

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
COORDENAÇÃO DE ENGENHARIA AMBIENTAL  
CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL

SAMUEL ANTONIO DE ALMEIDA

**UTILIZAÇÃO DOS EXTRATOS DE *Stryphnodendron adstringens* e  
*Allamanda cathartica* L. NO CONTROLE FITOPATOGÊNICO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO

2016

SAMUEL ANTONIO DE ALMEIDA

**UTILIZAÇÃO DOS EXTRATOS DE *Stryphnodendron adstringens* e  
*Allamanda cathartica* L. NO CONTROLE FITOPATOGÊNICO**

Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso II (TCC II), do curso de Engenharia Ambiental, da Coordenação de Engenharia Ambiental do Câmpus Campo Mourão da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof.: Dr. José Hilton Bernardino de Araújo.

CAMPO MOURÃO

2016

**TERMO DE APROVAÇÃO**  
**UTILIZAÇÃO DOS EXTRATOS DE *Stryphnodendron adstringens* e *Allamanda cathartica* L. NO CONTROLE FITOPATOGÊNICO**

Por

SAMUEL ANTONIO DE ALMEIDA

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em 24/06/2016 como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

---

Prof.: Dr. José Hilton Bernardino de Araújo.  
Orientador

---

Prof.a: Dra. Flavia Vieira da Silva Medeiros  
Membro Titular

---

Prof.: Dr. Miguel Angel Aparício Rodriguez.  
Membro Titular

O termo de aprovação assinado se encontra na Coordenação do Curso de  
Engenharia Ambiental

Dedico este trabalho aos meus pais, Severino e Auxiliadora, e a minha irmã Simone, por me incentivarem e apoiarem em todo esse percurso, me mostrando com amor e paciência como trilhar o meu caminho para alcançar meus objetivos pessoais e profissionais.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as oportunidades proporcionadas no decorrer do curso, Ele é responsável por toda calma e sabedoria em momentos difíceis e sempre guiou meu caminho.

Aos meus pais, por toda estrutura oferecida, que mesmo em dificuldades financeiras sempre foram favoráveis e firmes em seu comprometimento para que essa graduação fosse concluída.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Hilton Bernardino de Araújo, pela sabedoria com que me guiou nesta trajetória e todo apoio frente às adversidades.

Aos meus companheiros de trabalhos e do dia a dia: Bruno Vieira de Lacerda e Norton Spaniol que moraram comigo durante a graduação e que estiveram me apoiando com palavras, além de dividirem momentos que serão eternizados.

Aos meus amigos de turma: Bruno Henrique Bodini Bocardo, Beatriz Curci Barreto, Marcia Helena Sorreque Cardeal, Camila Valentim Blessa, Bianca Araujo Fachin, Camila Huber, entre outros, por estarem sempre presentes durante toda a graduação.

A minha namorada Nathaly Tauany Filla, por estar sempre ao meu lado em momentos felizes ou difíceis e por sempre saber o que falar nos momentos de angústia.

Enfim, a todos os que por algum motivo contribuíram para a realização desta pesquisa.

## RESUMO

O Brasil tem uma das vegetações mais diversificadas do mundo, em contrapartida, o país é um dos maiores consumidores de defensivos agrícolas, esse consumo exacerbado acaba gerando uma resistência nos patógenos, viabilizando a busca por métodos alternativos de controle de doenças. Existem na flora nacional diversas espécies que possuem princípios ativos, sendo de extrema importância que se façam pesquisas para confirmar os verdadeiros efeitos das plantas, apontando a utilização das mesmas como prospecção de incorporação de derivados vegetais em novos produtos. O objetivo deste trabalho foi determinar a atividade, antimicrobiana e atividade antifúngica presente nos extratos da casca de *Stryphnodendron adstringens* e das folhas e flores de *Allamanda cathartica* L. A capacidade antimicrobiana *in vitro* do extrato da planta foi testada em variedades de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os testes de sobre atividade antibacteriana foram realizados com difusão em disco com meio de cultivo Agar Müller Hinton, os testes de inibição foram realizados com soluções do extrato da planta dissolvido em cinco concentrações, sendo estas 0,01; 0,02; 0,05; 0,1 e 0,2. % (m/v). A solução do extrato de *Stryphnodendron adstringens* na concentração 0,2 % inibiu o crescimento da *Staphylococcus aureus*, com halo de inibição de 2,1 cm, para o extrato das flores de *Allamanda cathartica* L. o halo de inibição foi 0,90 cm e de 0,99 cm para o extrato das folhas. O halo de inibição para a bactéria *Escherichia coli* foi de 1,8 cm para extrato de *Stryphnodendron adstringens*, 0,79 cm para o extrato das flores e 0,92 cm para o extrato das folhas de *Allamanda cathartica* L. Para os testes de inibição antifúngica foram realizados em cinco concentrações, sendo elas 1; 2; 5; 10 e 20% (m/v), seguindo a mesma metodologia da difusão de discos. As soluções do extrato de *Stryphnodendron adstringens* foram as que apresentaram um melhor desempenho no combate antifúngico. O extrato diluído a concentração As soluções do extrato de *Stryphnodendron adstringens* foram as que apresentaram um melhor desempenho no combate antifúngico. O extrato diluído na concentração de 20% (m/v) apresentou inibição média de 96% das formações de colônias de *Aspergillus niger*, 78% para *Fusarium oxysporum* e 79% para *Colletotrichum gloeosporioides*. Os extratos das flores de *Allamanda cathartica* L., apresentaram inibição média de 72% das formações de colônias de *Aspergillus niger*, 74% para *Fusarium oxysporum* e 68% para *Colletotrichum gloeosporioides* e os extratos obtidos a partir das folhas apresentaram inibição média de 74% das formações de colônias de *Aspergillus niger*, 79% para *Fusarium oxysporum* e 71% para *Colletotrichum gloeosporioides*.

**Palavras-chave:** *Stryphnodendron adstringens*, *Allamanda cathartica* L., Atividade antimicrobiana, Atividade antifúngica

## ABSTRACT

Brazil has one of the most diverse vegetation in the world, however, the country is one of the largest consumers of agrochemicals, and this exacerbated consumption ends up generating a resistance to pathogens, enabling the search for alternative methods of disease control. In the national flora there are species that have different active ingredients, being extremely important to conduct research to confirm the true plants' properties, indicating the use of them as suggesting the incorporation of plants derived in new products. The objective of this study was to determine the activity, antimicrobial and antifungal activity present in the extracts of *Stryphnodendron adstringens* bark and leaves and flowers *Allamanda cathartica* L. The antimicrobial ability in vitro of the plant extract was tested in varieties of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The tests on antibacterial activity were carried out to disk broadcast medium Mueller Hinton agar cultivation, inhibition tests were conducted with the plant extract solutions dissolved in five concentrations, these being 0.01; 0.02; 0.05; 0.1 and 0.2. % (W / v). The solution of *Stryphnodendron adstringens* extract at 0.2% concentration inhibited the growth of *Staphylococcus aureus* with inhibition halo of 2.1 cm for the extract of flowers *Allamanda cathartica* L. The inhibition zone was 0.90 cm and 0.99 cm for the extract from the leaves. The inhibition zone for *Escherichia coli* was 1.8 cm *Stryphnodendron adstringens* extract, 0.79 cm for the extract of the flowers and 0.92 cm for the extract from the leaves *Allamanda cathartica* L. For inhibition tests antifungal were performed at five different concentrations, which were 1; 2; 5; 10 and 20% (w / v), following the same methodology diffusion disks. The solutions *Stryphnodendron adstringens* extract showed the best performance in combating anti-fungal. The extract diluted concentration *Stryphnodendron adstringens*. The extract solutions showed the best performance in combating anti-fungal. The diluted extract in a concentration of 20% (w / v) showed an average 96% inhibition of the formation of *Aspergillus niger* colonies, *Fusarium oxysporum* to 78% and 79% for *Colletotrichum gloeosporioides*. The extracts of the flower *Allamanda cathartica* L., showed an average inhibition of 72% of the formations of *Aspergillus niger* colonies, 74% for *Fusarium oxysporum* and 68% for *Colletotrichum gloeosporioides* and the extracts obtained from the leaves showed an average inhibition of 74% of *Aspergillus niger* colony formations, 79% for *Fusarium oxysporum* and 71% for *Colletotrichum gloeosporioides*

**Keywords:** *Stryphnodendron adstringens*, *Allamanda cathartica* L, antimicrobial activity, antifungal activity

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1:</b> Comparativo entre os extratos utilizados e diâmetros médios de inibição com o micro-organismo <i>Escherichia coli</i> . .....	23
<b>Gráfico 2:</b> Comparativo entre os extratos utilizados e diâmetros médios de inibição dos extratos aplicados nas placas com o micro-organismo <i>Staphylococcus aureus</i> . .....	25
<b>Gráfico 3:</b> Comparativo entre os extratos utilizados e diâmetros médios de inibição a concentração de 0,2 % (m/v). .....	26
<b>Gráfico 4:</b> Comparativo entre a porcentagem média de inibição dos extratos aplicados nas placas com o micro-organismo <i>Aspergillus niger</i> . .....	28
<b>Gráfico 5:</b> Comparativo entre a porcentagem média de inibição dos extratos aplicados nas placas com o micro-organismo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . .....	30
<b>Gráfico 6:</b> Comparativo entre a porcentagem média de inibição dos extratos aplicados nas placas com o micro-organismo <i>Fusarium oxysporum</i> . .....	32
<b>Gráfico 7:</b> Comparativo entre os extratos utilizados e percentual de inibição a concentração de 20%. .....	33

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Sintomas de antracnose em folhas de <i>Manguifera indica</i> (Mangueira).....	14
<b>Figura 2:</b> Sintoma de fusariose na região do tronco da planta. Fonte: EMBRAPA, 2003 .....	15
<b>Figura 3:</b> O mofamento dos grãos de sorgo. Fonte: EMBRAPA 2003 .....	16
<b>Figura 4:</b> Cepas inoculadas em meio BDA. (A - <i>Aspergillus niger</i> , B - <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ; C - <i>Fusarium oxysporum</i> ).....	21
<b>Figura 5:</b> Placa de Petri com o micro-organismo <i>Escherichia coli</i> , com o extrato de <i>Stryphnodendron adstringens</i> .....	24
<b>Figura 6:</b> Placa de Petri com o micro-organismo <i>Staphylococcus aureus</i> , com o extrato de <i>Stryphnodendron adstringens</i> .....	25
<b>Figura 7:</b> Placa de Petri com o micro-organismo <i>Aspergillus niger</i> , com o extrato de <i>Stryphnodendron adstringens</i> .....	29
<b>Figura 8:</b> Placa de Petri com o micro-organismo <i>Fusarium oxysporum</i> , com o extrato de <i>Stryphnodendron adstringens</i> . .....	32

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Diâmetros médios de inibição dos extratos aplicados nas placas com o micro-organismo <i>Escherichia coli</i> .....	22
<b>Tabela 2:</b> Diâmetros médios de inibição dos extratos aplicados nas placas com o micro-organismo <i>Staphylococcus aureus</i> .....	24
<b>Tabela 3:</b> percentuais de inibição dos extratos aplicados nas placas com o micro-organismo <i>Aspergillus niger</i> . ....	27
<b>Tabela 4:</b> Percentuais de inibição dos extratos aplicados nas placas com o micro-organismo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	29
<b>Tabela 5:</b> Percentuais de inibição dos extratos aplicados nas placas com o micro-organismo <i>Fusarium oxysporum</i> . ....	31

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>14</b>
3.1 ORGANISMOS UTILIZADOS.....	14
3.1.1 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	14
3.1.2 <i>Fusarium oxysporum</i> .....	15
3.1.3 <i>Aspergillus niger</i> .....	16
3.1.4 <i>Escherichia coli</i> .....	17
3.1.5 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	17
3.2 JUSTIFICATIVA DE ESTUDO .....	17
<b>4. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS</b> .....	<b>19</b>
4.1 CARACTERIZAÇÕES DO MATERIAL.....	19
4.2 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO.....	19
4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA .....	19
4.4 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS .....	20
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA .....	21
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>22</b>
5.1 RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO.....	22
5.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	22
5.3 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA .....	27
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>35</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>37</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil tem como um de seus atributos uma das vegetações mais diversificadas do mundo, um potencial que pode ser explorado para impulsionar a geração de empresas que utilizam como matéria prima produtos oriundos de um cultivo sustentável, gerando empregos, elevando a renda de populações residentes em áreas de preservação e matas nativas. Em contrapartida, o país é um dos maiores consumidores de defensivos agrícolas no mundo, e em média são gastos cerca de 2,5 bilhões de dólares com sua aquisição, sendo assim o responsável pelo consumo de metade dos produtos do seguimento na América Latina (MMA, 2000).

O uso indiscriminado de defensivos agrícolas no controle de pragas pode trazer diversos problemas de resistência dos patógenos, além de problemas à saúde humana e contaminação do meio ambiente (GHINI et al. 2000). Esse consumo exacerbado viabiliza uma busca por métodos alternativos de controle de doenças, aliados ao desenvolvimento sustentável e eficiência na produção. Existe na flora nacional uma gama de plantas que podem apresentar um potencial fungicida, podendo ser estudadas para esse fim (CELOTO et al. 2008).

Plantas com princípios ativos, ou algumas de suas partes, não são consideradas como medicamento fitoterápico, mesmo após processos de coleta, estabilização e secagem, podendo ser íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada. Os fitoterápicos são medicamentos obtidos com exclusividade de derivados do vegetal (extrato, tintura, óleo, cera, exsudato, suco, e outros) a partir das espécies, mas devem oferecer garantia de qualidade, ter efeitos terapêuticos comprovados, composição padronizada e segurança de uso para a população (ANVISA, 2003).

Segundo Firmo et al (2011) é de extrema importância que se façam pesquisas para confirmar os verdadeiros efeitos das plantas, uma vez que podem existir efeitos indesejáveis. Também é importante incentivar estudos etnobotânicos e etnofarmacológicos para aumentar o conjunto de informações sobre plantas medicinais, e ainda incentivar o uso sustentável dessa biodiversidade.

Como prospecção de incorporação de derivados vegetais em novos produtos, o presente trabalho estuda o potencial dos extratos das espécies: *Stryphnodendron adstringens* e *Allamanda cathartica* L. O *Stryphnodendron adstringens*, conhecido popularmente como Barbatimão, cujos segredos medicinais foram descobertos pelos

povos indígenas, que o chamavam de *Iba timó*, que significa árvore que aperta, já teve sua casca levada para a Europa com o nome de “casca brasileira adstringente”. O mesmo tem ocorrência típica no campo-cerrado e cerrado stricto sensu, e neste último tem densidade variando de 6 a 36 indivíduos por hectare. Tem preferência por solos arenosos e de drenagem rápida, podendo ocorrer no Paraná. (GLASENAPP, 2007). Por sua vez, a *Allamanda cathartica* L, pertencente à família Apocynaceae, cujos nomes populares mais conhecidos são, alamanda, alamanda- amarela, carolina ou dedal de dama (LORENZI; SOUZA, 1999), foi catalogada por Carl Linnaeus, em 1771, e encontra-se registrada no herbário Internacional de Berlim, sob o número 4831. Espécies pertencentes a esse gênero são trepadeiras comuns nas regiões mais quentes do Brasil (SILVA, 2007).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste projeto foi avaliar *in vitro* o uso de extratos brutos obtidos a partir das espécies: *Stryphnodendron adstringens* (casca); e *Allamanda cathartica* L (folhas e flores) na inibição do crescimento de fungos e bactérias.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extração do princípio ativo das espécies: *Stryphnodendron adstringens* (casca); e *Allamanda cathartica* L (folhas e flores)
- Avaliação da atividade antimicrobiana;
- Avaliação da atividade antifúngica;

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 ORGANISMOS UTILIZADOS

##### 3.1.1 *Colletotrichum gloeosporioides*

Os fungos do gênero *Colletotrichum* são fitopatógenos importantes nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo eles os causadores de uma diversidade de doenças, como: antracnose, podridão de pedúnculo, varicela em manga, abacate e mamão (BAILEY & JEGER, 1992). A antracnose causada por espécies de *Colletotrichum* é a principal doença de frutos em pós-colheita, sendo considerada doença de elevada importância econômica no Nordeste do Brasil (SERRA & SILVA, 2004).



**Figura 1:** Sintomas de antracnose em folhas de *Manguifera indica* (Mangueira).

A alta severidade da antracnose ocorre em locais ou épocas onde há frequência de chuvas e predominância de alta umidade relativa. Os períodos críticos de maior suscetibilidade da mangueira às infecções são: fase de florescimento, frutificação, emissão de folhas novas e gemas florais. São nessas ocasiões em que o patógeno pode causar queima de panículas, mumificação de frutos e necroses em folhas (EMBRAPA, 2010).

A disseminação da doença pode ocorrer a partir de lesões em folhas, panículas ou frutos que servem como fonte de inóculo para infecção em órgãos sadios. Essa disseminação ocorre, principalmente, por respingos de água (chuva, orvalho ou irrigação). O patógeno possui vários hospedeiros alternativos, desde plantas silvestres às cultivadas, como exemplo a goiabeira, abacateiro, morangueiro, maracujazeiro, mamoeiro, etc. (EMBRAPA. 2010).

### 3.1.2 *Fusarium oxysporum*

Uma das principais doenças fúngicas relacionada à murcha vascular é causada por *Fusarium oxysporum*, a qual causa elevados prejuízos em cultivos suscetíveis devido à colonização vascular pelo fungo e a inviabilidade de controle químico (LOPES, 2005). O fungo ataca várias culturas, como por exemplo o tomateiro e a bananeira, a partir de suas características de adquirir diferentes formas, causando inúmeras perdas na produção. A doença reduz o crescimento de brotos, e provoca escurecimento interno da madeira, murchamento de folhas e de cachos. Os cachos murcham ainda verdes ficando aderidos aos ramos. As plantas infectadas podem morrer subitamente. Em outras plantas pode se verificar brotações no tronco, que também morrerão com a evolução da doença (EMBRAPA,2003).



**Figura 2:** Sintoma de fusariose na região do tronco da planta. Fonte: EMBRAPA, 2003

Fazendo parte de um gênero grande de fungos amplamente distribuídos no solo e em associação com plantas, a maioria das espécies são sapróbios inofensivos, absorvendo substâncias provenientes de matéria orgânica em decomposição. Abundantes no solo, algumas espécies produzem micotoxinas em cereais que se entrarem na cadeia alimentar podem afetar a saúde humana e animal. As principais toxinas produzidas por *Fusarium oxysporum* são fumonisinas e tricotecenos. (Zipcodezoo, 2010).

### 3.1.3 *Aspergillus niger*

O fungo pode atacar grãos de sorgo causando o mofamento, o que reduz o tamanho e o peso do grão. Além da perda de valor de mercado, valor nutritivo e queda de qualidade, os grãos mofados e contaminados podem promover riscos a saúde humana e de animais domésticos. O sintoma mais evidente no grão mofado é a presença de micélio preto sobre a superfície do grão. As panículas atacadas pela doença não apresentam nenhum risco de intoxicação para bovinos alimentados com grãos de sorgo, pois o patógeno não produz micotoxina (EMBRAPA, 2010).



**Figura 3:** O mofamento dos grãos de sorgo. Fonte: EMBRAPA 2003

O gênero *Aspergillus* apresenta mais de 185 espécies encontradas nos mais diversos habitat. O grupo é caracterizado por possuir cabeças coloidais escuras,

geralmente negros com conidióforos hialinos a acinzentados e cabeças globosas. O *Aspergillus niger* faz parte dos fungos filamentosos que constituem um grupo de micro-organismos aeróbios fisiologicamente diversos, esses fungos podem se desenvolver em meios líquidos e sólidos, com grande parte de suas hifas aéreas (RODRIGUES, 2006).

#### 3.1.4 *Escherichia coli*

“A *Escherichia coli* é um bastonete curto, gram negativo, não formadores de esporos, anaeróbicos facultativos, fermentadores de lactose pertence à família *Enterobacteriaceae*, do grupo dos coliformes fecais. Seu habitat principal é o trato intestinal humano, e de alguns animais” (Siqueira, 1995).

#### 3.1.5 *Staphylococcus aureus*

“O micro-organismo *Staphylococcus aureus* é uma bactéria gram-positiva caracterizada por ser um dos maiores responsáveis pelas mortes por infecção hospitalar, sendo o final dos anos 80 e início dos anos 90, o período constatado pela comunidade médica como sendo o de grande aumento do número de doenças infecciosas causadas pelas variedades de *Staphylococcus aureus* multirresistentes. A vancomicina é o medicamento de primeira escolha no tratamento de infecções causadas por estes micro-organismos. No entanto, há relatos de variedades resistentes a este antibiótico, nos últimos anos” (França & Kuster, 2009).

### 3.2 JUSTIFICATIVA DE ESTUDO

A grande quantidade de defensivos agrícolas, aliada a utilização incorreta dos mesmos no campo pelos agricultores, pode provocar graves desequilíbrios ambientais, como contaminação de lençóis freáticos, contaminação do solo e contaminação dos alimentos. Além disso, o uso contínuo de produtos de alta toxicidade utilizados no controle químico de pragas e doenças pode acarretar uma

resistência dos patógenos, tornando-se necessárias dosagens cada vez maiores, o que é incompatível com a qualidade ambiental desejada. (FRAGOSO et al. 2002)

Biomassas brasileiros possuem diversas espécies que podem ser utilizadas como fármacos naturais. A investigação sobre esses produtos com atividade antimicrobiana aumentou significativamente nos últimos anos devido à crescente demanda por produtos naturais (TEIXEIRA, 2008). Tendo em vista que sistemas de produção em que a utilização do controle químico não é permitida, como no caso orgânico, há necessidade de métodos alternativos com eficiência comprovada para o controle de pragas e doenças. (VERZON et al. 2006)

A busca por esses métodos alternativos tem resultado no aumento de pesquisas, principalmente aquelas que buscam o combate de pragas e doenças que provocam danos econômicos à agricultura, as quais tem revelado seu potencial. Algumas plantas que apresentam na sua composição química um potencial fungicida ou antimicrobiano devem ser estudadas para que possam servir de base para a formulação de novos produtos (SCHWAN-ESTRADA & STANGARLIN, 2005).

## 4. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÕES DO MATERIAL

A obtenção do material foi realizada de acordo com a disponibilidade, o período de frutificação e floração. As espécies foram coletadas na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Campo Mourão (UTFPR).

### 4.2 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO

Os extratos foram obtidos a partir das espécies *Stryphnodendron adstringens* (casca) e *Allamanda cathartica* L (folhas e flores). As amostras foram secas em estufa com circulação de ar forçada a 45°C por 2 horas. Após secas e maceradas, as folhas e flores de *Allamanda cathartica* L e cascas de *Stryphnodendron adstringens* foram armazenadas por 7 dias em etanol 99,5% para a extração dos princípios ativos. O extrato de todas as plantas foi concentrado utilizando um evaporador rotativo a vácuo, sendo em seguida congelado em ultra freezer a - 40°C, liofilizado durante 24 horas, depois armazenado sob refrigeração a 4°C, para uso posterior nos testes.

### 4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

O meio de cultivo utilizado foi o ágar Mueller-Hinton, seguindo as indicações do Manual “Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos”, elaborado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2004).

A atividade antimicrobiana do extrato foi constatada pela técnica de difusão em disco de papel descrito pela metodologia de Kirby-Bauer (1966), em que as

suspensões dos micro-organismos convenientemente diluídas foram inseridas às placas contendo o meio de cultura em estado sólido. “Os fatores de diluição foram ajustados a turvação de acordo com a escala 0,5 de *Mc Farland* (108 UFC/mL) e em seguida as bactérias foram diluídas 1:1000 para uso no ensaio de atividade antimicrobiana obedecendo as recomendações do *National Committee for Clinical Laboratory Standards*” (NCCLS, 1997).

Por fim, os discos de papel de área equivalente a 20mm<sup>2</sup> receberam 20 µL das soluções do extrato resultando nas concentrações de 0,01; 0,02; 0,05; 0,1 e 0,2 % (m/v) que posteriormente foram aplicadas às placas e incubadas a 37 °C durante 24 horas em posição invertida. Após o período de incubação foram realizadas leituras visuais observando-se os halos de inibição de crescimento bacteriano e quantificado em milímetros com o auxílio de paquímetro.

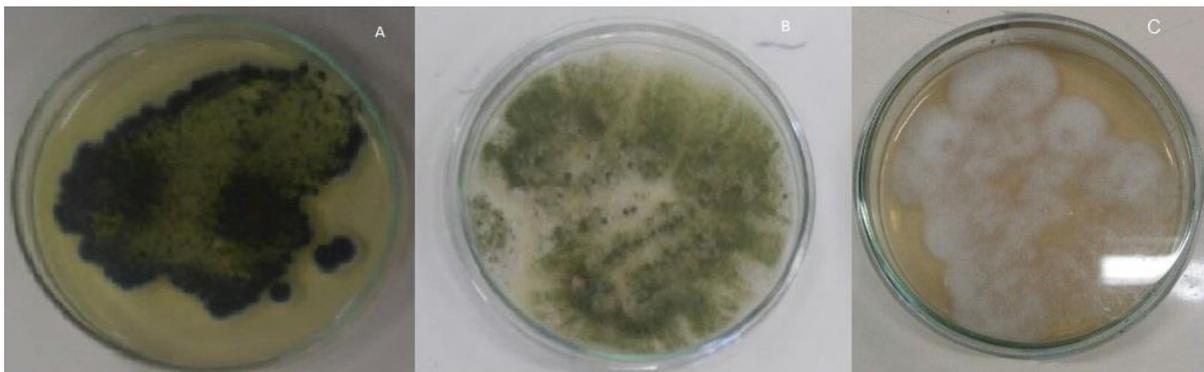
Foram realizados três ensaios independentes para cada um dos três testes de atividade antimicrobiana, ou seja, três placas para cada concentração do extrato para cada um dos três testes realizados.

#### 4.4 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS

Os fungos *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus niger*, foram isolados de amostras de solo coletadas no campus da UTFPR após identificação e separação dos outros fungos presentes, enquanto *Colletotrichum gloeosporioides*, foi coletado em um indivíduo infectado *Mangifera indica* (Mangueira). Os esporos foram transferidos para placas de Petri de 8 cm de diâmetro contendo 15 mL de meio batata-dextrose-ágar (BDA). As placas foram mantidas no escuro por 7 dias, a 25 °C ± 2°C.

Os isolados das bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foram cedidos pelo Laboratório de Análises Clínicas São Gabriel, do município de Campo Mourão.

No caso das cepas de fungos a confirmação da espécie de cada isolado foi feita com base em características morfológicas dos fungos presentes nas colônias em meio BDA. As colônias obtidas estão apresentadas na Figura 4.



**Figura 4:** Cepas inoculadas em meio BDA. (A - *Aspergillus niger*; B - *Colletotrichum gloeosporioides*; C - *Fusarium oxysporum*)

#### 4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Para avaliação da atividade antifúngica dos extratos liofilizados foi utilizado o método adaptado de AUER & BETTIOL (1986) e STANGARLIN et al. (1999), o meio de cultivo utilizado foi o BDA (Batata-Dextrose-Ágar), seguindo as indicações do Manual “Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos”, elaborado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2004). Em meio BDA foram inoculados os esporos dos patógenos, a atividade antifúngica do extrato foi constatada por técnica adaptada de difusão em disco de papel descrito pela metodologia de Kirby-Bauer (1966), com discos de papel de área equivalente a 20mm<sup>2</sup> que receberam 20 µL das soluções dos extratos resultando nas concentrações de 1, 2, 5, 10 e 20% (m/v) e posteriormente. As suspensões dos micro-organismos convenientemente diluídas foram inseridas às placas contendo o meio de cultura em estado sólido, e em seguida as placas foram mantidas no escuro por 7 dias, a 25 °C ± 2°C. Os controles continham apenas o meio BDA. Os testes foram realizados em triplicata para confirmação do potencial do extrato da planta.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO

Após secagem, trituração e extração do princípio ativo bruto das folhas e flores de *Allamanda cathartica* L determinou-se o rendimento médio de extração. O resultado obtido foi de 18,21% (m/v) para o extrato bruto liofilizado das folhas, e de 25,13% (m/v) para o extrato liofilizado das flores.

No caso do *Stryphnodendron adstringens*, após a secagem e trituração das cascas, seguido do processo de extração e posterior secagem dos cristais obtidos, determinou-se o rendimento de extração do extrato bruto, que foi de 16,50% (m/v).

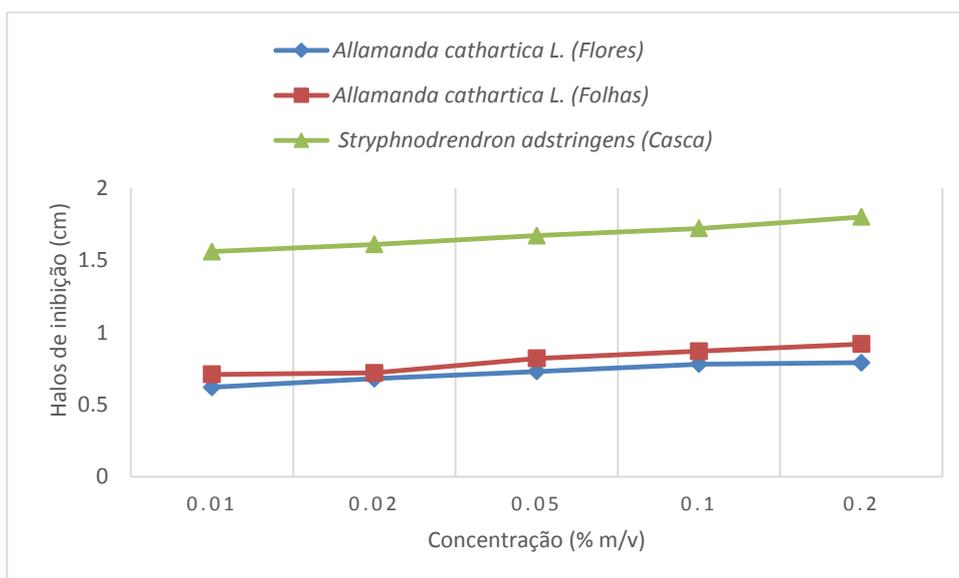
### 5.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

As médias das triplicatas dos diâmetros dos halos de inibição dos extratos aplicados nas placas com *Escherichia coli*, obtidos por meio de observação visual com auxílio paquímetro, são descritos na Tabela 1.

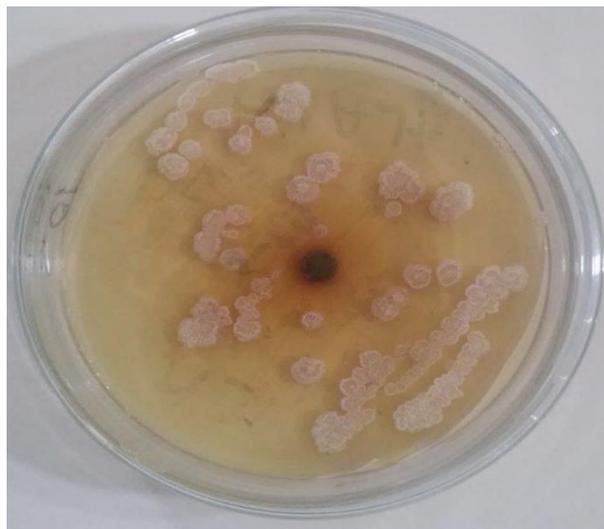
**Tabela 1:** Diâmetros médios de inibição dos extratos aplicados nas placas com o micro-organismo *Escherichia coli*.

Concentração (% m/v)	Halos de inibição (cm)		
	<i>Allamanda cathartica</i> L. (Flores)	<i>Allamanda cathartica</i> L. (Folhas)	<i>Stryphnodendron</i> <i>adstringens</i> (Casca)
0,01	0,62	0,71	1,56
0,02	0,68	0,72	1,61
0,05	0,73	0,82	1,67
0,1	0,78	0,87	1,72
0,2	0,79	0,92	1,8

Pode ser observado que entre os extratos utilizados, *Stryphnodendron adstringens* apresentou um halo médio de 1,8 cm na concentração de 0,2% (m/v), para a bactéria *Escherichia coli*, sendo maior que os resultados apresentados pelos extratos de *Allamanda cathartica* L., que apresentou halos de inibição em média de 0,79 cm de diâmetro para os testes usando as flores e de 0,92 cm para o extrato das folhas na mesma concentração. Esta observação fica evidenciada no Gráfico 1, que exhibe um comparativo entre os extratos utilizados e diâmetros médios de inibição para o micro-organismo, enquanto a Figura 5 apresenta o halo de inibição formado pelo extrato de *Stryphnodendron adstringens* após o período de incubação de 24 horas para a bactéria.



**Gráfico 1:** Comparativo entre os extratos utilizados e diâmetros médios de inibição com o micro-organismo *Escherichia coli*.



**Figura 5:** Placa de Petri com o micro-organismo *Escherichia coli*, com o extrato de *Stryphnodrendron adstringens*

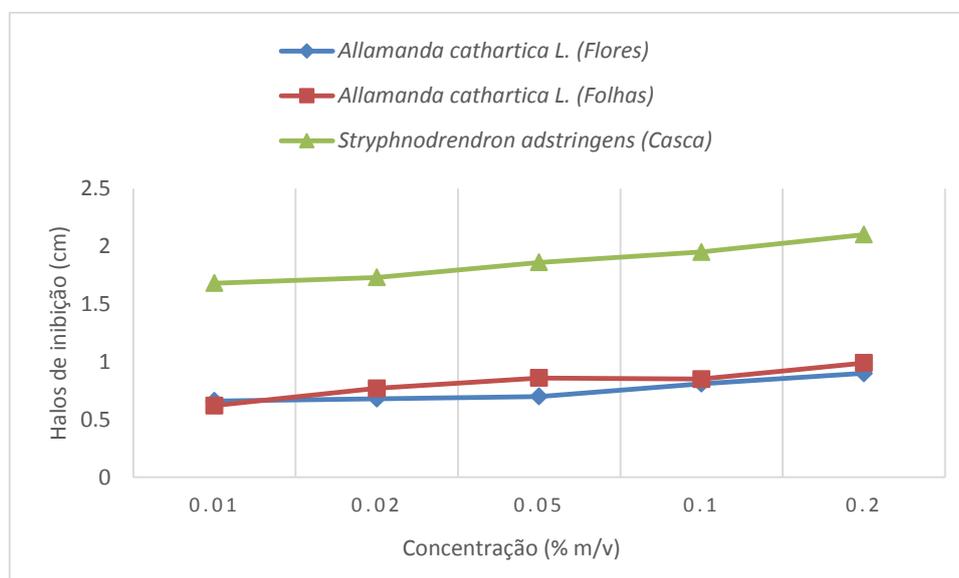
As médias das triplicatas dos diâmetros de inibição dos extratos aplicados nas placas com *Staphylococcus aureus*, sendo estes em centímetro (cm), obtidos seguindo o mesmo procedimento são descritos na Tabela 2.

**Tabela 2:** Diâmetros médios de inibição dos extratos aplicados nas placas com o micro-organismo *Staphylococcus aureus*.

Concentração (% m/v)	Halos de inibição (cm)		
	<i>Allamanda cathartica</i> L. (Flores)	<i>Allamanda cathartica</i> L. (Folhas)	<i>Stryphnodrendron adstringens</i> (Casca)
0,01	0,66	0,62	1,68
0,02	0,68	0,77	1,73
0,05	0,7	0,86	1,86
0,1	0,81	0,85	1,95
0,2	0,90	0,99	2,10

Pode ser observado que entre os extratos utilizados, novamente *Stryphnodrendron adstringens* apresenta melhores resultados com um halo médio de 2,1 cm na mesma concentração para a bactéria *Staphylococcus aureus*, já os extratos da *Allamanda cathartica* L., que apresentaram halo de 0,90 cm para o

extrato das flores e 0,99 cm para o extrato das folhas na mesma concentração. O que fica evidenciado no Gráfico 2.



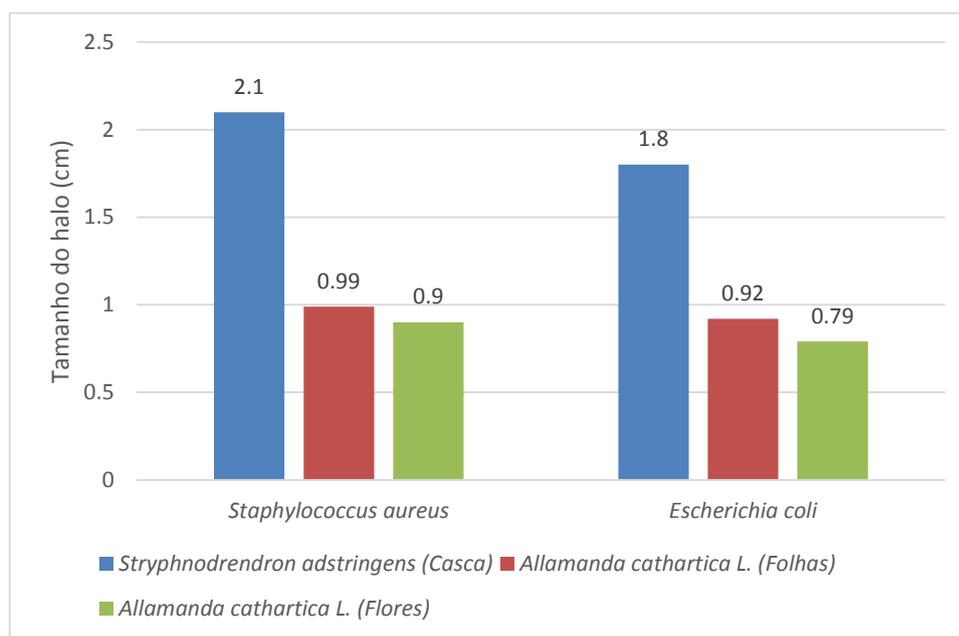
**Gráfico 2:** Comparativo entre os extratos utilizados e diâmetros médios de inibição dos extratos aplicados nas placas com o micro-organismo *Staphylococcus aureus*.

A figura 6 apresenta o halo de inibição formado pelo extrato de *Stryphnodendron adstringens* após o período de incubação de 24 horas para a *Staphylococcus aureus*.



**Figura 6:** Placa de Petri com o micro-organismo *Staphylococcus aureus*, com o extrato de *Stryphnodendron adstringens*

O efeito inibitório *Stryphnodendron adstringens* fica mais evidente quando se observa o Gráfico 3, mostrando que o extrato foi mais efetivo frente aos dois tipos de bactérias testadas. Essa capacidade de inibir o crescimento de organismos é de fundamental importância na formulação de novos produtos, uma vez que estes quando não inibidos podem causar produção de substâncias tóxicas, deteriorando o produto.



**Gráfico 3:** Comparativo entre os extratos utilizados e diâmetros médios de inibição a concentração de 0,2 % (m/v).

A maior atividade antibacteriana encontra-se na casca de *Stryphnodendron adstringens*, e pode estar associada aos altos teores de taninos (20 a 30%) que são encontrados nesta parte da planta, e que exercem atividade biológica, tais como: antisséptica, antimicrobiana, anti-hemorrágica, antidiarreica, cicatrizante e anti-inflamatória (ALVES et al., 2000). Sendo estes teores muito utilizados na indústria de curtume, ainda contém, flavonóides, alcalóides, lipídios, glicosídeos, xilose, rhamnose, lupeol, arabinose, saponinas triterpenóides, cristais de oxalato de cálcio e corante vermelho (ALMEIDA, 1993).

O número de taninos afeta o nível de crescimento de vários micro-organismos, podendo explicar essa melhor ação antimicrobiana. Diversos

mecanismos são utilizados para explicar a atividade de taninos, entre eles: inibição das enzimas microbianas extracelulares; a privação de substratos necessários para o crescimento microbiano e a ação direta sobre o metabolismo microbiano (SCALBERT, 1991).

Segundo Gonçalves (2007) e Thomazi, et al (2010), *Stryphnodendron adstringens* possui uma importante atividade contra micro-organismos do gênero *Staphylococcus*, possuindo seu maior potencial antibacteriano na casca como foi citado anteriormente, com ação comprovada contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli.*, o que pode ser reafirmado pelo presente estudo. No caso dos extratos obtidos a partir de *Allamanda cathartica L* não foram encontrados estudos conclusivos sobre esse potencial antimicrobiano, por outro lado ainda que em menor escala esse potencial foi observado, o que justifica a necessidade de estudos mais elaborados e específicos sobre o assunto.

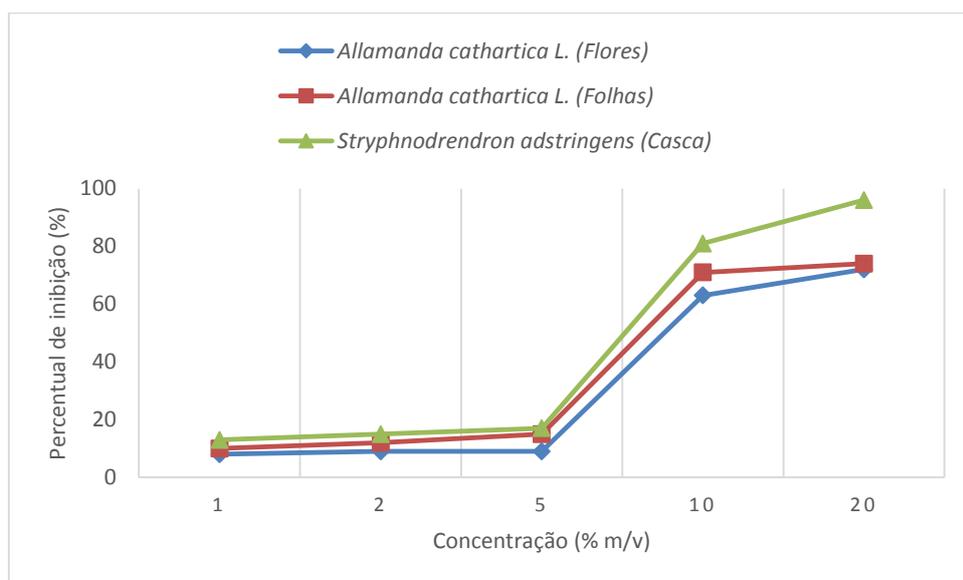
### 5.3 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

As médias dos percentuais de inibição dos extratos aplicados nas placas com o micro-organismo *Aspergillus niger*, obtidos por meio de observação visual com auxílio paquímetro, tendo como base a relação entre a área da colônia sob a área da placa de Petri, estão descritos na Tabela 3.

**Tabela 3:** Percentuais de inibição dos extratos aplicados nas placas com o micro-organismo *Aspergillus niger*.

Concentração (% m/v)	Percentual de inibição (%)		
	<i>Allamanda cathartica L.</i> (Flores)	<i>Allamanda cathartica L.</i> (Folhas)	<i>Stryphnodendron adstringens</i> (Casca)
1	8	10	13
2	9	12	15
5	9	15	17
10	63	71	81
20	72	74	96

Observa-se que o extrato da casca de *Stryphnodendron adstringens* apresenta uma porcentagem média de inibição em torno de 96%, enquanto para os extratos de *Allamanda cathartica* L, foi de 72% para o extrato das flores e 74% para o extrato das folhas na mesma concentração. Isto fica evidenciado pelo Gráfico 4.



**Gráfico 4:** Comparativo entre a porcentagem média de inibição dos extratos aplicados nas placas com o micro-organismo *Aspergillus niger*.

A figura 7 apresenta inibição causada pelo extrato de *Stryphnodendron adstringens* na concentração de 20 % (m/v) após o período de incubação de 7 dias para o micro-organismo. No caso foram somadas as áreas das duas colônias formadas e postas em relação com a área da placa de Petri.



**Figura 7:** Placa de Petri com o micro-organismo *Aspergillus niger*, com o extrato de *Stryphnodendron adstringens*

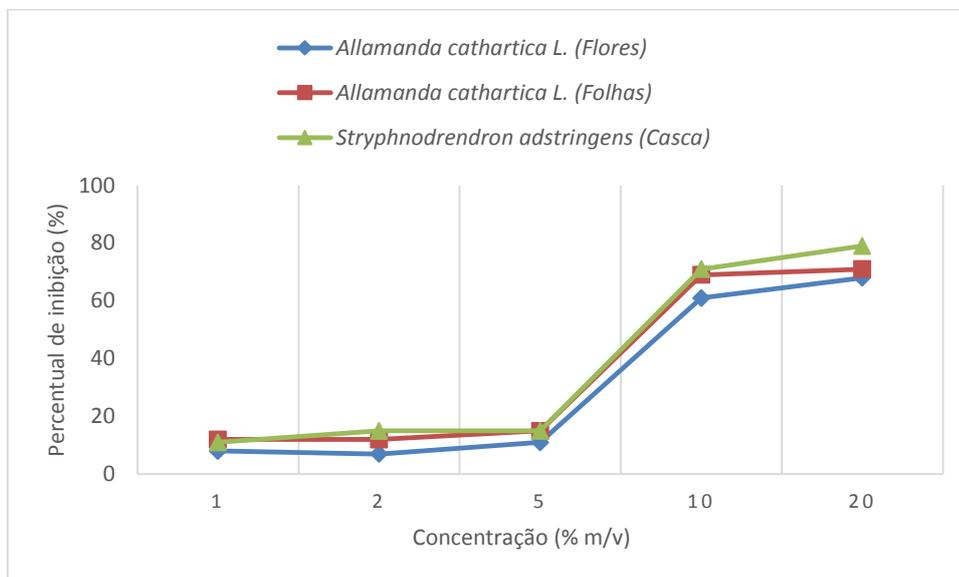
As médias dos percentuais de inibição dos extratos aplicados nas placas com o micro-organismo *Colletotrichum gloeosporioides* foram obtidos por meio de observação visual com auxílio paquímetro, seguindo a mesma metodologia citada anteriormente. A critério de comparação, estão descritos na Tabela 4.

**Tabela 4:** Percentuais de inibição dos extratos aplicados nas placas com o micro-organismo *Colletotrichum gloeosporioides*.

Concentração (% m/v)	Percentual de inibição (%)		
	<i>Allamanda cathartica</i> L. (Flores)	<i>Allamanda cathartica</i> L. (Folhas)	<i>Stryphnodendron adstringens</i> (Casca)
1	8	12	11
2	7	12	15
5	11	15	15
10	61	69	71
20	68	71	79

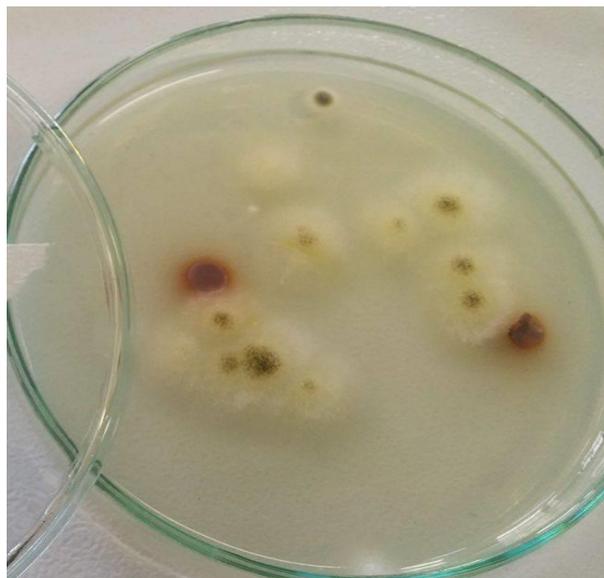
Observa-se que o extrato da casca de *Stryphnodendron adstringens* apresenta uma porcentagem média de inibição em torno de 79%, enquanto os extratos de *Allamanda cathartica* L apresentaram 68% para o extrato das flores e

71% para o extrato das folhas na mesma concentração, o que fica evidenciado pelo Gráfico 5.



**Gráfico 5:** Comparativo entre a porcentagem média de inibição dos extratos aplicados nas placas com o micro-organismo *Colletotrichum gloeosporioides*

A Figura 8 apresenta inibição causada pelo extrato de *Stryphnodendron adstringens* após o período de incubação de 7 dias para o micro-organismo *Colletotrichum gloeosporioides*, em que do mesmo modo foram somadas as áreas das colônias formadas e postas em relação com a área da placa de Petri.



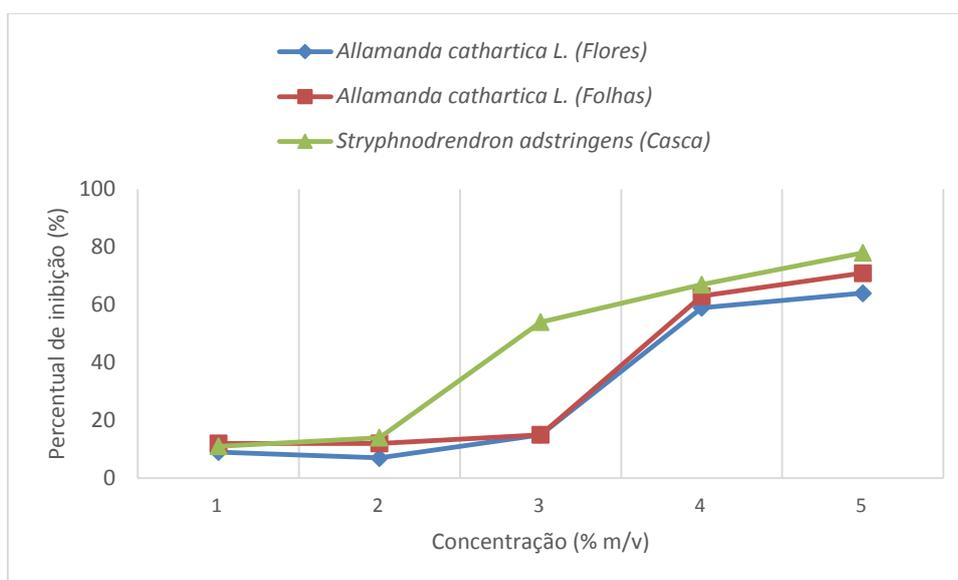
**Figura 8:** Placa de Petri com o micro-organismo *Colletotrichum gloeosporioides*, com o extrato de *Stryphnodendron adstringens*.

As médias dos percentuais de inibição dos extratos aplicados nas placas com o micro-organismo *Fusarium oxysporum*, obtidos por meio de observação visual com auxílio paquímetro, tendo como base a relação entre a área da colônia sob a área da placa de Petri estão descritos na Tabela 5.

**Tabela 5:** Percentuais de inibição dos extratos aplicados nas placas com o micro-organismo *Fusarium oxysporum*.

Concentração (% m/v)	Percentual de inibição (%)		
	<i>Allamanda cathartica</i> L. (Flores)	<i>Allamanda cathartica</i> L. (Folhas)	<i>Stryphnodendron adstringens</i> (Casca)
1	9	12	11
2	7	12	14
5	15	15	54
10	59	63	67
20	64	71	78

Observa-se que o extrato da casca de *Stryphnodendron adstringens* apresenta uma porcentagem média de inibição em torno de 78%, enquanto os extratos de *Allamanda cathartica* L apresentaram 64% para o extrato das flores e 71% para o extrato das folhas na mesma concentração. O que fica evidenciado pelo Gráfico 6.



**Gráfico 6:** Comparativo entre a porcentagem média de inibição dos extratos aplicados nas placas com o micro-organismo *Fusarium oxysporum*.

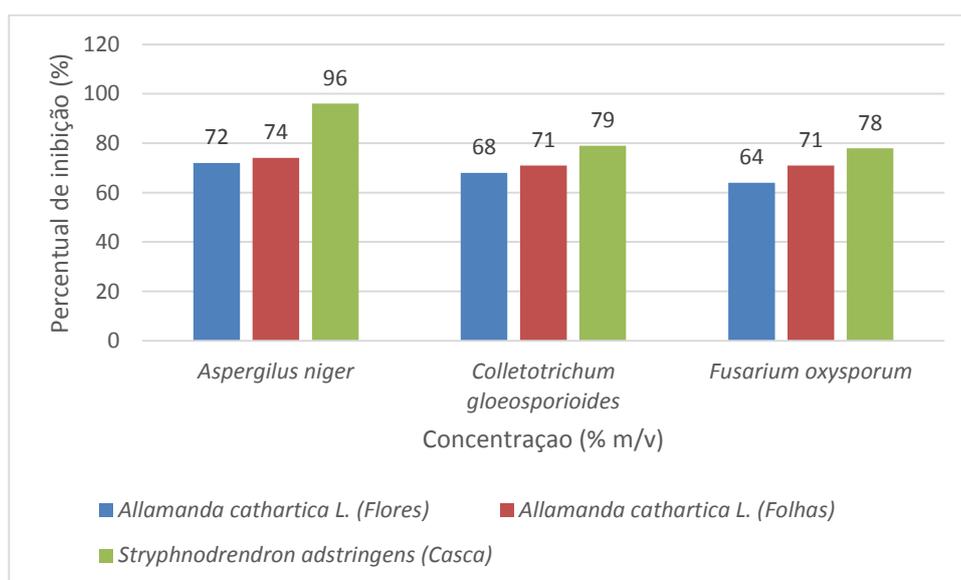
A Figura 9 apresenta inibição causada pelo extrato de *Stryphnodendron adstringens* após o período de incubação de 7 dias para o micro-organismo *Fusarium oxysporum*, seguindo a mesma metodologia foram somadas as áreas das colônias formadas e postas em relação com a área da placa de Petri.



**Figura 9:** Placa de Petri com o micro-organismo *Fusarium oxysporum*, com o extrato de *Stryphnodendron adstringens*.

De acordo com a pesquisa realizada por Ishida et al (2006), a atividade antifúngica do *Stryphnodendron adstringens*, interfere no crescimento, fatores de virulência e ainda possui baixa toxicidade as células. Essa ação antifúngica se dá por uma fração rica em polímeros, possibilitando uma maior investigação desses mecanismos de ação para desenvolver novo agente antifúngico, uma vez que mostrou atividades antifúngicas satisfatórias.

Podem ser notados pelos testes realizados que as amostras de extrato de cascas de *Stryphnodendron adstringens* apresentaram um melhor desempenho em relação à atividade antifúngica. Os resultados de inibição apresentaram inibição de até 96% das formações de colônias para a *Aspergillus niger*, 78% para *Fusarium oxysporum* e 79% para *Colletotrichum gloeosporioides* (Gráfico 7).



**Gráfico 7:** Comparativo entre os extratos utilizados e percentual de inibição a concentração de 20%.

A partir do extrato obtido da casca de *Stryphnodendron adstringens* foram avaliados tipos de atividade biológica e são agora conhecidos para agir contra muitos micro-organismos (AUDI et al, 2004). O elevado grau de polimerização e a hidroxilação dos taninos condensados parece ser um fator importante em sua atividade antifúngica o que foi demonstrado por SCALBERT (1991).

Outro estudo realizado por Ishida 2009 sugere que extrato de *Stryphnodendron adstringens* inibe o crescimento de *C. albicans* por afetar a

integridade da parede da célula, o que está relacionado com a diminuição da capacidade de aderir a células eucariotas e a inibição da formação de tubo germinativo causando um efeito sobre o processo de brotamento. Esta potente propriedade do extrato pode ser uma explicação para o fenômeno ocorrido no presente estudo explicando a inibição dos micro-organismos testados.

Assim, o uso de extratos a partir da casca do caule de *Stryphnodendron adstringens* parece ser seguro, tendo um potencial como um agente farmacológico, principalmente de tratamento antifúngico (COSTA et al., 2010). A descoberta de novos fitoterápicos representa desafio para a comunidade científica, pois muitas drogas existentes para o tratamento de infecções fúngicas, bacterianas e parasitárias possuem estreito espectro de ação, efeitos adversos e toxicidade (ISHIDA et al., 2006).

## 6. CONCLUSÃO

Atualmente existe um pequeno número de agentes antifúngicos comerciais, além disso, não se conhece a sequência de eventos que ocorrem desde a administração, ação e excreção dos mesmos. Podendo ter efeitos inapropriados e/ou tóxicos, fatores que são importantes e estão relacionados a tratamentos mal sucedidos, por isso existe uma necessidade crescente de novos compostos com atividade antifúngica.

Este trabalho comprovou a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos de *Stryphnodendron adstringens* (casca) e *Allamanda cathartica* L (folhas e flores) frente aos micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*. Comprovou-se também que os extratos são eficientes na inibição de três variedades de fungos, *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus niger*, e o *Colletotrichum gloeosporioides*, comprovando seu potencial antifúngico.

Apesar da comprovação do princípio ativo bruto dos três extratos utilizados, o extrato de *Stryphnodendron adstringens* mostrou-se mais eficiente tanto na atividade antifúngica quanto no combate bacteriano, mesmo assim, outras pesquisas devem ser realizadas para confirmar a ação da planta no combate a outros tipos de micro-organismos, e estudos mais específicos sobre as propriedades do extrato e os fatores que causam essa inibição no crescimento de organismos indesejáveis.

Estes dados em conjunto mostram o potencial dos extratos para iniciar o desenvolvimento de um novo agente antifúngico, obviamente são necessários fracionamento dos extratos, identificação de compostos fenólicos, estudo de atividade antioxidante, entre outros estudos mais aprofundados, visando evitar efeitos indesejáveis. Quando maior os conhecimentos sobre o composto melhor a chance de sucesso do mesmo, que poderiam complementar ou até mesmo substituir os agrotóxicos que são utilizados hoje em dia.

Conclui-se que ambos os extratos possuem potencial antibacteriano e antifúngico e sua utilização é apropriada, ambos possuem ação, no entanto, é preciso analisar mais sobre como essas plantas agem quimicamente e como são usadas pelos agricultores, pois além de visar uma utilização correta, contribui para a descoberta de novos agentes fitoterápicos contra várias doenças, causadoras de prejuízos tanto econômicos quanto a saúde da população.



## REFERÊNCIAS

- Agência Nacional De Vigilância Sanitária – **ANVISA** - Disponível em:<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/definicao.htm>, 2003. Acesso em 20 mai. 2016
- ALMEIDA, E.R. **Plantas medicinais Brasileiras, Conhecimentos Populares e Científicos**. São Paulo: Hemus Editora Ltda. 1993.
- ALVES, T. M. A. et al. **Biological screening of brasilian medicinal plants**. Memorial Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 95, n. 3, p. 367-373, maio/jun. 2000.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de microbiologia clínica para o controle de infecções em serviços de saúde: Módulo IV, descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos**. 1 ed. ANVISA. Brasília, 2004.
- Associação Brasileira Das Empresas Do Setor De Fitoterápicos, Suplemento Alimentar E De Promoção Da Saúde - **ABIFISA**. Disponível em: [http://www.abifisa.org.br/saibamais\\_historico.asp](http://www.abifisa.org.br/saibamais_historico.asp), 2012.
- Audi EA, Toledo CEM, Santos FS, et al. **Biological activity and quality control of extract and stem bark from Stryphnodendron adstringens**. Acta Farm Bonaerense; 23:328-33. 2004
- AUER, C. G.; BETTIOL, W. **Efeito da serapilheira de Eucalyptus grandis no crescimento micelial de Pisolithus tinctorius em meio de cultura**. IPEF, n.32, p.49-51, 1986.
- BAILEY, J.A.; O'CONNELL, R.J.; PRING, R.J.; NASH, C. **Infection strategies of Colletotrichum species**. In: BAILEY, A. J.; JEGER, J. M. Colletotrichum: biology, pathology and control. Oxford: British Society for Plant Pathology, p.88-120. 1992.
- Bauer, A.W., W.M.M. Kirby, J.C. Sherris, and M. Turck.. **Antibiotic susceptibility testing by astandardized single disk method**. Am. J. Clin. Pathol. 45:493-496. 1966
- BEZERRA, J. E. F.; LEDERMAN, I. E.; FREITAS, E. V. de; SILVA, J. F. da Jr. **Propagação de genótipos de Pitangueira (Eugenia uniflora L.) pelo método de**

**enxertia de garfagem no topo em fenda cheia.** Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal, v. 24, 2002.

CELOTO Mercia I. B.; STRADIOTO Marli F. P.; SACRAMENTO Luis V. S.; CELOTO Fernando J.; **Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*** ; UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISA, 2008

COSTA M.A. et al. **Safety evaluation of proantho cyanidin polymer-rich fraction obtained from stem bark of *S. adstringens* (S. ADSTRINGENS ) for use as a pharmacological agent.** Regulatory Toxicology and Pharmacology. Editora Elsevier, p. 330–335, 2010.

EMBRAPA Semiárido –**Cultivo da Mangueira**- Sistemas de Produção, 2 - 2ª edição- ISSN 1807-0027 Versão Eletrônica Ago/2010 disponível em : <[https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira\\_2ed/doencas.htm](https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira_2ed/doencas.htm)> Acesso em 20 mai. 2016

Embrapa Uva e Vinho - **Uvas Americanas e Híbridas para Processamento em Clima Temperado** - Sistema de Produção, 2 - ISSN 1678-8761 Versão Eletrônica - Jan/2003 Disponível em: <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvaAmericanaHibridaClimaTemperado/doenca.htm#fusariose>> Acesso em 20 mai. 2016

FARDIN K M. **Avaliação do potencial antifúngico e antioxidante em *Avicennia schaueriana* Stapf & Leech. e comparação do perfil químico em diferentes locais de ocorrência.** Dissertação. p. 9, 2014.

FIRMO, W.C.A. et al. **Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais,** Cad. Pesq., São Luís, v. 18, n. especial, dez. 2011.

FRAGOSO, D.B., GUEDES, R.N.C., PICANÇO, M.C., ZAMBOLIM, L. **Inseticide use and organophosphate resistance in the coffee leaf miner *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae).** Bulletin of Entomological Research, v. 92, p. 203-212, 2002.

FRANÇA, H. S.; KUSTER, R. M. **Atividade antibacteriana de floroglucinois e do extrato hexanico de *Hypericum brasiliense* Choysi.** *Química Nova* [online], vol. 32, n.5, p. 1103-1106, 2009.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000.

GLASENAPP, J. S. – **Estrutura Genética e Fenóis Totais de Populações Naturais de *Stryphnodendron adstringens*** – Dissertação de pós-graduação em genética e melhoramento. 2007

GONÇALVES A. L. **Estudo da atividade antimicrobiana de algumas árvores medicinais nativas com potencial de conservação/recuperação de florestas tropicais.** Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas - Rio Claro Estado de São Paulo – Brasil, p. 13, Dez. 2007.

ISHIDA K. et al. **Activity of tannins from *S. adstringens* on *Cryptococcus neoformans*: effects on growth, capsule size and Pigmentation.** Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, v.8, n.29, 2009.

ISHIDA, K. et al. **Influence of tannins from *S. adstringens* on growth and virulence factors os *Candida albicans*.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, p. 8, 2006.

Krugner, T. L.; Bacchi, L. M. A. Fungos. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorim, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos.** 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.1, cap. 4, p. 85. 10, 1995

LOPES F.C.A. 2005. Efeito de fontes de silício no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* em tomateiro. Lavras : UFLA, 67p (Tese de Mestrado).

LORENZI, H; SOUZA, H. M. – **Plantas ornamentais do brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras** - Nova Odesa: Instituto Plantarum. 1098p. 1999

MENSOR, L.I., MENEZES, F.S., LEITAO, G.G., REIS, A.S., DOS SANTOS, T., COUBE, C.S., LEITAO, S.G., **Screening of Brazilian plants extracts for antioxidants activity by the use of DPPH free radical method.** Phytother. Res., 15, 127-130, 2001.

MMA (Ministério do Meio Ambiente). **Informativo MMA**, 2000.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals**; Tentative Standards. Waive: NCCLS, Document M31-T, 64p,1997.

POLLETO K. Q. et al, **Suscetibilidade antimicrobiana de uropatógenos em pacientes ambulatoriais na Cidade de Goiânia, GO** .Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical v. 38, n.5, p. 416-420, 2005.

RODRIGUES, C. – **Desenvolvimento de bioprocessos para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido sendo utilizado polpa cítrica**. 2006. 107p Dissertação – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006

Scalbert A. **Propriedades antimicrobianas de taninos** . Fitoquímica; 30 : 3875 - 83, 1995

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F., STANGARLIN, JR. **Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência**. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P. et al. (Eds.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ. p. 125-132, 2005.

SERRA, I. M. R. de S.; SILVA, G. S. da. **Caracterização Morfofisiológica de Isolados de Colletotrichum gloeosporioides Agentes de Antracnose em Frutíferas no Maranhão**. Summa Phytopathologica, Botucatu, v. 30, n. 4, p. 475-480. 2004.

SILVA, K. A. B. S. – **Caracterização dos efeitos do Plumierideo., um iridóide de *Allamanda cathartica* L (apocynaceae), em modelos de Inflamação e dor** – Programa de Pós graduação CAPES. Ufsc/ farmacologia. Mestrado 2007

SIQUEIRA, R. S.. **Manual de Microbiologia de Alimentos**. Brasília: Serviço de Produção de Informação, p. 73, 101, 1995.

STANGARLIN, J. R., SCHWAN-ESTRADA, K. R. F., SILVA CRUZ, M. E.; NOZAKI, M. H. **Plantas Mediciniais e Controle Alternativo de Fitopatógenos**. **Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento**, n.11, p.16-21, 1999.

TEIXEIRA, M. C. D.. **Atividade Antimicrobiana de Plantas Mediciniais e Aromáticas Utilizadas no Brasil**. Multiciencia, Universidade Estadual De Campinas, 2008.

THOMAZI, G.O.C.; BERTOLIN, A.O.; PINTO, M.D.S. **Atividade Antibacteriana *in vitro* Do *Stryphnodendron adstringens* e da Mangabeira Contra bactérias relacionadas às Infecções do trato urinário** Anais do I Seminário Internacional de Ciências do Ambiente e Sustentabilidade na Amazônia, 2010.

VENZON, M.; TUELHER, E.S.; BONOMO, I.S., TINOCO, R.S.; FONSECA, M.C.M.; PALLINI, A. **Potencial de defensivos alternativos para o controle de pragas de cafeeiro**. In: PAULA JUNIOR, T. J.; VENZON, M.; PALINI, A. (Eds.). Tecnologias alternativas para o controle de pragas e doenças. Viçosa: EPAMIG, 378p. 2006.

Vermani K, Garg S. **Herbal medicines for sexually transmitted diseases and AIDS**. J Ethnopharmacol; 80:49-66. 2002

ZIPCODEZOO, 2010. Disponível em : <[www.zipcodezoo.com](http://www.zipcodezoo.com)>.