.30,n.4,p.731-738, jul/ag.,2006.

RODRIGUES, E. *et al.* Atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de alface em sistema de cultivo orgânico contra *Sclerotinia sclerotiorum* pelo extrato de gengibre. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 2, p. 124-128, 2007.

ROMANAZZI, G.; NIGRO, F.; IPPOLITO, A.; DIVENERE, D.; SALERNO, M. Efeito do pré e pós-colheita com tratamento com quitosana para controlar mofo cinzento no armazenamento de uvas de mesa. **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 6, p. 1425- 1430, 2010.

RUFFA, M. J. *et al.* Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. **Journal of Ethnopharmacology**, v.79, n.3, p.335-339, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874101004007>>. Acesso em: 22 set. 2014.

SALES, A. L. **Estudo de extratos vegetais e bagaço de cana-de-açúcar na desinfecção de águas residuárias**. Campina Grande-PB. 99p. 2004. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874101004007>>. Acesso em: 22 set. 2014>. Acesso em: 27 set. 2014.

SALLES, A. L.; RECH, N.L. Efeito de Extratos de Nim (*Azadiractha indica*) e Cinamomo (*Melia azedarach*) sobre *Anastrepha fraterculus* (Wied.). **Revista Brasileira de Agrociência**, v.5, n.3, p.225-227, 1999.

SELVA ,I *et al.* Allergic Contact Dermatitis Caused by *Lithraea molleoides* and *Lithraea brasiliensis*: Identification. **American Journal of Contact Dermatitis**, v.8, n.3, p.144-149. 1997. Disponível em:< <http://www.sciencedirect.com/science/journal/1046199X/8/3>>. Acesso em: 20 set. 2014.

SILVA, C. M *et al.* Controle alternativo do míldio e da antracnose da videira com extrato aquoso de cinamomo e óleo vegetal. **Arq. Inst. Biol.** São Paulo, v.79, n.4, p.587-594, dez. 2012.

SILVA, D. P.; TRECENTE, V .C.; BOSQUÊ, G. G. Produção de laranja orgânica no Brasil. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, n. 12, 2007. Disponível em: <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/xcmHXQ2nQiTj7Lf_2013-5-3-14-58-24.pdf>. Acesso em: 17 set. 2014.

SINGH, U.P. *et al.* G.D. Control of powdery mildew of pea by ginger extract. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 44, p. 55-59, 1991.

SÔNEGO, O. R.; GARRIDO, L. R.; GRIGOLETTI JUNIOR, A. Doenças fúngicas. In: FAJARDO, T. V. M. (Ed.). Uva para processamento: fitossanidade. Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**, 131p. 2003.

SÔNEGO, O. R.; GARRIDO, L. R.; JUNIOR GRIGOLETTI, A. Principais doenças fúngicas da videira no Sul do Brasil. **Circular Técnica Embrapa Uva e Vinho**, 2005. Disponível em: <[http:// www.cnpuv.embrapa.br/publica/circular/cir056.pdf](http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/circular/cir056.pdf)>. Acesso em: 26 set. 2014.

TOURSARKISSIAN M. **Plantas Medicinales de la Argentina**. Hemisferio Sul: Buenos Aires. 1980.

VENTUROSO, L.R. *et al.* Influência de diferentes metodologias de esterilização sobre a atividade antifúngica de extratos aquosos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.4, p.499-505, 2010.

YIN, M.; TSAO, S.M. Inhibitory effect of seven *Allium* plants upon three *Aspergillus* species. **International Journal of Food Microbiology**, v.49, n.1-2, p.49-56, 1999.