

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA FLORESTAL
Renata Couto Avila

ÓLEO ESSENCIAL PARA O CONTROLE DE PRAGAS E PATÓGENOS NA
CULTURA EUCALIPTO

DIAMANTINA
2020

Renata Couto Avila

**ÓLEO ESSENCIAL DE EUCALIPTO PARA O CONTROLE DE PRAGAS E
PATÓGENOS DO EUCALIPTO**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em
Ciência Florestal da Universidade Federal dos Vales
do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para
obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Luiz de Laia

**DIAMANTINA
2020**

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A958o

Avila, Renata Couto.

Óleo essencial para o controle de pragas e patógenos na cultura do eucalipto / Renata Couto Avila, 2020.

81 p.: il.

Orientador: Marcelo Luiz de Laia.

Tese (Doutorado – Pós-Graduação em Ciência Florestal) -
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri,
Diamantina, 2020.

1. Thaumastocoris peregrinus. 2. Xanthomonas. 3. Eucalyptus. 4.
Bactéria simbiótica. 4. Terpenos I. Laia, Marcelo Luiz de. II. Título.
III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 634.973766

Ficha Catalográfica – Sistema de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecária: Jullyele Hubner Costa – CRB6/2972



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

RENATA COUTO AVILA

**ÓLEO ESSENCIAL PARA O CONTROLE DE PRAGAS E PATÓGENOS NA
CULTURA DO EUCALIPTO**

Tese apresentada ao
programa de Pós-Graduação em Ciência
Florestal da Universidade Federal dos
Vales do Jequitinhonha e Mucuri, nível
Doutorado, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutora em
Ciência Florestal.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Luiz de Laia

Data de aprovação: 30/10/2020

Prof. Dr. Marcelo Luiz de Laia

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

Prof. Dr. Antonio Sousa Santos

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

Prof. Dr. Sebastião Lourenço de Assis Júnior

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

Prof^a. Dr^a. Janaína Fernandes Gonçalves

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

Dr^a. Ariadne Marques

Autônoma

DIAMANTINA - MG



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Luiz de Laia, Servidor**, em 09/02/2021, às 11:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Janaína Fernandes Gonçalves, Coordenadora**, em 09/02/2021, às 13:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sebastião Lourenço de Assis Júnior, Servidor**, em 09/02/2021, às 13:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ariadne Marques, Usuário Externo**, em 09/02/2021, às 14:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Sousa Santos, Servidor**, em 09/02/2021, às 14:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufvjm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0280081** e o código CRC **6EE648A4**.

Referência: Processo nº 23086.012505/2020-71

SEI nº 0280081

Dedico este trabalho a meus pais, Célia e Fernando, ao meu irmão, meu companheiro Helder e aos amigos que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e dando forças em todos esses anos de Doutorado.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus, por sempre permitir e abrir as portas para que eu pudesse alcançar meus objetivos me dando forças para nunca desistir dos meus sonhos. Agradeço a meus pais que sempre se sacrificaram para que eu e meu irmão tivéssemos tudo nunca deixando faltar nada a nós e caminharam ao meu lado durante todos esses anos em que aqui permaneci me apoiando e me auxiliando nos momentos difíceis sendo meus melhores amigos e me fazendo perceber todas as coisas boas que a vida nos deu. Agradeço á meu companheiro Helder, que sempre me apoiou em todos os momentos.

A todos os meus amigos e principalmente aos amigos que fiz em Diamantina especialmente, aos meus amigos Fabiano Dehon e Walter Júnior, sem vocês não teria sido a mesma coisa. Agradeço aos meus amigos e companheiros de laboratório que sempre me ajudaram nesse projeto e estiveram sempre comigo, especial ao Tarcísio e aos estagiários Luiz, Juliana e Vinícius que foram meu porto seguro dentro do laboratório sempre me ajudando em tudo que precisei. Não poderia deixar de agradecer ao meu Orientador Marcelo Luiz de Laia, a Professora Janaína Fernandes Gonçalves e a todos que acreditaram e ajudaram nesse projeto.

A Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, pela oportunidade. Agradeço também aos professores do Doutorado pelos ensinamentos aprendidos durante o curso. A CAPES, a FAPEMIG e ao CNPq, pelo apoio concedido.

Sem vocês esses 4 anos não teriam sido tudo o que foi para mim, e com a ausência de um de vocês a minha jornada não teria o menor sentido!

A todos vocês meu MUITO OBRIGADA!

“Feliz aquele que transfere o que
sabe e aprende o que ensina”

Cora Coralina

RESUMO

Devido à introdução de pragas exóticas e as doenças causadas por bactérias, as plantações de eucalipto, no Brasil, sofrem consideráveis perdas na produção. Uma destas pragas foi detectada em 2008 e é conhecida como percevejo bronzeado *Thaumastocoris peregrinus* (Carpintero; Dellapé, 2006) (Hemiptera: Thaumastocoridae). Foram descobertos possíveis microrganismos simbiotes colonizando o interior deste percevejo que provavelmente se tratam de organismos essenciais para essa praga. Por sua vez, uma das doenças mais importantes que afetam os plantios é a mancha foliar do eucalipto. O gênero *Xanthomonas* possui maior ocorrência para esta doença do eucalipto no país. Para se conseguir a certificação florestal, não é recomendado o uso de produtos sintéticos. Uma das alternativas para o controle dessa praga e dessa doença é a utilização de óleos essenciais. Assim, o presente estudo visou realizar a caracterização de 18 isolados bacterianos obtidos no interior desse inseto, com vistas a auxiliar no desenvolvimento de estratégias de controle dessa praga. Além disso, promovera análise da atividade antimicrobiana do óleo essencial de diferentes genótipos de eucalipto em três isolados de *Xanthomonas* e em três isolados extraídos do interior do *T. peregrinus*. As amostras de óleo essencial testadas foram capazes de inibir o crescimento de todos os isolados bacterianos testados. Dessa forma, o óleo essencial de eucalipto pode auxiliar no manejo da praga e da doença.

Palavras chave: *Thaumastocoris peregrinus*; *Xanthomonas*; *Eucalyptus*, Bactéria Simbiótica; Terpenos.

ABSTRACT

Due to introduction of exotic pests and diseases caused by bacteria, eucalyptus plantations are suffering from considerable production losses throughout Brazil. One of these pests was detected in 2008 and is known as bronze bug. Microorganisms were discovered colonizing interior of *Thaumastocoris peregrinus*, which are probably essential organisms for this pest. Currently, one of most important diseases affecting plantations is the leaf spot of eucalyptus. Genus *Xanthomonas* has a higher occurrence for this eucalyptus disease in the country. To achieve forest certification, use of synthetic products is not recommended. One of alternatives for control of this pest and this disease is the use of essential oils. The present study aims to isolate and characterize 18 bacterial isolates of this insect, with a view to assisting in development of pest control strategies in addition to analysis of the antimicrobial activity of essential oil of different eucalyptus genotypes in three *Xanthomonas* spp. isolates and in three isolates extracted from interior of *T. peregrinus*. Essential oil samples tested were able to inhibit the growth of all bacterial isolates tested. Thus, eucalyptus essential oil can help in the management of this pest and disease.

Keywords: *Thaumastocoris peregrinus*; *Xanthomonas*; *Eucalyptus*, Symbiotic Bacteria; Terpenes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1- A- BUQUÊ DE CRIAÇÃO; B- COMPOSIÇÃO DE CADA BANDEJA DE CRIAÇÃO; E C- COMPOSIÇÃO DA ESTANTE DE CRIAÇÃO...	28
FIGURA 2- ESQUEMA DO MÉTODO DE COLORAÇÃO DE GRAM. FONTE: TORTORA; FUNKE; CASE (2012).	30
FIGURA 3- CRESCIMENTO DA BACTERIA APÓS 24 HR À 25 ± 2 °C. A- MEIO CALDO NUTRITIVO (1- ISOLADO 16; 2- TESTEMUNHA); B- MEIO AGAR NUTRITIVO (1- ISOLADO 08; 2- TESTEMUNHA).	32
FIGURA 4- RESULTADOS DO TESTE DE GRAM NOS ISOLADOS 1 AO 9 NA OBJETIVA DE 100X.	33
FIGURA 5- RESULTADOS DO TESTE DE GRAM NOS ISOLADOS 10 AO 18 NA OBJETIVA DE 100X.	33
FIGURA 6- A- COLÔNIAS DO ISOLADO 17 CRESCIDAS EM MEIO DE CULTURA COM CMC.; B- TESTE DO VEREMILHO. DIÂMETRO MAIOR= HALO DE DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA, DIÂMETRO MENOR= HALO DA COLÔNIA.	34
FIGURA 7 – I- EFEITO DO OE D NO ISOLADO BACTERIANO 01 SOB AS CONCENTRAÇÕES 1000, 500, 250 E 125 ML.L ⁻¹ ; II- EFEITO DO OE N NO ISOLADO BACTERIANO 01 SOB AS CONCENTRAÇÕES 1000, 500, 250 E 125 ML.L ⁻¹ ; III- EFEITO DO OE N NO ISOLADO BACTERIANO 02 SOB AS CONCENTRAÇÕES 1000, 500, 250 E 125 ML.L ⁻¹ ; IV- EFEITO DO OE F NO ISOLADO BACTERIANO 02 SOB AS CONCENTRAÇÕES 1000, 500, 250 E 125 ML.L ⁻¹ ; V- EFEITO DO OE F NO ISOLADO BACTERIANO 03 SOB AS CONCENTRAÇÕES 1000, 500, 250 E 125 ML.L ⁻¹ ; VI- EFEITO DO OE D NA ISOLADO BACTERIANO 03 SOB AS CONCENTRAÇÕES 1000, 500, 250 E 125 ML.L ⁻¹	48
FIGURA 8- DISPERSÃO E MODELO DE REGRESSÃO DOS ÓLEOS QUE MOSTRARAM DIFERENÇA SIGNIFICATIVA QUANDO ANALISADO A AMOSTRA DE ÓLEO ESSENCIAL DENTRO DE CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO PARA O ISOLADO BACTERIANO 01.	49
FIGURA 9- DISPERSÃO E MODELO DE REGRESSÃO DOS ÓLEOS QUE MOSTRARAM DIFERENÇA SIGNIFICATIVA QUANDO ANALISADO A AMOSTRA DE ÓLEO ESSENCIAL DENTRO DE CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO PARA O ISOLADO BACTERIANO 02.	51
FIGURA 10- DISPERSÃO E MODELO DE REGRESSÃO DOS ÓLEOS QUE MOSTRARAM DIFERENÇA SIGNIFICATIVA QUANDO ANALISADO A AMOSTRA DE ÓLEO ESSENCIAL DENTRO DE CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO PARA O ISOLADO BACTERIANO 03.	53
FIGURA 11- A- EFEITO DO OE DO C17 NO ISOLADO BACTERIANO A15 SOB AS CONCENTRAÇÕES 1000, 500, 250 E 0 ML.L ⁻¹ ; B- EFEITO DO OE DO C1 NO ISOLADO BACTERIANO A15 SOB AS CONCENTRAÇÕES 1000, 500, 250 E 0 ML.L ⁻¹ ; C- EFEITO DO OE DE <i>E. CAMALDULENSIS</i> NO ISOLADO BACTERIANO A22 SOB AS CONCENTRAÇÕES 1000, 500, 250 E 0 ML.L ⁻¹ ; D- EFEITO DO OE DO C8 NO ISOLADO BACTERIANO A22 SOB AS CONCENTRAÇÕES 1000, 500, 250 E 0 ML.L ⁻¹ ; E- EFEITO DO OE DE <i>E. CAMALDULENSIS</i> NO ISOLADO BACTERIANO U01 SOB AS CONCENTRAÇÕES 1000, 500, 250 E 0 ML.L ⁻¹ ; VI- EFEITO DO OE DO C11 NO ISOLADO BACTERIANO U01 SOB AS CONCENTRAÇÕES 1000, 500, 250 E 0 ML.L ⁻¹	71
FIGURA 12- CURVAS DOSES RESPOSTAS DOS DIÂMETROS DO ISOLADO A15 SUBMETIDOS AS CONCENTRAÇÕES DE 0, 250, 500 E 1000 ML.L ⁻¹ DOS EXTRATOS VEGETAIS DO CLONE 13, CLONE 8, CLONE 1 E CLONE 17, SOB CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO.	72
FIGURA 13- CURVAS DOSES RESPOSTAS DOS DIÂMETROS DO ISOLADO A15 SUBMETIDOS AS CONCENTRAÇÕES DE 0, 250, 500 E 1000 ML.L ⁻¹ DOS EXTRATOS VEGETAIS DO CLONE 11, CLONE 25 E <i>EUCALYPTUS</i> CAMALDULENSIS, SOB CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO.	72
FIGURA 14- CURVAS DOSES RESPOSTAS DOS DIÂMETROS DO ISOLADO A22 SUBMETIDOS AS CONCENTRAÇÕES DE 0, 250, 500 E 1000 ML.L ⁻¹ DOS EXTRATOS VEGETAIS DO CLONE 13, CLONE 8, CLONE 1 E CLONE 17, SOB CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO.	73
FIGURA 15- CURVAS DOSES RESPOSTAS DOS DIÂMETROS DO ISOLADO A22 SUBMETIDOS AS CONCENTRAÇÕES DE 0, 250, 500 E 1000 ML.L ⁻¹ DOS EXTRATOS VEGETAIS DO CLONE 11, CLONE 25 E <i>EUCALYPTUS</i> CAMALDULENSIS, SOB CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO.	73

FIGURA 16- CURVAS DOSES RESPOSTAS DOS DIÂMETROS DO ISOLADO U01 SUBMETIDOS AS CONCENTRAÇÕES DE 0, 250, 500 E 1000 ML.L-1 DOS EXTRATOS VEGETAIS DO CLONE 13, CLONE 8, CLONE 1, CLONE 11 E *EUCALYPTUS CAMALDULENSIS*, SOB CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO..... 74

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- COMPONENTES QUÍMICOS UTILIZADOS NO PREPARO DO MEIO DE CULTIVO CARBOXIMETILCELULOSE (CMC) COMO ÚNICA FONTE DE CARBONO PARA ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS MICRO-ORGANISMOS ESTUDADOS.	31
TABELA 2- VALORES DOS ÍNDICES ENZIMÁTICOS (IE) DE PRODUÇÃO DE CELULASES PELOS 18 ISOLADOS EXTRAÍDOS DO INTERIOR DO PERCEVEJO BRONZEADO.	34
TABELA 4- ANÁLISE DO GRAU DE LIBERDADE (GL), F E P-VALOR DOS FATORES DE CADA ISOLADO ANALISADO, AO NÍVEL DE 5% DE SIGNIFICÂNCIA UTILIZANDO ANOVA.	48
TABELA 5- PARÂMETROS DE REGRESSÃO LINEAR, COM O R ² , F E P-VALOR DE CADA AMOSTRA DE ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DE DIFERENTES ESPÉCIEMENS DE <i>EUCALYPTUS</i> SPP. QUE SE MOSTROU SIGNIFICATIVO PARA O ISOLADO BACTERIANO 01, A UM NÍVEL DE 5% DE SIGNIFICÂNCIA.	49
TABELA 6- DIÂMETROS (MÉDIA ± DESVIO PADRÃO) DA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DO ISOLADO BACTERIANO 01 EXPOSTO AS CONCENTRAÇÕES DE 0; 62,5; 125; 250; 500 E 100 ML.L ⁻¹ DE ÓLEO ESSENCIAL DE EUCALIPTO SOB CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO, A UM NÍVEL DE 5% DE SIGNIFICÂNCIA.	50
TABELA 7- DADOS ENCONTRADOS NA ANÁLISE DE VARIÂNCIA NO DESDOBRANDO DO TIPO DE ÓLEO DENTRO DE CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO PARA A BACTÉRIA 01, A UM NÍVEL DE 5% DE SIGNIFICÂNCIA.	50
TABELA 8- PARÂMETROS DE REGRESSÃO LINEAR, COM O R ² , F E P-VALOR DE CADA AMOSTRA DE ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DE DIFERENTES ESPÉCIEMENS DE <i>EUCALYPTUS</i> SPP. QUE SE MOSTROU SIGNIFICATIVO PARA O ISOLADO BACTERIANO 02, A UM NÍVEL DE 5% DE SIGNIFICÂNCIA.	51
TABELA 9- DIÂMETROS (MÉDIA ± DESVIO PADRÃO) DA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DA ISOLADO BACTERIANO 02 EXPOSTOS AS CONCENTRAÇÕES DE 0; 62,5; 125; 250; 500 E 100 ML.L ⁻¹ DE OE DE EUCALIPTO SOB CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO, A UM NÍVEL DE 5% DE SIGNIFICÂNCIA.	51
TABELA 10- DADOS ENCONTRADOS NA ANÁLISE DE VARIÂNCIA NO DESDOBRANDO DO TIPO DE ÓLEO DENTRO DE CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO PARA O ISOLADO BACTERIANO 02, A UM NÍVEL DE 5% DE SIGNIFICÂNCIA.	52
TABELA 11- PARÂMETROS DE REGRESSÃO LINEAR, COM O R ² , F E P-VALOR DE CADA AMOSTRA DE ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DE DIFERENTES ESPÉCIEMENS DE <i>EUCALYPTUS</i> SPP. QUE SE MOSTROU SIGNIFICATIVO PARA O ISOLADO BACTERIANO 03, A UM NÍVEL DE 5% DE SIGNIFICÂNCIA.	52
TABELA 12- DADOS ENCONTRADOS NA ANÁLISE DE VARIÂNCIA NO DESDOBRANDO DO TIPO DE ÓLEO DENTRO DE CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO PARA A BACTÉRIA 03, A UM NÍVEL DE 5% DE SIGNIFICÂNCIA.	53
TABELA 13- DADOS ENCONTRADOS NA ANÁLISE DE VARIÂNCIA NO DESDOBRANDO DO TIPO DE ÓLEO DENTRO DE CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO PARA O ISOLADO BACTERIANO 02, A UM NÍVEL DE 5% DE SIGNIFICÂNCIA.	53
TABELA 14- DIÂMETRO (MÉDIA±DESVIO PADRÃO) DOS ISOLADOS 1, 2 E 3 SUBMETIDOS A CONCENTRAÇÃO DE 1000 ML.L ⁻¹ DE EXTRATOS VEGETAIS DE 14 CLONES E ESPÉCIE DE <i>EUCALYPTUS</i> SPP. E AS CONCENTRAÇÕES DE TRÊS ANTIBIÓTICOS: NORFLOXACIN (10 MGC.ML ⁻¹), SULFAZOTRIM (25 MGC.ML ⁻¹) E NETILMICINA (30 MGC.ML ⁻¹)	54
TABELA 15- PRINCIPAIS COMPOSTOS EM CADA AMOSTRA DE OE COM SUAS RESPECTIVAS PROPORÇÕES MÉDIAS (%).	68
TABELA 16- DIÂMETRO (MÉDIA±DESVIO PADRÃO) DOS ISOLADOS 1, 2 E 3 SUBMETIDOS A CONCENTRAÇÃO DE 1000 ML.L ⁻¹ DE EXTRATOS VEGETAIS DE 7 CLONES E ESPÉCIE DE <i>EUCALYPTUS</i> SPP. E AS CONCENTRAÇÕES DE TRÊS ANTIBIÓTICOS: NORFLOXACIN (10 MGC.ML ⁻¹), SULFAZOTRIM (25 MGC.ML ⁻¹) E NETILMICINA (30 MGC.ML ⁻¹).	74

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	14
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
CAP. I- ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS INTESTINAIS DE <i>THAUMASTOCORIS PEREGRINUS</i>.....	24
1 INTRODUÇÃO.....	26
2 MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1 INSETOS	28
2.2 ENDOBACTÉRIAS	28
2.2.1 <i>Extração e Cultivo</i>	28
2.2.2 <i>Caracterização morfológica</i>	29
2.2.3 <i>Atividade enzimática quantitativa</i>	30
3 RESULTADOS	32
3.1 EXTRAÇÃO E CULTIVO	32
3.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA.....	32
3.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA	34
4 DISCUSSÃO	35
5 CONCLUSÃO.....	36
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
CAP. II- ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE EUCALIPTO EM BACTÉRIAS INTESTINAIS DO <i>THAUMASTOCORIS PEREGRINUS</i>	40
1 INTRODUÇÃO.....	42
2 MATERIAL E MÉTODOS	45
2.1 ÓLEO ESSENCIAL.....	45
2.2 TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANO (ANTIBIOGRAMA)	46
2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
3 RESULTADOS	48
3.1 ISOLADO BACTERIANO 01.....	49
3.2 ISOLADO BACTERIANO 02.....	50
3.3 ISOLADO BACTERIANO 03.....	52
3.4 ANTIBIÓTICOS X EXTRATOS BOTÂNICOS	54
4 DISCUSSÃO	56
5 CONCLUSÃO.....	59
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
CAP. III- ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEO ESSENCIAL DE EUCALIPTO EM BACTÉRIAS PATOGÊNICAS DE EUCALIPTO	64
1 INTRODUÇÃO.....	66
2 MATERIAIS E MÉTODOS	68

2.1	ÓLEO ESSENCIAL (OE)	68
2.2	TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANO (ANTIBIOGRAMA)	68
2.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	69
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
4	CONCLUSÃO.....	77
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

1 INTRODUÇÃO GERAL

O *Eucalyptus* é um gênero de plantas da família das Myrtaceae, conhecido com o nome comum de eucalipto, composto predominantemente por espécies arbóreas. É um dos primeiros gêneros florestais amplamente cultivado em todo o mundo, e ocupa atualmente uma área de mais de 22 milhões de hectares de floresta plantada que representa 13,4% das plantações florestais mundiais. (HOOGAR et al., 2019; FAVAN, 2019). Originário da Austrália, Indonésia e outras ilhas da Oceania, se expandiu em todo mundo devido ao seu alto grau de disseminação ecológica e sua capacidade de se adaptar, crescendo de maneira satisfatória em diferentes condições climáticas (PIERI et al., 2017; HOOGAR et al., 2019).

O gênero abrange mais de 700 espécies, das quais aproximadamente 20 apresentam relevante interesse econômico, possuindo uma grande variedade de tipos de sistemas de gerenciamento e usos múltiplos. Entre as espécies utilizadas para fins comerciais se destacam as espécies *Eucalyptus grandis*, *E. urophylla* (e seus híbridos interespecíficos), *E. benthamii*, *E. dunii*, *E. saligna* e, *Corymbia citriodora* (PIERI et al., 2017; HOOGAR et al., 2019).

A cultura do eucalipto tornou-se um marco na economia nacional, desde sua introdução até os dias de hoje, pois é de grande importância para o fornecimento de matéria-prima para outras diversas indústrias, tendo um crescimento exponencial em sua produção e comercialização (FAVAN, 2019). Os dados publicados no Relatório Anual 2020 da Indústria Brasileira de Árvores (IBA) apontam, que, as áreas de florestas plantadas no Brasil, ocupam atualmente uma área total de 9 milhões de hectares com uma receita total de R\$ 97,4 bilhões no ano 2019, o que representa um crescimento de 12,6% em relação ao ano anterior (IBA, 2020).

O segmento de árvores cultivadas para fins industriais apresentou significativo crescimento quando comparado com o desempenho de grandes setores, como a indústria e a agropecuária. Isso demonstra que cada vez mais o segmento consolida sua relevância também em dados econômicos nacionais, tendo uma participação de 1,2% do PIB (IBA, 2020). Os produtos provenientes das florestas plantadas são destinados a diversos segmentos industriais como painéis de madeira, pisos laminados, serrados e compensados, siderurgia, carvão vegetal, energia e, principalmente papel e celulose (IBA, 2020).

Devido a sua ampla plasticidade e rápido crescimento e, considerando a elevada demanda de produtos do setor florestal somado à necessidade de sustentabilidade na redução

do uso de madeiras oriundas de florestas nativas, os plantios de eucalipto no Brasil, alcançaram uma área de 6,97 milhões de hectares no ano de 2019 (77% do total de florestas plantadas), predominantemente nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso do Sul (PIERI et al., 2017; IBA, 2020).

Embora a eucaliptocultura seja de elevada importância e grande potencial de produtividade, são muitas as perdas causadas por fatores abióticos e bióticos. Os fatores bióticos são caracterizados pelos distúrbios fisiológicos, ataque de pragas ou doenças e acarretam grandes perdas econômicas para o produtor (SOUSA, 2016).

Segundo Machado et al. (2016), os plantios homogêneos de eucalipto favorecem o estabelecimento de espécies-praga em condições ambientais ideais, pois constituem em uma fonte constante de alimento. O crescimento descontrolado das populações, considerada a principal ameaça das plantações e gera perdas econômicas significativas (SANTOS et al., 2017). Assim, as plantações de eucalipto no Brasil têm sofrido com a introdução e o estabelecimento frequente de pragas exóticas, principalmente oriundas da Austrália, que impactam e reduzem a sua produtividade (BARBOSA et al., 2019). Pragas como o psilídeo-de-concha, o percevejo bronzeado e a vespa-da-galha se disseminaram rapidamente pelos principais estados produtores brasileiros (WILCKEN et al., 2008; BARBOSA et al., 2012).

O *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae), conhecido como percevejo bronzeado é uma praga relativamente nova nos plantios brasileiros e se tornou uma séria ameaça por possuir uma rápida taxa de dispersão em espécies de eucalipto e híbridos, devido à alta capacidade reprodutiva, rápida colonização e ampla infestação (NADEL; NOACK, 2012).

O percevejo bronzeado foi detectado pela primeira vez no Brasil em 2008, nos estados do Rio Grande do Sul e São Paulo, estando atualmente presente também em Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e Mato Grosso do Sul, entre outros (BARBOSA et al., 2012). Por possuir um hábito alimentar sugador, em que o inseto perfura as folhas e os ramos finos para sugar a seiva, esse percevejo causa o prateamento seguido do bronzeamento nas folhas, dificultando a captação dos raios solares, podendo levar a uma desfolha parcial ou total e reduz assim a taxa fotossintética. Em casos mais graves pode ocasionar a morte das plantas, afetando todo o povoamento (LIMA, 2011; SOLIMAN et al., 2012; WILCKEN et al., 2010).

Destaca-se que o controle químico, realizado com utilização de inseticidas sintéticos e específicos, é mais vantajoso devido sua eficiência e facilidade de uso em relação aos demais. Não obstante, os inseticidas sintéticos são predominantemente tóxicos aos seres

humanos e o seu uso em áreas extensas para o controle de insetos-praga pode provocar efeitos nocivos para os aplicadores e para a população de forma geral, além de causar danos ao meio ambiente. Acrescente-se ainda que os inseticidas sintéticos possuem custo elevado e são extremamente restritos pelos organismos de certificação florestal (LEMES et al., 2017). Atualmente, no Brasil, existe apenas um produto químico registrado para controle do *T. peregrinus*: o piretroide Capture 400 EC (FMC Agricultural Solutions) (WILCKEN et al., 2019).

Outra preocupação em relação aos inseticidas sintéticos convencionais é o seu potencial efeito negativo em organismos não-alvo benéficos, como polinizadores e inimigos naturais (QUESADA; SADOFF, 2019). De acordo com Sparks e Nauen (2015), o uso contínuo e extensivo de inseticidas sintéticos aumenta a resistência dos insetos aos produtos e tem sido um fator importante que influencia diretamente o controle e o manejo de pragas. Tendo em vista que o controle do percevejo bronzeado envolve a utilização de tratamentos sintéticos, por meio do uso de inseticidas, e que o uso prolongado destes produtos poderá resultar em aumento da resistência da população destes insetos, far-se-á necessária a utilização de métodos alternativos de manejo, que sejam eficazes e culminem com a redução da utilização de inseticidas sintéticos.

Um estudo prévio identificou a existência de organismos colonizando o interior do *T. peregrinus*. Esses organismos possuem similaridade com as bactérias *Candidatus portiera* e *Arsenophonus* sp. que são bactérias simbiotes de *Bemisia tabaci* além da *Elizabethkingia anophelis*, bactéria isolada do intestino de *Anopheles gambiae*. Dessa forma pode-se concluir que provavelmente organismos simbiotes habitam o interior do percevejo bronzeado e auxiliam em sua sobrevivência (SOUSA, 2016).

Quando os insetos carregam os micro-organismos internamente, podendo estar em seu intestino ou em outros órgãos pode-se afirmar que há ocorrência de uma simbiose do tipo endossimbiose (STEVENS et al., 2001; WERNEGREN, 2002; HIROSE; PANIZZI, 2009).

De forma geral, a simbiose ocorre quando os insetos coexistem em uma relação de associação com micro-organismos. O resultado dessa convivência é auxiliar na digestão de algum composto que possa ser adverso a sua alimentação. Alguns estudos sugerem que algumas bactérias podem estar diretamente envolvidas na digestão de alimentos mais complexos ou no auxílio da desintoxicação de compostos vegetais (PANIZZI; PARRA, 2009; CAZEMIER et al., 2003).

Por conseguinte, a presença de um endosimbionte imprescindível à sobrevivência do inseto pode ser uma alternativa viável para o controle do percevejo bronzeado. Segundo

Sousa (2016), a ação sobre esse micro-organismo, indiretamente, poderá possibilitar o desenvolvimento de estratégias de controle do percevejo bronzeado. Isso posto, se faz necessário conhecer os micro-organismos que estão associados ao percevejo bronzeado afim de aumentar as possibilidades de execução de trabalhos moleculares relacionados com o controle dessa praga.

Além das pragas que causam bastante prejuízo aos produtores, a eucaliptocultura também sofre com o ataque de fitopatógenos, desde à fase de viveiro até na fase adulta. Uma das principais doenças do eucalipto é a mancha bacteriana das folhas, especialmente em viveiros. Estima-se que essa doença causou uma perda de 7,5 milhões de dólares, entre 2003 e 2008 (FERRAZ et al., 2018; GONÇALVES et al., 2008). Causada principalmente por fungos e bactérias, existem diversos agentes etiológicos associados à essa doença no Brasil e em diversos países, no entanto, o gênero *Xanthomonas* spp. é o encontrado em maior ocorrência (FERRAZ et al., 2018).

A mancha foliar do eucalipto é uma doença foliar e seus sintomas iniciais são lesões encharcadas do tipo anasarca em que os tecidos apresentam aspecto de encharcamento e ficam translúcidos ao serem colocados contra a luz (SIVIERO et al., 2019; ALFENAS et al., 2009; FAVAN et al., 2020). Com a evolução da doença, as manchas se tornam lesões necróticas e escuras e, em alguns casos, ocorre o abortamento da área necrosada, o que produz perfurações no centro da lesão. As lesões ficam concentradas ao longo da nervura e nas margens da folha causando redução da área fotossintética. Em seu ápice, ocorre uma intensa desfolha devido à precoce senescência das folhas infectadas, redução de crescimento das plantas no campo, podendo, também, haver necrose em pecíolo e ramos e até a morte de plantas jovens. O desfolhamento intenso é comumente observado em genótipos suscetíveis em condições favoráveis para a doença. (FERRAZ et al., 2018; SIVIERO et al., 2019; FAVAN et al., 2020; ALFENAS et al., 2009; MAFIA et al., 2017; REZENDE et al., 2019).

Uma vez instalada na área, o controle mancha foliar do eucalipto apresenta elevado grau de dificuldade, principalmente, em virtude de sua fácil disseminação. Nesse sentido, o agente causador dessa doença, é considerado um importante patógeno, provocando grande preocupação aos produtores, visto que pode ocasionar grandes danos à produção (FAVAN, 2015).

O mais recomendado para o controle da mancha foliar do eucalipto é a utilização de mudas saudáveis, além da realização de práticas que reduzem as fontes de inóculos e as condições favoráveis à infecção. Essas práticas incluem a rotação de cultura com espécies não hospedeiras, remoção de folhas e plantas infectadas, propagação de clones suscetíveis em

estações desfavoráveis ao desenvolvimento de doenças (clima frio e seco), irrigação por gotejamento ou subirrigação, suspensão e berçários cobertos, além da utilização de ferramentas desinfestadas, evitar ferimentos durante os tratos culturais e controlar os insetos causadores de lesões foliares (SIVIERO et al., 2019; ALFENAS et al., 2009). De acordo com Silva et al. (2018), a aplicação das técnicas para o controle dessa doença possui um elevado custo. Dessa maneira, são necessárias medidas alternativas de controle para manter a viabilidade da produção.

Diante do exposto, faz-se necessário desenvolver novos produtos de proteção de culturas que sejam inteiramente compatíveis com o manejo integrado de pragas e doenças. Uma alternativa viável aos produtos sintéticos convencionais são os produtos botânicos.

Simas et al. (2004) citaram que as plantas são fontes naturais de substâncias inseticidas e antimicrobianas, pois, essas substâncias podem ser produzidas pelo vegetal em resposta a um ataque patogênico.

Algumas plantas produzem compostos secundários, que podem ser utilizados para o desenvolvimento de novos defensivos naturais ou serem precursores de semi-síntese química, no desenvolvimento de produtos. Além disso, os extratos de plantas são ecológicos, biodegradáveis, específicos para patógenos e seguros para mamíferos. Os óleos essenciais têm se destacando no controle de bactérias, pois quando aplicados em dosagens apropriadas, apresentam efeitos na inibição desses microrganismos (ALMEIDA-PEREIRA et al., 2018; SAAD et al., 2017).

Entre os metabólitos secundários com potencial antibactericida encontram-se os terpenos mais voláteis, especialmente aqueles de baixo peso molecular, como os monoterpenos, com 10 carbonos, e sesquiterpenos, com 15 carbonos, que são compostos abundantes nos óleos essenciais de muitas plantas. Em estudos prévios, terpenos como o 1,8-cineol, α -pineno, γ -terpineno, *p*-cimeno, α -felandreno e acetato de α -terpinil foram descritos como os componentes principais de amostras de óleo essencial que apresentaram atividade antimicrobiana para diferentes bactérias (GHASEMI et al., 2020; CHI et al., 2019).

Os óleos essenciais voláteis extraídos de plantas ampliaram o número de ações biológicas para o controle de pragas e doenças de maneira menos impactante ao ambiente e ao consumidor, sendo uma alternativa aos produtos convencionais (PINTO JUNIOR, et al., 2010; BIZZO et al., 2009).

Estudos sobre o potencial das espécies de vegetais, visando obter óleos essenciais como defensivos botânicos, vêm aumentando de forma significativa. Esses óleos podem ser utilizados como um método de controle eficaz, com redução dos custos, preservação do

ambiente e dos alimentos da contaminação química, podendo tornar-se prática adequada à agricultura sustentável (KÉITA et al., 2001) e ao manejo integrado de pragas e doenças.

Espécies dos gêneros *Eucalyptus* e *Corymbia* (PARRA-O et al., 2009), popularmente conhecidas como eucalipto, estão no grupo de plantas cujas folhas são ricas em óleos essenciais com ampla atividade biológica, tais como, fungicida, inseticida, herbicida, acaricida (BATISH et al., 2008). O óleo essencial é produzido e armazenado em glândulas e é distribuído de forma abundante no parênquima da folha da maioria das espécies (SALGADO et al., 2003).

Pesquisas realizadas com diferentes genótipos de eucalipto como fontes de bio-bactericidas indicaram bons resultados no controle de diversas bactérias (KNEZEVIC et al., 2016; MEKONNEN et al., 2016). Carson e Riley et al. (1995) concluíram que óleos essenciais de plantas podem manifestar efeito antimicrobiano contra bactérias, inclusive em espécies resistentes a antibióticos. Logo, como as plantas produzem diversos metabólitos secundários que podem apresentar atividade antibactericida e, portanto, serem úteis como alternativa de controle. Assim, o seu uso como método alternativo de controle deve ser agregado ao manejo de doenças e o manejo integrado de pragas.

Tendo em vista a importância da eucaliptocultura no Brasil, e a relevância do *T. peregrinus* e da mancha foliar para essa cultura, o presente estudo objetivou a análise da atividade antimicrobiana do óleo essencial de diferentes genótipos de eucalipto em microrganismos endossimbiontes do *T. peregrinus* e em *Xanthomonas* spp. causadoras de mancha foliar, com vistas a propor uma alternativa para auxiliar no controle de pragas e doenças em plantios de eucalipto.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C. *et al.* **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2 ed. Viçosa: Editora UFV. 234p. 2009.
- ALMEIDA-PEREIRA, C. S. *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of a *Croton tetradenius* Baill. germplasm. **Journal of Essential Oil Research**, v.31, n.5, p.379-389, 2019.
- BARBOSA, L. R. *et al.* Biological parameters, life table and thermal requirements of *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae) at different temperatures. **Scientific Reports**, v.9, n.1, p.1-8, 2019.
- BARBOSA, L. R. *et al.* **Efeito de *Eucalyptus* spp. e da superfície foliar na excreção de honeydew e sobrevivência de adultos do percevejo bronzeado**. Embrapa - Comunicado Técnico. 3p. 2012.
- BATISH, D. R. *et al.* Phytotoxicity of lemon-scented eucalypt oil and its potential use as a bioherbicide. **Crop Protection**, v.23, n.12, p.1209-1214, 2004.
- BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.
- CARPINTERO, D. L.; DELLAPÉ, P.M. A new species of *Thaumastocoris Kirkaldy* from Argentina (Heteroptera: Thaumastocoridae: Thaumastocorinae). **Zootaxa**, n. 1228, p. 61 - 68, 2006.
- CARSON, C. F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.78, n.3, p.264-269. 1995.
- CAZEMIER, A. E. *et al.* *Promicromonospora pachnodae* sp. nov., a member of the (hemi) cellulolytic hindgut flora of larvae of the scarab beetle *Pachnoda marginata*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.83, n.2, p.135-148, 2003.
- CHI, P. T. L. *et al.* Valorization of Citrus Leaves: Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities of Essential Oils. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, p.1-9, 2019.
- FAVAN, J. R. *et al.* **Modelos computacionais e estatísticos para a predição da severidade da mancha foliar causada por *Xanthomonas* spp. em clone híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla***. **Tekhne e Logos**, v.11, n.2, p.50-65, 2020.
- FAVAN, J. R. **Desenvolvimento de sistema inteligente para classificação da severidade da mancha foliar bacteriana do eucalipto**. 2019. 78 p. Tese (doutorado) - Unidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, 2019.
- FAVAN, J. R. **Utilização de redes neurais artificiais aplicadas na discriminação de padrões de doenças florestais**. 2015. 74 p. Dissertação (mestrado) - Unidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, 2015. ok

FERRAZ, H. G. M. *et al.* *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalyptorum* pv. nov. causing bacterial leaf blight on eucalypt in Brazil. **The Plant Pathology Journal**, v.34, n.4, p.269. 2018.

GHASEMI, E. *et al.* Variation in Essential Oil Constituents and Antimicrobial Activity of the Flowering Aerial Parts of *Salvia mirzayanii* Rech. & Esfand. Ecotypes as a Folkloric Herbal Remedy in Southwestern Iran. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v.23, n.1, p.51-64, 2020.

GONÇALVES, R. C. *et al.* Etiology of bacterial leaf blight of *Eucalyptus* in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v.33, n.3, p.180-188, 2008.

HIROSE, E.; PANIZZI, A. R. **Os simbiotes e a nutrição dos insetos**. In: PANIZZI, A.R.; PARRA, J.R.P. (Eds.). Bioecologia e nutrição de insetos: base para o manejo integrado de pragas. Brasília: Embrapa, p.251-276. 2009.

HOOGAR, R.; MALAKANNAVAR, S.; SUJATHA, H. T. Impact of *Eucalyptus* plantations on ground water and soil ecosystem in dry regions. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v.8, n.4, p.2929-2933. 2019.

IBÁ - Instituto Brasileiro de Árvores. **Relatório 2020**. São Paulo: IBÁ. 2020.

KEITA, S. M. *et al.* Efficacy of essential oil of *Ocimum basilicum* L. and *O. gratissimum* L. applied as an insecticidal fumigant and powder to control *Callosobruchus maculatus* (Fab.) [Coleoptera: Bruchidae]. **Journal of Stored Products Research**, v. 37, n. 4, p. 339-349, 2001.

KNEZEVIC, P. *et al.* Antimicrobial activity of *Eucalyptus camaldulensis* essential oils and their interactions with conventional antimicrobial agents against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.178, p.125-136, 2016.

LEMES, P. G. *et al.* Forest Stewardship Council (FSC) pesticide policy and integrated pest management in certified tropical plantations. **Environmental Science and Pollution Research**, v.24, n.2, p.1283-1295, 2017.

LIMA, A. C. V. **Amostragem e dinâmica populacional do percevejo bronzeado *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) em floresta clonal de eucalipto**. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Agrônômicas. UNESP, Botucatu-SP. 83p. 2011.

MACHADO, D. D. N. *et al.* Avaliação de inseticidas no controle de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) percevejo-bronzeado em condições de laboratório. **Floresta e Ambiente**, v.23, n.2, p.245-250, 2016.

MAFIA, R. G.; TEIXEIRA, L. P.; FERREIRA, M. A. Production of eucalypt clones under two irrigation systems and the occurrence of foliar bacteriosis (*Xanthomonas axonopodis* Vauterin). **Scientia Forestalis**, v.45, n.116, p.697-704, 2017.

MEKONNEN, A. *et al.* In vitro antimicrobial activity of essential oil of *Thymus schimperi*, *Matricaria chamomilla*, *Eucalyptus globulus*, and *Rosmarinus officinalis*. **International Journal of Microbiology**, v. 2016. 2016.

NADEL, R. L.; NOACK, A. E. Current understanding of the biology of *Thaumastocoris peregrinus* in the quest for a management strategy. **International Journal of Pest Management**, v.58, n.3, p.257-266, 2012.

NOACK, A.E. *et al.* Efficacy of imidacloprid in the control of *Thaumastocoris peregrinus* on *Eucalyptus scoparia* in Sydney. **Arboriculture & Urban Forestry**, - v.35, n.4, p.192-196, 2009.

PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R.P. **Bioecologia e nutrição de insetos: Base para o manejo integrado de pragas**. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica. 1164 p. 2009.

PARRA-O, C. *et al.* Phylogeny, major clades and infrageneric classification of *Corymbia* (Myrtaceae), based on nuclear ribosomal DNA and morphology. **Australian Systematic Botany**. v. 23, n. 2, 2010.

PIERI, C. *et al.* Principais doenças na eucaliptocultura no Brasil. In: BALDIN, E. L. *et al.* **Inovações em manejo fitossanitário**. Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, p. 16-31, 2017.

PINTO JUNIOR, A. R. *et al.* Bioatividade de óleos essenciais de sassafrás e eucalipto em cascudinho. **Ciência Rural**, v.40, n.3, p.637-643, 2010.

QUESADA, C. R.; SADOE, C. S. Field evaluation of insecticides and application timing on natural enemies of selected armored and soft scales. **Biological Control**, v.133, p.81-90, 2019.

REZENDE, E. H. *et al.* Avaliação da resistência de progênies de *Eucalyptus grandis* para mancha foliar de *Cylindrocladium* e *Kirramyces*. **Summa Phytopathologica**, v.45, n.3, p.295-301, 2019.

SAAD, A. M. *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of the leaves of *Cupressus macrocarpa* Hartweg. Ex Gordon. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.7, n.9, p.207-212, 2017.

SALGADO, A. P. S. P. *et al.* Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. **Ciência e Agrotecnologia** v.27, p.249-254, 2003.

SANTOS, A. *et al.* Multispectral characterization, prediction and mapping of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) attack in *Eucalyptus* plantations using remote sensing. **Journal of Spatial Science**, v.62, n.1, p.127-137, 2017.

SILVA, A. G. *et al.* Severity of *Xanthomonas axonopodis* leaf blight on eucalypt cuttings under different levels of nutrients. **Forest Pathology**, v.48, n.2, e12412. 2018.

SIMAS, N. K. *et al.* Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue-atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Química nova**, v. 27, n. 1, p. 46-49, 2004.

SIVIERO, A. *et al.* **Doenças em eucalipto no Acre**. Embrapa Acre-Circular Técnica 78(INFOTECA-E). 16p. 2019.

SOLIMAN, E. P. *et al.* Biology of *Thaumastocoris peregrinus* in different *Eucalyptus* species and hybrids. **Phytoparasitica**, v.40, n.3, p.223-230, 2012.

SOUSA, T. T. C. D. **Detecção de endobactéria e morfologia do sistema digestório de *Thaumastocoris peregrinus***. Dissertação (Mestrado) em Ciência Florestal na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. 54 p. 2016.

SPARKS, T. C.; NAUEN, R. IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.121, p.122-128, 2015.

STEVENS, L.; GIORDANO, R.; FIALHO, R. F. Male-killing, nematode infections, bacteriophage infection, and virulence of cytoplasmic bacteria in the genus *Wolbachia*. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.32, n.1, p.519-545, 2001.

WERNEGREEN, J. J. Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. **Nature Reviews Genetics**, v.3, n.11, p.850-861, 2002.

WILCKEN, C. F. *et al.* Chemical vs entomopathogenic control of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) via aerial application in *Eucalyptus* plantations. **Scientific Reports**, v.9, n.1, p.1-7, 2019.

WILCKEN, C. F. *et al.* Bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) on *Eucalyptus* in Brazil and its distribution. **Journal of Plant Protection Research**, v.50, p.184-188, 2010.

WILCKEN, C. F. **Percevejo bronzado do eucalipto (*Thaumastocoris peregrinus*) (Hemiptera: Thaumastocoridae): ameaça às florestas de eucalipto brasileiras**. ALERTA PROTEF. Piracicaba-SP. 2008.

Cap. I- Isolamento e caracterização de bactérias intestinais de *Thaumastocoris peregrinus*

RESUMO

As plantações de eucalipto são as mais difundidas no Brasil. O *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) se tornou uma séria ameaça aos plantios por possuir rápida taxa de dispersão em espécies de eucalipto e híbridos. Foram descobertos microrganismos colonizando o interior do *T. peregrinus* que provavelmente sejam essenciais para essa praga. Dessa forma, inibir a ação desses organismos pode auxiliar no manejo integrado do percevejo bronzeado. O trabalho objetivou o isolamento e a caracterização de 18 isolados bacterianos obtidos no interior desse inseto, afim de auxiliar no desenvolvimento de estratégias de controle dessa praga. Foi possível realizar o isolamento e cultivo dos microrganismos presentes do interior do *T. peregrinus*. Os meios de cultura Caldo Nutritivo e Agar Nutritivo se mostram eficientes para o crescimento da bactéria a temperatura 25 ± 2 °C, por 24 horas com fotoperíodo de 12 horas. Todos os isolados encontrados foram do tipo bacilo Gram negativo e aqueles avaliados, positivos para a produção de celulases. Ficou evidenciada a necessidade de testes mais específicos, como os moleculares, para identificação taxonômica dos isolados de forma mais segura.

Palavras chave: Percevejo bronzeado; bactéria simbiótica; *Eucalyptus* spp; gram negativo; degradação enzimática.

ABSTRACT

Eucalyptus plantations occupied approximately 6.97 million hectares of Brazilian territory, representing 77% of total planted trees. *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) has become a serious threat to plantations due to its rapid rate of dispersion in eucalyptus and hybrid species. Microorganisms were discovered colonizing interior of *T. peregrinus* that are probably essential organisms for this pest. Thus, inhibiting action of these organisms can assist in integrated management of this pest. The work aimed to isolate and characterize 18 bacterial isolates of this insect, in order to assist in development of strategies to control this pest. It was possible to carry out the isolation and cultivation of microorganisms present inside *T. peregrinus*. Culture media Caldo Nutritivo and Agar nutritivo are efficient for the growth of bacteria 24 hours at a temperature 25 ± 2 °C and a photoperiod of 12 hours. All isolates found are of the gram negative bacillus type. All isolates evaluated were positive for production of cellulases. Need for more specific tests, such as molecular tests, is evidenced for safer taxonomic identification of isolates.

Keywords: Bronze bug; symbiotic bacteria; *Eucalyptus* spp; negative gram; enzymatic degradation.

1 INTRODUÇÃO

O eucalipto (Myrtales: Myrtaceae) é uma espécie florestal exótica proveniente principalmente da Austrália e tem sido vastamente cultivada no Brasil. As plantações de eucalipto são, em sua maioria, geneticamente homogêneas e contínuas que fornecem grande disponibilidade de alimento para as comunidades locais de insetos. O crescimento descontrolado das populações é a principal ameaça das plantações e gera perdas econômicas significativas (SANTOS et al., 2017).

Uma praga exótica, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae), se tornou uma séria ameaça por possuir rápida taxa de dispersão em espécies de eucalipto e híbridos, devido à alta capacidade reprodutiva, rápida colonização e ampla infestação (NADEL; NOACK, 2012).

O percevejo bronzeado (*T. peregrinus*) também é originário da Austrália e foi detectado pela primeira vez no Brasil em 2008, nos estados do Rio Grande do Sul e São Paulo, estando também atualmente presente nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e Mato Grosso do Sul, entre outros (BARBOSA et al., 2012; WILCKEN et al., 2010).

Essa praga possui um hábito alimentar sugador que perfura as folhas e os ramos finos para sugar a seiva. Os sintomas são caracterizados pelo prateamento seguido do bronzeamento nas folhas, que dificulta a captação dos raios solares, podendo levar a uma desfolha parcial ou total reduzindo assim a taxa fotossintética. Em casos mais graves pode ocasionar a morte do indivíduo e de toda a população (LIMA, 2011; SOLIMAN et al., 2012; WILCKEN et al., 2010).

Em estudo prévio, Sousa (2016) descobriu que existem bactérias colonizando o interior do *T. peregrinus*. Registra-se, contudo, que essas bactérias ainda não são catalogadas. O autor, ao comparar seus resultados com os encontrados em outros estudos, identificou similaridade com as bactérias *Candidatus portiera* e *Arsenophonus* sp. endossimbiontes de *Bemisia tabaci* além da *Elizabethkingia anophelis*, bactéria isolada do intestino de *Anopheles gambiae* que provavelmente tratam-se de organismos simbiotes (SOUSA, 2016) .

Os insetos são os organismos que mais se desenvolveram no planeta e apesar de se alimentarem de uma vasta diversidade de alimentos eles não conseguem digerir todo material alimentar. Isso se dá, em grande parte, devido à presença de moléculas complexas na

composição dos alimentos que podem ser de difícil digestão para o inseto (HIROSE; PANIZZI, 2009).

Por conseguinte, quando as dietas possuem pouco teor nutricional ou algum composto adverso, existem inúmeros micro-organismos simbiotes envolvidos no processo alimentar dos insetos que os auxiliam nestas deficiências (TAMAS et al., 2002; ISHIKAWA, 2003). As simbioses obrigatórias prevalecem particularmente em grupos que se especializaram em alimentos nutricionalmente desequilibrados, como seiva vegetal (HENRY et al., 2015).

A simbiose microbiana tem sido um processo chave que moldou a evolução dos organismos multicelulares nos últimos dois bilhões de anos (HENRY et al., 2015). Segundo Yun et al. (2014), as bactérias simbiotes, localizadas nos intestinos dos insetos, desempenham um relevante papel na regulação do metabolismo do hospedeiro e também promovem uma digestão eficiente para a extração do máximo de energia dos alimentos ingeridos, podendo também proteger o hospedeiro de outros micróbios potencialmente nocivos.

Pelo menos 10% de todas as espécies de insetos catalogadas dependem de simbioses nutricionais obrigatórias em que as bactérias são obrigadas a sintetizar nutrientes que estão ausentes na dieta de seus hospedeiros (BUCHNER, 1965; WERNEGREN, 2004).

Em sua maioria, as bactérias encontradas no sistema digestivo dos insetos são gram-negativas e coliformes, podendo, muitas vezes, ser naturalmente encontradas no meio ambiente e cultivável em meio de cultura. (DILLON, DILLON, 2004; HIROSE et al., 2006). Todavia, apesar dos papéis fundamentais que os simbiotes desempenham na vida de muitos eucariotos, ainda pouco se sabe sobre como se originam as relações cooperativas com as bactérias e porque se formam em alguns hospedeiros eucariotos, mas não em outros (HENRY et al., 2015).

Segundo Sousa (2016), entender micro-organismos que estão associados ao percevejo bronzeado é de extrema importância para aumentar as possibilidades de controle dessa praga. O estudo dos micro-organismos encontrados no aparelho digestivo do percevejo, poderá possibilitar o desenvolvimento de estratégias de controle do mesmo, pois, ao inibir a ação desses organismos, pode-se chegar ao controle da praga de maneira indireta.

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi o isolamento e a caracterização das bactérias intestinais do *T. peregrinus*, encontradas por Sousa (2016), afim de auxiliar no desenvolvimento de estratégias de controle dessa praga.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Genética e Biotecnologia Florestal (LGBF), localizado no Departamento de Engenharia Florestal, na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Campus de Diamantina.

2.1 Insetos

Para a extração das endobactérias, foram utilizados 18 insetos provenientes da criação massal de *T. peregrinus*, localizada no laboratório de Controle Biológico da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM).

A criação dos indivíduos foi realizada em buquês de *Eucalyptus* spp. suscetíveis ao percevejo bronzeado em uma temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa: $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 h.

Para a manutenção da criação, os buquês foram trocados a cada dois dias, garantindo, assim, a turgidez das folhas para a correta alimentação e ovoposição dos insetos.



Figura 1- A- Buquê de criação; B- Composição de cada bandeja de criação; e C- Composição da estante de Criação.

2.2 Endobactérias

2.2.1 Extração e Cultivo

Para o isolamento das bactérias intestinais do percevejo bronzeado, 18 insetos adultos foram desinfestados e foi colocado, individualmente, em um tubo de polipropileno de 1,5 ml contendo álcool a 70% durante 1 minuto. Em seguida, foram transferidos para outro tubo de polipropileno de 1,5 ml contendo hipoclorito de sódio a 2% por 2 minutos e mergulhados, por duas vezes, em água destilada para finalização da desinfestação.

Finalizada a desinfestação, cada inseto foi colocado em microtubo de centrifugação (polipropileno) de 2 ml, contendo água destilada e 3 microesferas (beads), e adicionados a um agitador Disruptor (Mini-Beadbeater™) para serem macerados. Após a completa maceração, os tubos contendo os insetos foram levados à centrifugação por 10 minutos. Após a centrifugação, todo o líquido sobrenadante de cada tubo de polipropileno foi retirado e transferido para um tubo de falcon de 15 ml contendo 10 ml de meio de cultura do tipo Caldo Nutritivo. Os tubos falcon foram colocados, para o crescimento das bactérias, em uma Incubadora do tipo Shaker SL 220 (Solab) com rotação de 150 RPM à temperatura de 25 ± 2 °C por 24 horas. Finalizado esse prazo, 20 µl de cada tubo falcon (caldo nutriente e a bactéria crescida) foram repicadas, com o auxílio de bastão de vidro, em placas de Petri contendo 20 ml de meio Agar Nutriente. As placas montadas foram lacradas com papel filme e dispostas em BOD à 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas por 24 horas para que houvesse o seu crescimento em meio sólido.

2.2.2 Caracterização morfológica

Para a caracterização morfológica, utilizou-se o mecanismo de coloração de Gram (RIBEIRO; SOARES, 1993). Para o teste, foram realizadas esfregações a partir dos isolados bacterianos extraídos do *T. peregrinus*.

Segundo Freitas e Picoli (2007), a coloração de Gram é um método bacterioscópico com a finalidade de classificação de microrganismos com base em suas características tintoriais, tamanho, forma e arranjo celular.

2.2.2.1 Preparo dos esfregaços

Utilizou-se, para os esfregaços, 18 lâminas limpas, uma para cada isolado, que foram flambadas rapidamente na chama do bico de Bunsen. Em seguida, foi adicionado uma gota de água destilada em cada lâmina. Com o auxílio da alça bacteriológica, uma pequena amostra do isolado bacteriano foi retirado e esfregado na placa, com movimentos de rotação da alça bacteriológica, de modo a se obter um esfregaço de forma oval, bem fino e uniforme. Para fixar o esfregaço, a lâmina foi passada (lado oposto ao esfregaço) cinco vezes na chama do bico de Bunsen por 1 segundo.

2.2.2.2 Teste de Coloração de Gram

Após a fixação do esfregaço, a lâmina foi coberta com solução cristal violeta (corante roxo) e deixada por um minuto. Findo o prazo, a lâmina foi lavada rapidamente em água destilada para a retirada do corante. Depois, a lâmina foi coberta com solução de lugol (mordente) por um minuto e lavada com em água destilada para que solução escorresse. Em seguida foi adicionado álcool absoluto à lâmina, e deixado por cerca de 30 segundos. A lâmina foi lavada rapidamente em água corrente para a retirada do álcool. Logo depois, a esta foi coberta com solução fucsina de gram e deixada por mais 30 segundos. Terminado esse prazo, a lâmina foi lavada em água destilada e colocada de forma inclinada para secar em temperatura ambiente.

Após todo o procedimento, foi adicionada uma lamínula em cada lâmina, e uma gota de óleo de imersão e observada no microscópio em objetiva de imersão (100X).

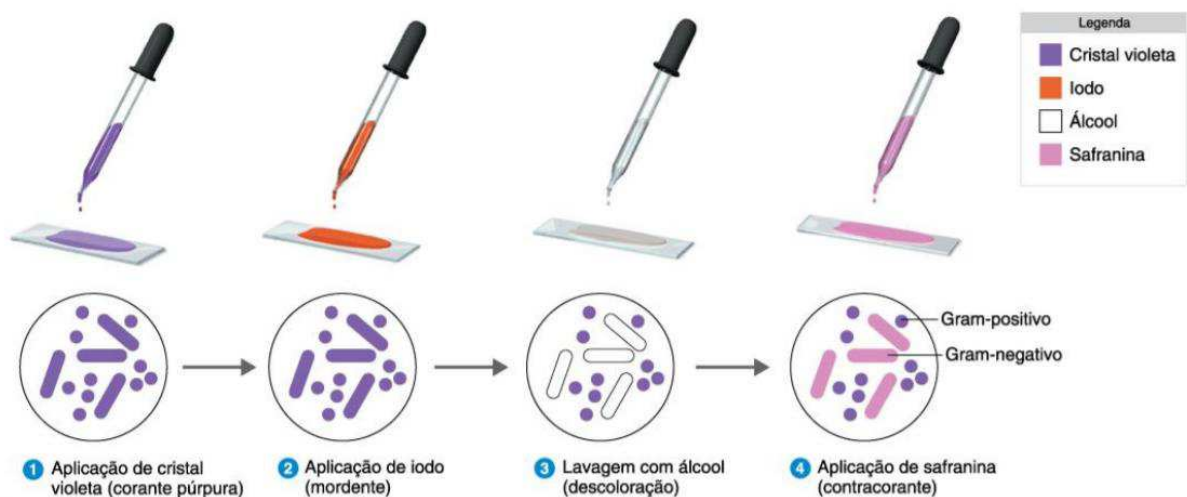


Figura 2- Esquema do método de Coloração de Gram. Fonte: TORTORA; FUNKE; CASE (2012).

2.2.3 Atividade enzimática quantitativa

Para a determinação do potencial enzimático dos isolados analisados, utilizou-se o método qualitativo que consiste em cultivar os microrganismos em meio específico para a produção de celulases e avaliar o halo produzido.

Os isolados obtidos após o crescimento inicial foram posteriormente repicados para placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura adicionado de Carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono. O meio de cultura foi preparado a partir da mistura dos componentes descritos na Tabela 1, com pH ajustado para 6,0, seguido de esterilização em autoclave a 121°C por 15 minutos (min) a 1 atm.

Tabela 1- Componentes químicos utilizados no preparo do meio de cultivo Carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono para análise da atividade enzimática dos micro-organismos estudados.

Componentes	Quantidade (g)
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2
KH ₂ PO ₄	0,4
K ₂ HPO ₄	0,1
NaCl	0,1
Extrato de levedura	0,4
CMC	10
Ágar	15
Água destilada	1000 mL

Por meio da técnica do ponto central, em triplicata, realizou-se o teste do vermelho. Uma quantidade mínima de esporos foi retirada da placa contendo o isolado cultivado em meio de triagem e aplicada em outra placa de Petri contendo o meio CMC como única fonte de carbono e incubadas a 25°C por 96 h afim de verificar a formação de halo de degradação de celulose.

Após o período de incubação, as placas foram coradas com solução de reagente vermelho Congo 0,5% por 20 min. Após esse período, a solução de vermelho congo foi descartada e as placas foram lavadas com solução de NaCl 0,9% 2 M por 20 min, possibilitando a verificação dos micro-organismos produtores celulase. Os resultados positivos foram baseados na formação de halo claro ao redor das colônias. Após a coloração, foram medidos os halos formados pela degradação da celulose (mm) com o auxílio de um paquímetro (NOGUEIRA; CAVALCANTI, 1996). Todas as análises foram feitas em triplicatas.

2.2.3.1 Determinação do índice enzimático (IE)

Para cada micro-organismo, foi calculado o índice enzimático (IE) por meio da relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia expressa como Índice de Relação Enzimática (IRE) (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975; STAMFORD; ARAÚJO; STAMFORD, 1998). Desta forma, quanto maior o halo de degradação, maior o índice enzimático e, conseqüentemente, maior a atividade enzimática. Os índices enzimáticos foram calculados a partir da equação:

$$IRE = \frac{\text{Diâmetro do halo de hidrólise}}{\text{Diâmetro da colônia}}$$

3 RESULTADOS

3.1 Extração e Cultivo

Por meio do procedimento realizado, foi possível o isolamento, o crescimento e o cultivo dos 18 isolados extraídos do interior do percevejo bronzeado. O período de 24 horas de crescimento se mostrou eficiente tanto em meio Caldo Nutritivo, como em meio Agar Nutritivo (Figura 3). Para ambos os meios de cultura, a bactéria cresceu em temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas.

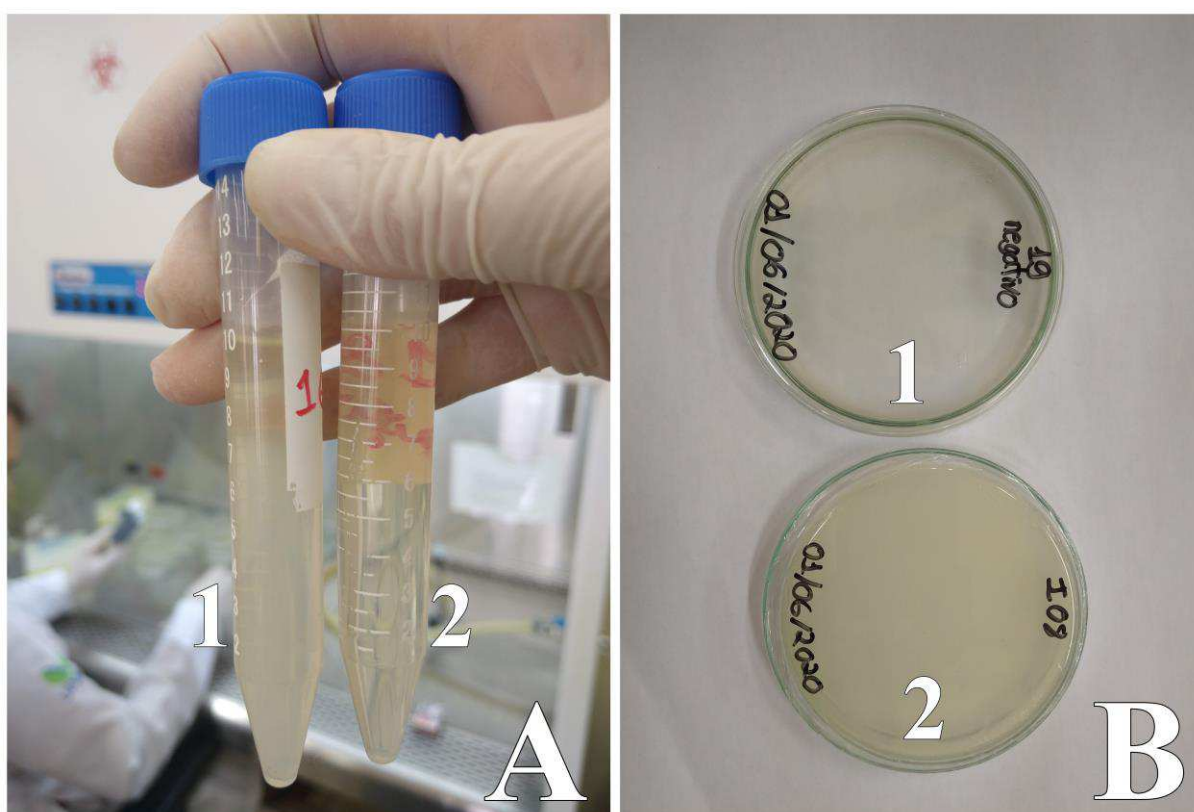


Figura 3- Crescimento da bactéria após 24 hr à 25 ± 2 °C. A- Meio Caldo Nutritivo (1- Isolado 16; 2- Testemunha); B- Meio Agar Nutritivo (1- Isolado 08; 2- Testemunha).

3.2 Caracterização morfológica

Não houve diversidade de colônias crescidas em cada placa de Petri com meio Agar Nutritivo, o que permitiu inferir se tratar de culturas puras obtidas em cada um dos 18 isolamentos.

Após o teste de coloração de gram, os 18 isolados foram avaliados em microscópio óptico na objetiva de 100x. Foi possível identificar que todos os isolados são do tipos bacilos gram negativos.

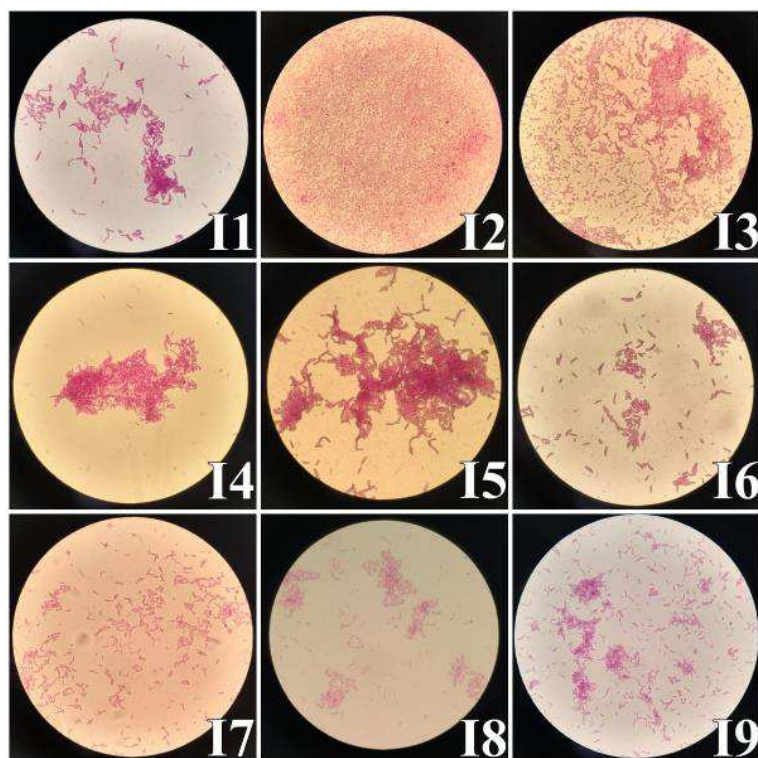


Figura 4- Resultados do teste de gram nos Isolados 1 ao 9 na objetiva de 100X.

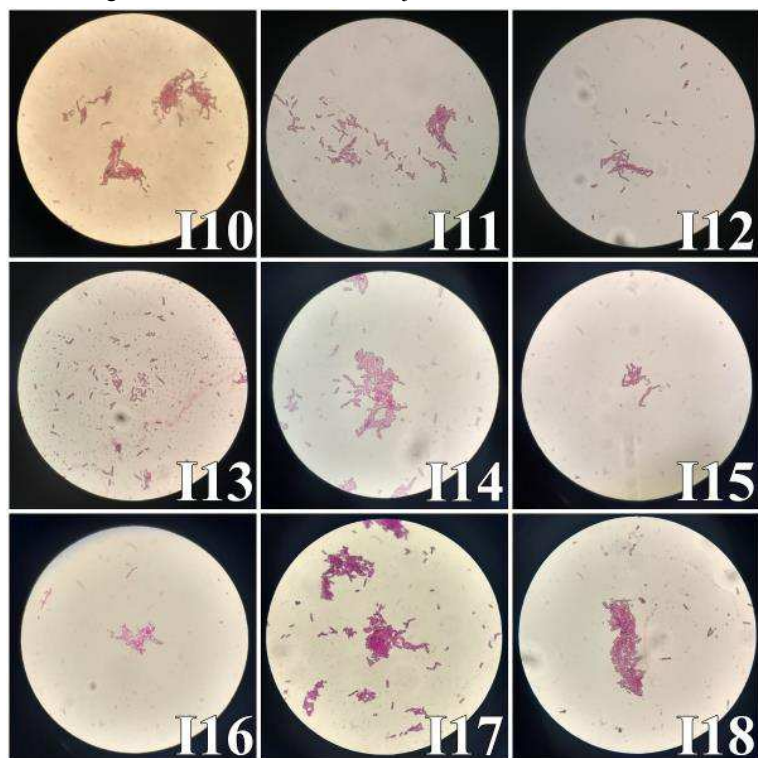


Figura 5- Resultados do teste de gram nos Isolados 10 ao 18 na objetiva de 100X.

3.3 Atividade Enzimática

Todos os isolados avaliados foram positivos para a produção de celulases, ou seja, apresentaram halo de degradação (Tabela 2).

Tabela 2- Valores dos índices enzimáticos (IE) de produção de celulases pelos 18 isolados extraídos do interior do percevejo bronzeado.

Isolado	Øh	Øc	IRE
1	28,87	24,83	1,17
2	8,40	6,88	1,22
3	8,33	5,58	1,50
4	18,95	16,63	1,14
5	21,75	16,12	1,35
6	21,22	14,37	1,48
7	22,12	15,75	1,43
8	23,18	18,85	1,24
9	24,90	14,42	1,73
10	26,23	23,92	1,11
11	29,15	18,87	1,55
12	22,98	19,87	1,16
13	25,40	21,40	1,19
14	25,72	19,78	1,32
15	19,65	14,90	1,35
16	22,93	15,32	1,53
17	19,83	14,85	1,35
18	16,95	14,42	1,18

Legenda: Øc = diâmetro da colônia (mm); Øh = diâmetro do halo (mm); IRE= Índice de Relação Enzimática.

A zona mais clara observada ao redor da colônia em forma de halo translúcido corresponde à ação enzimática do complexo enzimático sobre o substrato celulose.

O halo de hidrólise, bem como o diâmetro da colônia, não apresentaram grande variação entre os isolados analisados (Figura 6), o que demonstra não haver diferenças quanto à produção de enzimas celulases por estes isolados.

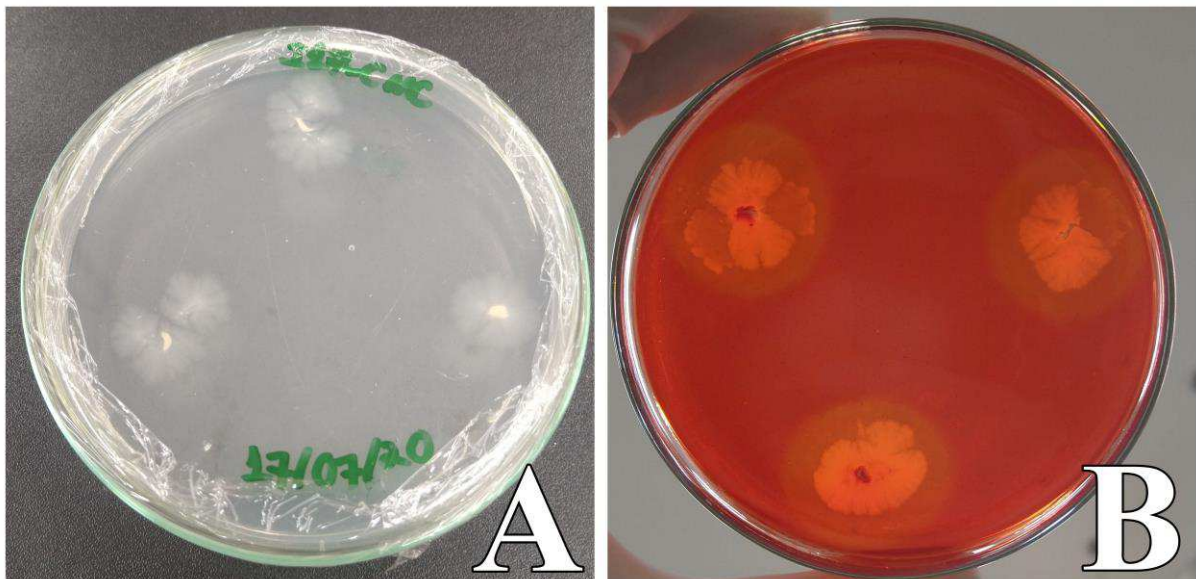


Figura 6- A- Colônias do Isolado 17 crescidas em meio de cultura com CMC.; B- Teste do vermelho. Diâmetro maior= Halo de degradação enzimática, Diâmetro menor= halo da colônia.

4 DISCUSSÃO

A partir dos testes realizados demonstrou-se que os microrganismos presentes no interior do *T. peregrinus* são passíveis de extração e cultivo. Cabe ressaltar que foi um procedimento nunca antes testado para essa praga e foi possível obter dados inéditos que podem contribuir para estudos futuros sobre esses microrganismos e, assim, auxiliar no manejo integrado do percevejo bronzeado.

A temperatura utilizada para o crescimento dos isolado bacterianos, apesar de não ser a mais usual para microrganismos, se mostrou eficaz. Estudos prévios concluíram que a temperatura considerada ideal para o percevejo bronzeado varia em torno de 23 a 27 °C (SOLIMAN et al., 2019; BARBOSA et al., 2019, SAAVEDRA et al., 2015; BARBOSA et al., 2016). Por ser um inseto de porte pequeno e possuir um exoesqueleto extremamente fino, a temperatura interna do seu corpo é relativamente semelhante à temperatura externa.

Segundo Trombetta et al. (2005), usualmente, as bactérias Gram-negativas são mais resistentes do que as Gram-positivas. Esta maior resistência acontece porque as bactérias Gram negativas dispõem de uma barreira em sua parede celular contra determinadas substâncias como por exemplo os antibióticos e enzimas digestivas (MARTINKO; MADIGAN; DUNLAP, 2010).

Segundo Cruz (2018), a formação dos halos em meios sólidos com CMC resulta da sua quebra em fragmentos menores, aos quais o vermelho Congo não se liga. De acordo com Woodward & Wiseman (1982), o vermelho Congo é removido destas regiões no momento da lavagem da superfície das placas com NaCl, ocasionando o halo translúcido e indicando a degradação da celulose. O vermelho congo apresenta forte afinidade pelas ligações β 1-4 (polissacarídeos), ligados em unidade D- Glucopiranosil, fornecendo a base para um ensaio visível para detecção de colônias produtoras de celulase (TEATHER; WOOD, 1982).

Segundo a literatura, diversos autores mencionam que um IRE $\geq 2,5$ para um dado microrganismo confere a este isolado ser um bom produtor de enzimas celulolíticas (PEIXOTO, 2006; OLIVEIRA et al., 2006; LOPES et al., 2011). Dessa forma, pode-se dizer que apesar do potencial da quebra do CMC, os isolados não podem ser considerados bons produtores de enzimas celulolíticas.

5 CONCLUSÃO

As endobactérias presentes nos indivíduos de *T. peregrinus* podem ser isoladas e cultivadas em diferentes meios de cultura sob condições laboratoriais.

A partir dos resultados encontrados, concluiu-se que a metodologia empregada foi eficiente para o isolamento, crescimento e cultivo dos isolado bacterianos presentes no interior do percevejo bronzeado. Os meios de cultura Caldo Nutritivo e Agar Nutritivo demonstraram ser efetivos quanto ao crescimento dos isolados bacterianos no período proposto de 24 horas.

Os 18 isolados estudados não demonstraram diversidade nas suas características morfológicas, sendo todos do tipo bacilo gram negativo. Todos os isolados avaliados foram positivos para a produção de celulases, ou seja, apresentaram halo de degradação, contudo, conforme a literatura, esses não podem ser considerados bom produtores de enzimas celulolíticas por apresentarem IRE menor que 2,5.

Posto isto, fica evidenciada a necessidade de testes mais específicos, como os moleculares, para identificação taxonômica dos isolados de forma mais segura. Dessa forma, o próximo passo é a realização de testes de identificação e diferenciação desses isolados, além de um estudo metagenômico para poder identificá-los com precisão.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA, L. R. *et al.* **Efeito de *Eucalyptus* spp. e da superfície foliar na excreção de honeydew e sobrevivência de adultos do percevejo bronzeado.** Embrapa - Comunicado Técnico. 3 p. 2012.

BARBOSA, L. S. *et al.* **Criação massal do percevejo bronzeado, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 (Hemiptera, Thaumastocoridae).** Embrapa Florestas - Fôlder / Folheto / Cartilha (INFOTECA-E). 22 p. 2016.

BARBOSA, L. R. *et al.* Biological parameters, life table and thermal requirements of *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae) at different temperatures. **Scientific Reports**, v.9, n.1, p.1-8, 2019.

BUCHNER, P. **Endosymbiosis of Animals with Plant Microorganisms.** John Wiley, New York. 1965.

CARPINTERO, D. L.; DELLAPÉ, P.M. A new species of *Thaumastocoris* Kirkaldy from Argentina (Heteroptera: Thaumastocoridae: Thaumastocorinae). **Zootaxa**, v. 1228, p. 61 - 68, 2006.

CRUZ, G. G. **Isolamento de micro-organismos celulolíticos em áreas de floresta de eucaliptos da região de Itamarandiba - MG.** Dissertação (Mestrado) em Biocombustíveis na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. 72 p. 2018.

DILLON, R.J.; DILLON, V.M.. The Gut Bacteria of insects: Nonpathogenic Interactions. **Annual Review of Entomology**, v. 49, n. 1, p.71-92, 2004.

FREITAS;V. R., PICOLI; S. U. A Coloração de Gram e as Variações na sua Execução. **NewsLab**,v.82, p:124-128, 2007.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia, Lancaster**, v. 67, p. 597- 607, 1975.

HENRY, Lee M. *et al.* Insect life history and the evolution of bacterial mutualism. **Ecology Letters**, v. 18, n. 6, p. 516-525, 2015.

HIROSE, E. *et al.* Bacteria in the Gut of Southern Green Stink Bug (Heteroptera: Pentatomidae). **Annals of The Entomological Society of America**, v. 99, n. 1, p.91-95, 2006.

HIROSE, E.; PANIZZI, A. R. Os simbioses e a nutrição dos insetos. In: PANIZZI, A.R.; PARRA, J.R.P. (Eds.). **Bioecologia e nutrição de insetos: base para o manejo integrado de pragas.** Brasília: Embrapa, p.251-276. 2009.

IBÁ - Instituto Brasileiro de Árvores. **Relatório 2020.** São Paulo: IBÁ. 2020.

ISHIKAWA, H. Insect symbiosis: an introduction. In: BOURTZIS, K.; MILLER, T.A (Ed). **Insect symbiosis.** Boca Raton: CRC P. p 1-21. 2003.

- LIMA, A. C. V. **Amostragem e dinâmica populacional do percevejo bronzeado *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) em floresta clonal de eucalipto**. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Agronômicas. UNESP, Botucatu-SP. 83p. 2011.
- LOPES, V.R. *et al.* **Atividade da Xilanase em cepas de *Colletotrichum* e *Trichoderma***. SINAFERM, Natal, RN, 2009.
- MARTINKO, J.M.; MADIGAN, M.T.; DUNLAP, P.V. **Microbiologia de Brock**. Artmed, 12 ed., 2010.
- NADEL, R. L.; NOACK, A. E. Current understanding of the biology of *Thaumastocoris peregrinus* in the quest for a management strategy. **International Journal of Pest Management**, v.58, n.3, p.257-266, 2012.
- NOGUEIRA, E.B.S. & CAVALCANTI, M.A.Q. Cellulolytic fungi isolated from processed oats. **Revista de Microbiologia**, , v. 27, p. 7-9, 1996.
- OLIVEIRA, N. A. *et al.* Extracellular hydrolytic enzymes in indigenous strains of rhizobia in Central Amazonia. **Ciência e Tecnologia de Alimentos, Amazônia**, v. 26, p. 853-860. 2006.
- PEIXOTO, A. B. **Estudo da produção de enzimas e gomas por leveduras selvagens coletadas em diversas regiões brasileiras**. 2006. 84 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2006.
- RIBEIRO, M. C.; SOARES, M. M. S. R.. **Microbiologia prática: roteiro e manual**. Atheneu. 5-8pp. 1993.
- SAAVEDRA, M. C. *et al.* The potential global distribution of the Bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero and Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae). **Agricultural and Forest Entomology**, v., p.17, n.4, p.375-388, 2015.
- SANTOS, A. *et al.* Multispectral characterization, prediction and mapping of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) attack in *Eucalyptus* plantations using remote sensing. **Journal of Spatial Science**, v.62, n.1, p.127-137, 2017.
- SOLIMAN, E. P. *et al.* Biology of *Thaumastocoris peregrinus* in different *Eucalyptus* species and hybrids. **Phytoparasitica**, v.40, p.3, p.223-230, 2012.
- Soliman, E. P. *et al.* Susceptibility of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae), a *Eucalyptus* pest, to entomopathogenic fungi. **Scientia Agricola**, v.76, n.3, p.255-260, 2019.
- SOUSA, T. T. C. D. **Detecção de endobactéria e morfologia do sistema digestório de *Thaumastocoris peregrinus***. Dissertação (Mestrado) em Ciência Florestal na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. 54 p. 2016.
- STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do Jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, , v. 18, n. 4, p. 382-385, 1998.

TAMAS, I. *et al.* 50 Million Years of Genomic Stasis in Endosymbiotic Bacteria. **Science**, , v. 296, n. 5577, p.2376-2379, 2002.

TEATHER, R.M.; WOOD, P.J. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, p.777-780, 1982.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TROMBETTA, D. *et al.* Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 49, n. 6, p. 2474-2478, 2005.

WERNEGREN, J. J. Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. **Nature Reviews Genetics**, v.3, n.11, p.850-861, 2002.

WILCKEN, C. F. *et al.* Bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) on *Eucalyptus* in Brazil and its distribution. **Journal of Plant Protection Research**, v.50, p.184-188. 2010.

WOODWARD, J; WISEMAN, A. Fungal and other alfa-D-glucosidasestheir properties and applications. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 4, p.73-79, 1982.

YUN, J.H. *et al.* Insect gut bacterial diversity determined by environmental habitat, diet, Developmental Stage, and Phylogeny of Host. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 80, n. 17, p.5254-5264, 2014.

Cap. II- Atividade antimicrobiana do óleo essencial de eucalipto em bactérias intestinais do *Thaumastocoris peregrinus*

RESUMO

As plantações de eucalipto no Brasil têm sofrido com o ataque de uma praga exótica de alta dispersão, conhecida como percevejo bronzeado, que causa elevados prejuízos aos produtores. A utilização de inseticidas sintéticos pode ocasionar inúmeros impactos ambientais e esbarra na certificação florestal. Uma alternativa viável aos produtos sintéticos convencionais são os produtos botânicos. Foram descobertas bactérias simbióticas vivendo no interior dessa praga que podem ser essenciais para a sua sobrevivência. Dessa forma, foi avaliada a atividade bactericida de diferentes genótipos de eucalipto nas concentrações 1000 ml.L⁻¹; 500 ml.L⁻¹; 250 ml.L⁻¹; 125 ml.L⁻¹; 62,5 ml.L⁻¹ e 0 ml.L⁻¹. As amostras de óleo essencial testadas foram capazes de inibir o crescimento dos isolados bacterianos. As concentrações de 1000 ml.L⁻¹ e 500 ml.L⁻¹ apresentaram os melhores resultados enquanto as concentrações de 125 ml.L⁻¹; 62,5 ml.L⁻¹ e 0 ml.L⁻¹ não apresentaram inibição do crescimento dos isolados bacterianos. Os monoterpenos 1,8-cineol, γ -terpineno, α -pineno, acetato de α -terpinil, *p*-cimeno, α -felandreno e trans-pinocarveol constituíam os compostos principais das amostras de óleo essencial que se mostraram mais eficazes. Dessa forma, o óleo essencial de eucalipto pode auxiliar no manejo dessa praga.

Palavras chave: Percevejo bronzeado; bactéria simbiótica; *Eucalyptus* spp.

ABSTRACT

Eucalyptus plantations in Brazil have suffered with attack of an exotic pest of high dispersion, known as bronze bug, which causes high losses to producers. Use of synthetic insecticides can cause numerous environmental impacts and comes up against forest certification. A viable alternative to conventional synthetic products is botanical products. Symbiotic bacteria have been discovered living inside this pest that may be essential for its survival. Thus, bactericidal activity of different *Eucalyptus* genotypes at concentrations of 1000 ml.L⁻¹ was evaluated; 500 ml.L⁻¹; 250 ml.L⁻¹; 125 ml.L⁻¹; 62.5 ml.L⁻¹ and 0 ml.L⁻¹. Essential oil samples tested were able to inhibit the growth of bacterial isolates. Concentrations of 1000 ml.L⁻¹ and 500 ml.L⁻¹ showed best results while concentrations of 125 ml.L⁻¹; 62.5 ml.L⁻¹ and 0 ml.L⁻¹ did not show growth inhibition of bacterial isolates. Monoterpenes 1,8-cineol, γ -terpinene, α -pinene, α -terpinyl acetate, *p*-cymene, α -felandrene and trans-pinocarveol constituted main compounds of OE samples that were shown to be most effective. Thus, *Eucalyptus* essential oil can assist in management of this pest.

Keywords: Bronze bug; symbiotic bacteria; *Eucalyptus* spp; essential oil; antimicrobial.

1 INTRODUÇÃO

Por serem, em sua maioria, geneticamente homogêneas e contínuas as plantações de eucalipto fornecem grande disponibilidade de alimento para as comunidades locais de insetos herbívoros. O crescimento descontrolado dessas populações gera perdas econômicas significativas sendo uma das principais ameaças às essas plantações (MACHADO et al., 2016; SANTOS et al., 2017).

Nos últimos anos, pragas exóticas se estabeleceram nos centros produtores de eucalipto contribuindo para a redução da produtividade das florestas e elevando os custos de produção. Pragas como o psilídeo-de-concha, o percevejo bronzeado e a vespa-da-galha se disseminaram rapidamente pelos principais estados produtores brasileiros (WILCKEN et al., 2008; BARBOSA et al., 2012).

O *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero e Dellapé, 2006 (Hemiptera: Thaumastocoridae), conhecido como percevejo bronzeado, se tornou uma séria ameaça aos plantios de eucalipto devido à sua rápida taxa de dispersão em espécies e híbridos, alta capacidade reprodutiva, rápida colonização e ampla infestação (NADEL; NOACK, 2012).

Por ter uma taxa de propagação muito rápida, o *T. peregrinus* foi encontrado em mais de 10 países da Europa, África, América do Sul e Oceania (SAAVEDRA et al., 2015). Plantações expostas à altas densidades de *T. peregrinus* sofrem significativas perdas na área fotossintética, acarretando na queda das folhas podendo levar à morte das plantas atacadas (MACHADO et al., 2016).

Apesar dos danos que essa praga tem causado nas plantações de eucalipto pelo mundo, não existem muitos estudos sobre alternativas de controle dessa praga, o que acarreta em um elevado prejuízo aos produtores.

A utilização de inseticidas sistêmicos para o controle do percevejo bronzeado pode ser uma alternativa rápida e eficiente, no entanto o controle químico pode ocasionar a redução de inimigos naturais, intoxicação de usuários e contaminação ambiental, além de ter elevado custo de aplicação e esbarrar nas restrições da certificação florestal (MACHADO et al., 2016, LEMES et al., 2017; WILCKEN et al., 2019).

A falta de produtos sintéticos registrados para o controle dessa praga é um fator de impacto para as plantações de eucalipto. No Brasil, o piretroide Capture 400 EC (FMC Agricultural Solutions) é o único produto químico registrado para controle do *T. peregrinus* (WILCKEN et al., 2019).

Segundo Wilcken et al. (2019) as empresas florestais certificadas têm buscado práticas que preservem o meio ambiente. Desta forma, o controle biológico se torna uma das principais opções viáveis para gerenciar *T. peregrinus* em plantações comerciais de eucalipto, reduzindo a deriva da toxicidade causada pelos controles convencionais. Isso posto, a pesquisa e o desenvolvimento de novos produtos de proteção de culturas que sejam inteiramente compatíveis com o manejo integrado de pragas é de extrema importância. Uma alternativa promissora aos pesticidas sintéticos convencionais são os pesticidas botânicos (ATANASOVA; LEATHER 2018).

As folhas de diversas espécies de eucalipto são ricas em óleos essenciais com ampla atividade biológica, tais como, fungicida, inseticida, herbicida, acaricida (BATISH et al., 2004). Pesquisas realizadas com diferentes genótipos de eucalipto como fontes de bio-bactericidas indicaram bons resultados no controle de diversas bactérias (KNEZEVIC et al., 2016; MEKONNEN et al., 2016).

Em estudo prévio, Sousa (2016), descobriu que existem bactérias colonizando o interior do *T. peregrinus*, contudo, algumas dessas bactérias ainda não são catalogadas. O autor, ao comparar seus resultados aos encontrados em outros estudos, identificou similaridade com as bactérias *Candidatus portiera* e *Arsenophonus* sp. endossimbiontes de *Bemisia tabaci*, além da *Elizabethkingia anophelis*, bactéria isolada do intestino de *Anopheles gambiae*, sendo provavelmente organismos simbiotes (SOUSA, 2016).

A endossimbiose é o tipo de simbiose na qual os insetos carregam os micro-organismos internamente, podendo estar em seu intestino ou em outros órgãos (STEVENS; GIORDANO; FIALHO, 2001; WERNEGREN, 2002; HIROSE; PANIZZI, 2009).

Os insetos, de maneira geral, podem conviver em simbiose com micro-organismos, em uma relação de associação, com o objetivo de auxiliar na digestão de algum composto que possa ser adverso a sua alimentação. Estudos prévios indicam que algumas bactérias podem estar diretamente envolvidas na digestão de alimentos mais complexos ou no auxílio da desintoxicação de compostos vegetais (PANIZZI; PARRA, 2009; CAZEMIER et al., 2003).

Os óleos essenciais vêm se destacando no controle de bactérias, pois quando aplicados em dosagens apropriadas, têm apresentado efeitos na inibição desses microrganismos (ALMEIDA-PEREIRA et al., 2018; SAAD et al., 2017).

Em estudos prévios, os terpenos como o 1,8-cineol, α -pineno, γ -terpineno, *p*-cimeno, α -felandreno e acetato de α -terpinil foram descritos como os componentes principais

de amostras de óleo essencial que apresentaram atividade antimicrobiana para diferentes bactérias (GHASEMI et al., 2020; CHI et al., 2019).

Tendo em vista que o percevejo bronzeado possui bactérias simbióticas em seu sistema digestivo, estas podem ser responsáveis direta pela digestão de compostos prejudiciais ao inseto. Pressupõe-se que produtos antimicrobianos podem representar uma alternativa para o controle dessa praga.

Nesse sentido, o presente estudo objetivou a análise da atividade antimicrobiana do óleo essencial de diferentes genótipos de eucalipto nesses microrganismos, a fim de propor uma alternativa para auxiliar o manejo integrado dessa praga.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Genética e Biotecnologia Florestal (LGBF), localizado no Departamento de Engenharia Florestal, na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Campus de Diamantina.

2.1 Óleo Essencial

Para o presente estudo, foram utilizadas amostras de óleo essencial (OE) extraídas de folhas de clones comerciais provenientes da empresa Gerdau S/A e de plantas de *Eucalyptus camaldulensis* localizadas Centro Integrado de Propagação de Espécies Florestais (CIPEF). Realizou-se a extração de 14 amostras de OE (Quadro 1) de indivíduos isentos do ataque do inseto e de outros atacados pela praga. Essa extração foi feita a fim de identificar diferenças na composição dos OE em resposta do ataque da praga, para cada um desses genótipos.

Quadro 1- Descrição das amostras de OE utilizadas no estudo quanto ao seu genótipo, resistência ou suscetibilidade ao *T. peregrinus* e presença e ausência do ataque do inseto

OE	Genótipo	Classificação	Presença de Inseto
A	C13	Resistente	Presença
B	C13	Resistente	Ausência
C	C8	Resistente	Presença
D	C8	Resistente	Ausência
E	C1	Resistente	Presença
F	C1	Resistente	Ausência
G	C17	Suscetível	Presença
H	C17	Suscetível	Ausência
I	C11	Suscetível	Presença
J	C11	Suscetível	Ausência
K	C25	Suscetível	Presença
L	C25	Suscetível	Ausência
M	<i>E. camaldulensis</i>	Suscetível	Presença
N	<i>E. camaldulensis</i>	Suscetível	Ausência

As metodologias de extração e caracterização química das amostras do OE utilizadas para esse experimento foram descritas em Avila (2016). Na Tabela 2 pode-se observar os principais compostos em cada amostra de OE com as suas respectivas proporções médias (%).

Tabela 2- Principais compostos em cada amostra de OE com suas respectivas proporções médias (%)

OE	1,8-cineol	γ -terpineno	α -pineno	acetato de α -terpinil	<i>p</i> -cimeno	α -felandreno
A	49,21	17,02		9,26		
B	51,30	15,11	20,57			
C	50,39	15,56	27,99			

D	52,95		30,14	4,63		
E	49,21		32,41	6,52		
F	49,94		32	6,13		
G	56,20		18,81			
H	54,32		22,44			
I	57,4		24,45	5,97		
J	40,08		41,44	3,56		
K	52,49		28,80	5,19		
L	57		28,13	5,23		
M		43,86			12,61	51,08
N		37,16			26,78	48,23

2.2 Teste de sensibilidade antimicrobiano (antibiograma)

Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados em três isolados bacterianos do *T. peregrinus* cuja a metodologia de isolamento está descrita no Capítulo I do presente documento.

Para o teste de sensibilidade antimicrobiana utilizou-se a técnica de difusão de disco em meio sólido (disco difuso). Os ensaios foram realizados utilizando os métodos modificados de Kirby e Bauer descritos por Mekonnen et al. (2016). Com a finalidade de aumentar a solubilidade, diminuir a volatilização e evitar perdas as amostras de OE foram diluídas em Dimetilsulfóxido (DMSO). Para cada amostra de OE foram preparadas seis concentrações (1000 mL.L⁻¹; 500 mL.L⁻¹; 250 mL.L⁻¹; 125 mL.L⁻¹; 62,5 mL.L⁻¹ e 0 mL.L⁻¹).

Discos de papel filtro de 6 mm de diâmetro foram acondicionados em placas de Petri autoclavadas e posteriormente foram embebidos com 5 µl de cada concentração. Com vistas a evitar que o OE evapore, cada placa foi vedada com papel filme e coberta com papel alumínio, sendo armazenada em câmara de fluxo à temperatura ambiente por 24 horas para posterior ensaio. Findo esse prazo, os isolados bacterianos foram inoculados em placas de Petri contendo 20 ml de meio Agar Mueller Hinton e os discos com as concentrações foram arranjados nas placas. Após montagem, as placas foram lacradas com papel filme e acondicionadas em BOD à 25 °C e fotoperíodo de 12 horas por 24 horas.

Os testes foram realizados em triplicatas e os resultados expressos pela média aritméticas do diâmetro (mm) dos halos de inibição formado ao redor dos discos. Os halos de inibição foram medidos com auxílio de um paquímetro.

2.3 Análise Estatística

O trabalho foi organizado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (6x14) totalizando 84 tratamentos com três repetições para cada isolado bacteriano. Os dados foram submetidos a ANOVA (Análise de variância) para verificar a interação entre

os fatores. Desdobrando a concentração dentro de cada nível de amostra de OE, os dados quantitativos foram analisados por regressão (método dos mínimos quadrados e teste T). Quando o desdobramento foi a amostra do OE dentro de cada nível de concentração, os dados foram submetidos ao teste Scott-Knot.

Realizou-se, também, uma análise das amostras puras com três antibióticos conhecidos com o objetivo de comprovar a eficácia dos produtos biológicos com os produtos sintéticos. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) com três isolados, 14 concentrações de extratos vegetais e três de antibióticos, com três repetições cada. Os dados foram analisados pelos testes de Shapiro Wilk e Levene para verificar a normalidade dos dados e homogeneidade das variâncias, respectivamente. Em seguida, as amostras foram submetidas a Análise de Variância (Teste F ou Kruskal-Wallis). Quando significativas, as diferenças entre os tratamentos foram verificadas pelos procedimentos de Dunnett e Tukey, tendo o antibiótico Netilmicina como controle, ou método de Dunn, quando não atendia os pressupostos dos testes paramétricos.

Registra-se que todos os testes foram conduzidos a 5% de significância com auxílio do software R versão 4.0.1 (TEAM R CORE, 2013), pacote ExpDes.pt (FERREIRA et al., 2018), pacote pgirmess (GIRAUDOUX et al., 2018) e pacote asbio (AHO, K., 2014).

3 RESULTADOS

Observou-se que as amostras de OE testadas possuem ação antimicrobiana, pois foram capazes de inibir o crescimento dos três isolados bacterianos (Figura 7).

A partir das análises realizadas pela ANOVA, verificou-se que, para os três isolados bacterianos estudados, houve diferença significativa para os fatores isolados concentração e OE, além de apresentar diferença na interação entre os referidos fatores (Tabela 3). A partir disso, foi realizado o desdobramento fatorial para cada isolado bacteriano, a fim de descobrir quais OEs e concentrações apresentaram diferença significativa.

Tabela 3- Análise do Grau de liberdade (GL), F e *p*-valor dos fatores de cada isolado analisado, ao nível de 5% de significância utilizando ANOVA.

Isolado bacteriano	Concentração			Óleo			Concentração x Óleo		
	GL	F	P	GL	F	p	GL	F	p
Isolado 01	5	124,469	<0,01	13	9,222	<0,01	65	4,958	<0,01
Isolado 02	5	10,8588	<0,01	13	2,8172	<0,01	65	1,6291	<0,01
Isolado 03	5	72,319	<0,01	13	13,552	<0,01	65	4,803	<0,01



Figura 7 – I- Efeito do OE D no isolado bacteriano 01 sob as concentrações 1000, 500, 250 e 125 ml.L⁻¹; II- Efeito do OE N no isolado bacteriano 01 sob as concentrações 1000, 500, 250 e 125 ml.L⁻¹; III- Efeito do OE N no isolado bacteriano 02 sob as concentrações 1000, 500, 250 e 125 ml.L⁻¹; IV- Efeito do OE F no isolado bacteriano 02 sob as concentrações 1000, 500, 250 e 125 ml.L⁻¹; V- Efeito do OE F no isolado bacteriano 03 sob as concentrações 1000, 500, 250 e 125 ml.L⁻¹; VI- Efeito do OE D na Isolado bacteriano 03 sob as concentrações 1000, 500, 250 e 125 ml.L⁻¹.

3.1 Isolado Bacteriano 01

Para o isolado bacteriano 01, quando analisado a amostra de OE dentro de cada nível de concentração, constatou-se que houve diferença significativa para os OEs A, B, C, D, E, F, G, H, I, L, M e N (Tabela 4).

Tabela 4- Parâmetros de regressão linear, com o R^2 , F e p -valor de cada amostra de óleo essencial obtido de diferentes espécies de *Eucalyptus* spp. que se mostrou significativo para o isolado bacteriano 01, a um nível de 5% de significância.

OE	β_0	β_1	R^2	F	p -valor
A	5,86570	0,00280	0,979	44,25	<0,01
B	5,85620	0,00170	0,966	15,86	<0,01
D	5,60860	0,00400	0,9421	85,89	<0,01
E	5,23900	0,00680	0,9008	259,87	<0,01
F	5,49140	0,00640	0,9668	226,3	<0,01
G	5,64570	0,00360	0,9516	70,01	<0,01
H	5,78290	0,00190	0,9296	20,01	<0,01
I	5,96290	0,00160	0,9897	14,85	<0,01
L	5,83140	0,00190	0,9636	19,39	<0,01
M	5,79430	0,00170	0,8938	15,27	<0,01
N	5,46190	0,0042	0,8706	96,44	<0,01

Ajustou-se um modelo de regressão linear, pelos parâmetros β_0 e β_1 , para cada amostra de OE que apresentou diferença significativa, estimando assim, o comportamento médio da inibição do crescimento do isolado bacteriano em relação à concentração (Figura 8).

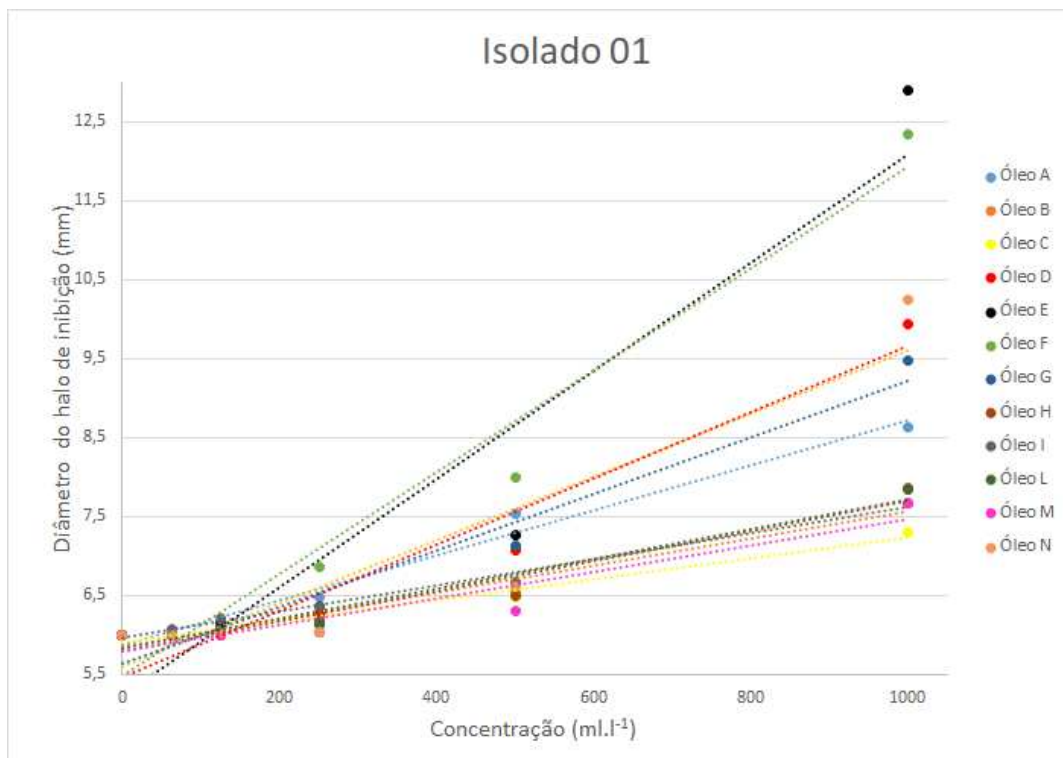


Figura 8- Dispersão e modelo de regressão dos óleos que mostraram diferença significativa quando analisado a amostra de óleo essencial dentro de cada nível de concentração para o isolado bacteriano 01.

Os OEs C, J e K não apresentaram diferença significativa no desdobramento da amostra de OE dentro de cada nível de concentração (Tabela 5).

Tabela 5- Diâmetros (média \pm desvio padrão) da inibição do crescimento do isolado bacteriano 01 exposto as concentrações de 0; 62,5; 125; 250; 500 e 1000 ml.L⁻¹ de óleo essencial de eucalipto sob condições de laboratório, a um nível de 5% de significância.

OE	Concentração (ml.L ⁻¹)					
	0	62,5	125	250	500	1000
C	6,00 \pm 0 ns	6,00 \pm 0 ns	6,07 \pm 0,06 ns	6,13 \pm 0,15 ns	6,47 \pm 0,06 ns	7,30 \pm 0,26 ns
J	6,00 \pm 0 ns	6,07 \pm 0 ns	6,20 \pm 0 ns	6,37 \pm 0,06 ns	6,67 \pm 0,50 ns	7,67 \pm 0,32 ns
K	6,00 \pm 0 ns	6,00 \pm 0 ns	6,00 \pm 0 ns	6,03 \pm 0,06 ns	6,50 \pm 0,06 ns	6,63 \pm 0,12 ns

ns- Não significativo pela Análise de Variância.

Analisando o desdobramento da amostra de OE dentro de cada nível de concentração, constatou-se, pela ANOVA, que não houve diferença significativa entre as amostras de OE para as concentrações 0; 62,5; 125 e 250 ml.L⁻¹. As concentrações 500 e 1000 ml.L⁻¹ apresentaram diferença significativa para as diferentes amostras de OEs (Tabela 6).

Tabela 6- Dados encontrados na Análise de Variância no desdobramento do tipo de óleo dentro de cada nível de concentração para a bactéria 01, a um nível de 5% de significância.

ANOVA	Tipo de OE: Concentração ml.L ⁻¹					
	0	62,5	125	250	500	1000
GL	13	13	13	13	13	13
F	0	0,0025	0,0404	0,4275	2,1633	31,3775
p-valor	1	1	1	0,9581	0,0131	0

O teste de Scott-Knot demonstrou que, para a concentração de 500 ml.L⁻¹, os OEs A, D, E, F e G não diferenciam estatisticamente entre si, apresentando as maiores médias de inibição do isolado bacteriano, enquanto os outros OEs (B, C, H, I, J, K, L, M e N) não diferenciaram entre si, apresentando as menores médias.

Para a concentração 1000 ml.L⁻¹, o teste de Scott-Knot apresentou maior diferença significativa entre os OEs, resultando em quatro grupos que diferenciam entre si. O primeiro grupo, que apresentou as melhores médias, é composto pelos OEs E e F (12,90 mm e 12,33 mm respectivamente). O segundo grupo mostrou que não houve diferença entre os OEs N, D e G. O grupo com a maior quantidade de OEs, foi o terceiro, composto pelos OEs A, B, C, H, I, L e M. O quarto, e último grupo, apresentou as menores médias de diâmetro, e foi formado pelos OEs J e K (6,63 mm e 6,16 mm respectivamente).

3.2 Isolado Bacteriano 02

A análise da amostra de OE dentro de cada nível de concentração para os testes realizados no isolado bacteriano 02 possibilitou observar que houve diferença significativa apenas para os OEs G e N (Tabela 7).

Tabela 7- Parâmetros de regressão linear, com o R^2 , F e p -valor de cada amostra de óleo essencial obtido de diferentes espécies de *Eucalyptus* spp. que se mostrou significativo para o isolado bacteriano 02, a um nível de 5% de significância.

OE	β_0	β_1	R^2	F	p -valor
G	2,3514	0,0270	0,8252	85,78	<0,01
N	5,6105	0,0167	0,9593	32,78	<0,01

Ajustou-se um modelo de regressão linear, pelos parâmetros β_0 e β_1 , para cada amostra de OE que apresentou diferença significativa para estimar o comportamento médio da inibição do crescimento do isolado bacteriano 02 em relação à concentração (Figura 9).

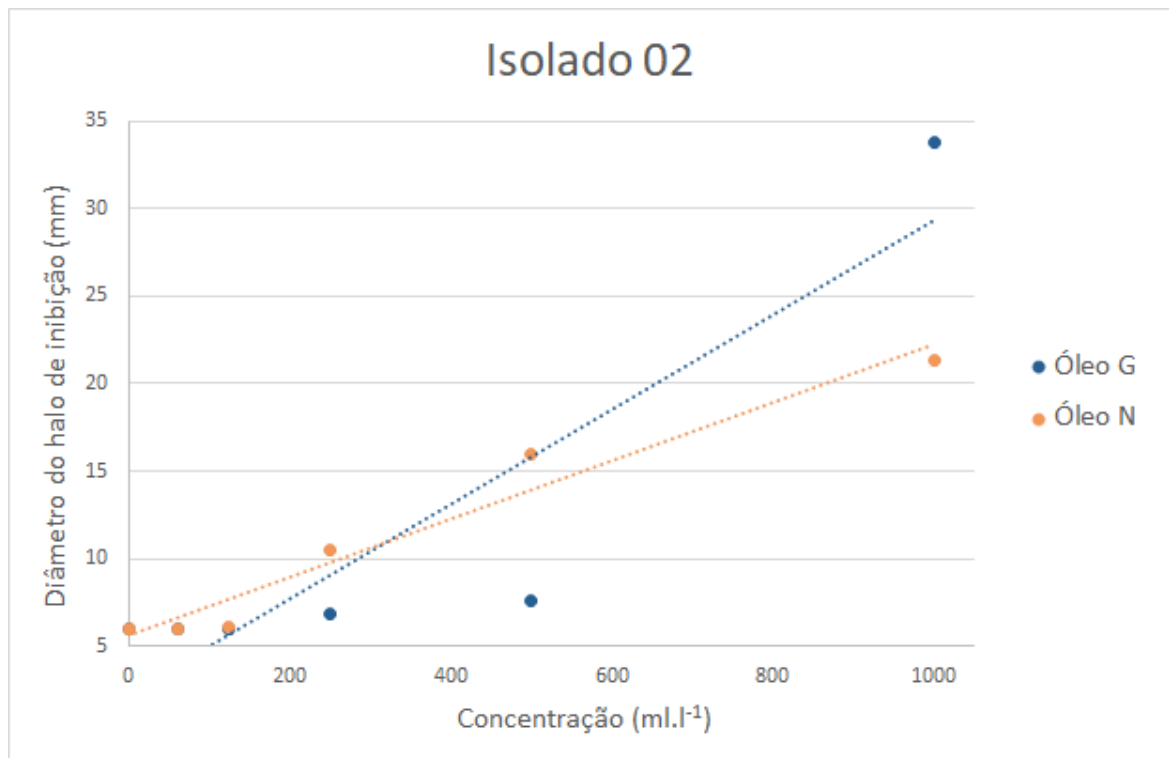


Figura 9- Dispersão e modelo de regressão dos óleos que mostraram diferença significativa quando analisado a amostra de óleo essencial dentro de cada nível de concentração para o isolado bacteriano 02.

Foi possível observar que, para o isolado bacteriano 02, 12 amostras de OEs não apresentaram diferença significativa no desdobramento da amostra de OE dentro de cada nível de concentração. Esses podem ser observados na Tabela 8 a seguir.

Tabela 8- Diâmetros (média \pm desvio padrão) da inibição do crescimento da Isolado bacteriano 02 expostos as concentrações de 0; 62,5; 125; 250; 500 e 100 ml.L^{-1} de OE de eucalipto sob condições de laboratório, a um nível de 5% de significância

OE	Concentração (ml.L^{-1})					
	0	62,5	125	250	500	1000
A	6,00 \pm 0 ns	6,00 \pm 0 ns	6,07 \pm 0,06 ns	6,07 \pm 0,06 ns	6,53 \pm 0,06 ns	8,73 \pm 1,88 ns
B	6,00 \pm 0 ns	6,00 \pm 0 ns	6,00 \pm 0 ns	6,00 \pm 0 ns	6,17 \pm 0,29 ns	6,63 \pm 0,71 ns
C	6,00 \pm 0 ns	6,00 \pm 0 ns	6,17 \pm 0,15 ns	6,17 \pm 0,15 ns	6,43 \pm 0,51 ns	6,67 \pm 0,76 ns
D	6,00 \pm 0 ns	6,00 \pm 0 ns	6,07 \pm 0,06 ns	6,07 \pm 0,06 ns	7,03 \pm 0,81 ns	10,10 \pm 3,44 ns
E	6,00 \pm 0 ns	6,00 \pm 0 ns	6,10 \pm 0,17 ns	6,10 \pm 0,17 ns	6,20 \pm 0,17 ns	7,00 \pm 0,89 ns
F	6,00 \pm 0 ns	6,00 \pm 0 ns	6,00 \pm 0 ns	6,93 \pm 1,21 ns	12,80 \pm 1,47 ns	13,70 \pm 1,18 ns
H	6,00 \pm 0 ns	6,00 \pm 0 ns	6,00 \pm 0 ns	6,07 \pm 0,12 ns	6,63 \pm 0,35 ns	9,67 \pm 0,29 ns
I	6,00 \pm 0 ns	6,00 \pm 0 ns	6,10 \pm 0 ns	6,47 \pm 0,06 ns	8,03 \pm 1,17 ns	10,17 \pm 0,85 ns
J	6,00 \pm 0 ns	6,00 \pm 0 ns	6,13 \pm 0,15 ns	6,43 \pm 0,12 ns	6,57 \pm 0,12 ns	8,20 \pm 1,59 ns
K	6,00 \pm 0 ns	6,03 \pm 0,06 ns	6,07 \pm 0,06 ns	6,37 \pm 0,55 ns	7,27 \pm 1,77 ns	8,10 \pm 2,19 ns

L	6,00±0 ns	6,00±0 ns	6,03±0,06 ns	6,13±0,15 ns	6,30±0,20 ns	6,70±0,52 ns
M	6,00±0 ns	6,03±0,06 ns	6,00±0 ns	6,07±0,06 ns	6,63±0,71 ns	10,00±3,32 ns

ns- Não significativo pela Análise de Variância.

Verificou-se, pela ANOVA, que não houve diferença significativa entre as amostras de OE para as concentrações 0; 62,5; 125; 250 e 500 ml.L⁻¹ analisando o desdobramento da amostra de OE dentro de cada nível de concentração para o isolado bacteriano 02. A única concentração a apresentar diferença significativa, no isolado bacteriano 02, para os diferentes amostras de OEs, foi a de 1000 ml.L⁻¹ (Tabela 9).

Tabela 9- Dados encontrados na Análise de Variância no desdobrando do tipo de óleo dentro de cada nível de concentração para o isolado bacteriano 02, a um nível de 5% de significância.

ANOVA	Tipo de OE: Concentração ml.L ⁻¹					
	0	62,5	125	250	500	1000
GL	13	13	13	13	13	13
F	0	0	0,0006	0,2302	1,3767	9,3554
p-valor	1	1	1	0,9977	0,1752	0

Para a concentração de 1000 ml.L⁻¹, foi possível analisar no teste de Scott-Knot, que o OE G obteve a maior média de inibição (33,8 mm) do isolado bacteriano 02 e diferiu estatisticamente dos demais. O OE N apresentou a segunda maior média e também diferenciou estatisticamente dos demais. Os OEs restantes não apresentaram diferença estatística entre si, mas foi possível constatar que os OEs B, C e L tiveram as menores médias (6,7 mm, 6,66 mm e 6,63 mm respectivamente).

3.3 Isolado Bacteriano 03

Observou-se que houve diferença significativa para os OEs C, D, E, F, G, H e M para o isolado bacteriano 03, quando o desdobramento foi entre a amostra de OE dentro de cada nível de concentração (Tabela 10).

Tabela 10- Parâmetros de regressão linear, com o R², F e p-valor de cada amostra de óleo essencial obtido de diferentes espécimens de *Eucalyptus* spp. que se mostrou significativo para o isolado bacteriano 03, a um nível de 5% de significância

OE	β0	β1	R2	F	p-valor
C	6,1257	0,0030	0,9507	19,32	<0,01
D	5,6695	0,0058	0,9924	70,3	<0,01
E	6,0333	0,0056	0,9755	64,78	<0,01
F	5,3838	0,0126	0,913	330,82	<0,01
G	6,3629	0,0038	0,8025	31,07	<0,01
H	5,7057	0,0034	0,9149	23,85	<0,01
M	5,4057	0,0046	0,8455	43,6	<0,01

Por meio dos parâmetros β0 e β1, estimou-se o comportamento médio da inibição do crescimento do isolado bacteriano 03 em relação à concentração, a partir do ajuste de um modelo de regressão linear para cada amostra de OE que apresentou diferença significativa (Figura 10).

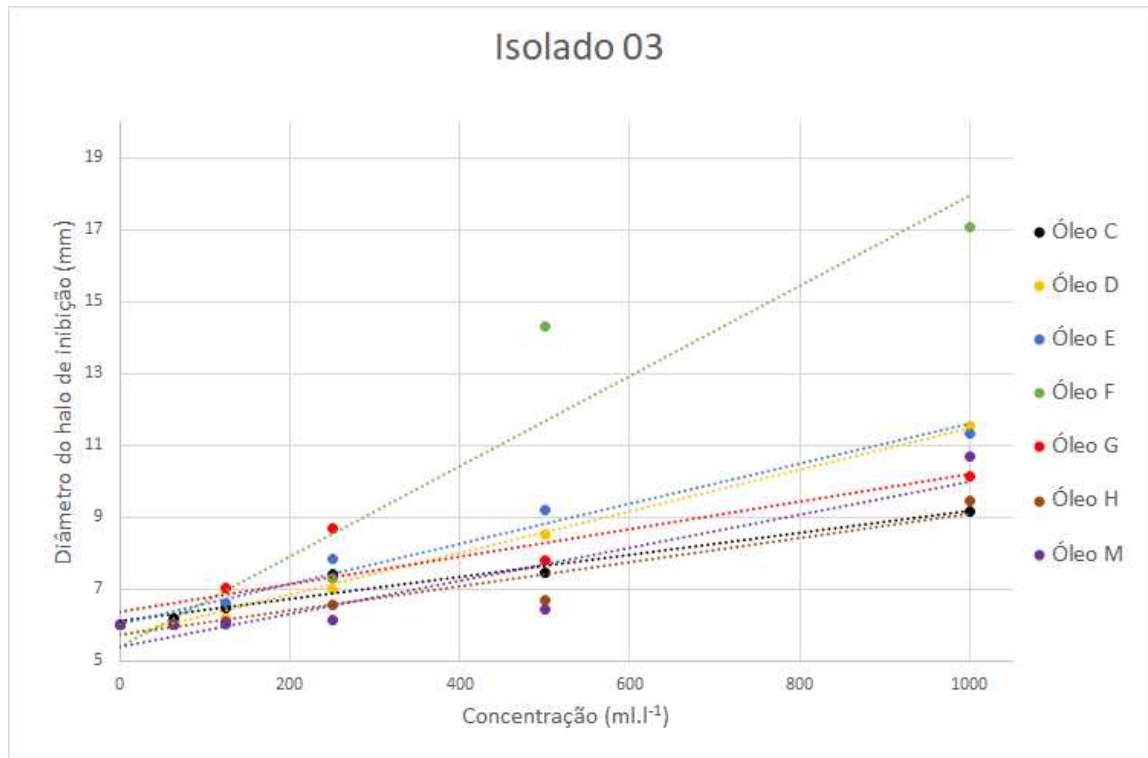


Figura 10- Dispersão e modelo de regressão dos óleos que mostraram diferença significativa quando analisado a amostra de Óleo essencial dentro de cada nível de concentração para o isolado bacteriano 03.

Os OEs A, B, J, K, L e N não apresentaram diferença significativa no desdobramento da amostra de OE dentro de cada nível de concentração (Tabela 11).

Tabela 11- Dados encontrados na Análise de Variância no desdobramento do tipo de óleo dentro de cada nível de concentração para a bactéria 03, a um nível de 5% de significância.

OE	Concentração (ml.L ⁻¹)					
	0	62,5	125	250	500	1000
A	6,00±0 ns	6,00±0 ns	6,00±0 ns	6,00±0 ns	6,17±0,29 ns	6,73±0,87 ns
B	6,10±0 ns	6,17±0 ns	6,23±0,12 ns	6,37±0,23 ns	6,90±0,56 ns	7,63±0,32 ns
I	6,00±0 ns	6,00±0 ns	6,10±0,17 ns	6,10±0,17 ns	6,50±0,50 ns	6,67±0,58 ns
J	6,00±0 ns	6,00±0 ns	6,00±0 ns	6,07±0,06 ns	6,83±0,29 ns	8,10±0,26 ns
K	6,00±0 ns	6,00±0 ns	6,17±0,12 ns	6,30±0,20 ns	7,07±0,98 ns	7,67±0,99 ns
L	6,00±0 ns	6,00±0 ns	6,10±0 ns	6,17±0,12 ns	6,23±0,23 ns	7,47±0,50 ns
N	6,00±0 ns	6,10±0 ns	6,50±0,50 ns	6,50±0,50 ns	7,07±0,31 ns	7,90±1,82 ns

Ns- Não significativo pela Análise de Variância.

Desdobrando a amostra de OE dentro de cada nível de concentração para o isolado bacteriano 03, observou-se pela ANOVA, que não houve diferença significativa entre as amostra de OE para as concentrações 0; 62,5 e 125 ml.L⁻¹. As concentrações 250, 500 e 1000 ml.L⁻¹ apresentaram diferença significativa para as diferentes amostras de OEs (Tabela 12).

Tabela 12- Dados encontrados na Análise de Variância no desdobramento do tipo de óleo dentro de cada nível de concentração para o isolado bacteriano 02, a um nível de 5% de significância.

ANOVA	Tipo de OE: Concentração ml.L ⁻¹					
	0	62,5	125	250	500	1000
GL	13	13	13	13	13	13
F	0,0021	0,0119	0,2654	1,8769	13,1011	22,3115

<i>p</i> -valor	1	1	0,9953	0,0359	0	0
-----------------	---	---	--------	--------	---	---

Analisando as médias de diâmetro nas diferentes amostras de OE para a concentração de 250 ml.L⁻¹ pelo teste de Scott-Knot, pode-se observar que os OEs C, D, E, F e G, obtiveram as maiores médias e não diferenciaram entre si. Os outros OEs não apresentaram diferença significativa, sendo que os OEs A, I e J, apresentaram as menores médias (6,1 mm, 6,06 mm e 6 mm respectivamente).

Observando as comparações na concentração de 500 ml.L⁻¹, o OE F foi o único que se diferenciou de todos os outros, apresentando a maior média de inibição do isolado bacteriano (14,3 mm). Os OEs D, E e G não se diferenciaram entre si estatisticamente, apresentando grandes médias de inibição do isolado bacteriano quando comparado aos outros (9,2 mm, 8,53 mm e 7,8 mm). Por sua vez, os outros OEs (A, B, C, H, I, J, K, L, M e N) apresentaram as menores médias e também não apresentaram diferenças estatísticas.

Na concentração 1000 ml.L⁻¹, o teste de Scott-Knot revelou que a maior média de inibição do isolado bacteriano 03 foi apresentada pelo OE F (17,06 mm) que diferenciou dos demais. O teste mostrou que não houve diferença significativa entre os OEs D, E e M e esses possuíram uma média elevada (11,53 mm, 11,33 mm e 10,66 mm respectivamente), quando comparados aos demais OEs. Os OEs C, G e H não diferenciaram entre si e possuíram médias maiores do que os OEs A, B, I, J, K, L e N, que também não diferenciam entre si e possuíram as menores médias observadas para essa concentração no isolado bacteriano 03.

3.4 Antibióticos x Extratos botânicos

Observou-se que os três antibióticos testados possuem ação antimicrobiana, pois foram capazes de inibir o crescimento dos três isolados bacterianos. Na Tabela 13, pode-se verificar que houve diferença na inibição de crescimento entre os extratos vegetais e os antibióticos (I01- GL = 16, F = 6,2666, $p < 0,01$; I02= $\chi^2 = 41,339$, GL = 16, $p < 0,01$; I03= GL = 16, F = 24,715, $P < 0,01$).

Tabela 13- Diâmetro (média±desvio padrão) dos isolados 1, 2 e 3 submetidos a concentração de 1000 ml.L⁻¹ de extratos vegetais de 14 clones e espécie de *Eucalyptus* spp. e as concentrações de três antibióticos: Norfloxacin (10 mgc.ml⁻¹), Sulfazotrim (25 mgc.ml⁻¹) e Netilmicina (30 mgc.ml⁻¹)

Tratamento	Diâmetro (cm)							
	Isolado 1 ¹			Isolado 2 ²		Isolado 3 ¹		
	média	Dunnnett	Tukey	média	Dunn	média	Dunnnett	Tukey
A	8,63±1,58	b	C	8,73±1,88	b	6,73±0,87	b	D
B	7,67±0,29	b	C	6,63±0,71	b	7,63±0,32	b	D
C	7,3±0,26	b	C	6,67±0,76	b	9,13±1,03	b	D
D	9,93±1,94	b	BC	10,1±3,44	b	11,53±1,53	b	CD
E	12,9±0,95	b	ABC	7±0,89	b	11,33±3,41	b	CD
F	12,33±2,37	b	ABC	13,7±1,18	b	17,07±2,45	B	BC

G	9,47±2,22	b	BC	33,8±37,43	a	10,13±3,69	B	D
H	7,87±0,42	b	C	9,67±0,29	b	9,43±3,16	B	D
I	7,67±0,58	b	C	10,17±0,85	b	6,67±0,58	B	D
J	6,63±0,32	b	C	8,2±1,59	b	8,1±0,26	B	D
K	6,17±0,12	b	C	8,1±2,19	b	7,67±0,99	B	D
L	7,83±1,04	b	C	6,7±0,52	b	7,47±0,5	B	D
M	7,67±0,58	b	C	10±3,32	b	10,67±2,47	B	D
N	10,23±2,15	b	CBC	21,33±1,53	a	7,9±1,82	B	D
Sulfazotrim	14,6±7,69	a	ABC	26,7±0,82	a	22,23±3,47	A	AB
Norfloxacin	17,73±5,59	a	AB	22,6±4,5	a	23,87±1,77	A	A
Netilmicina*	20,47±4,4	a	A	23,77±3,49	a	23,57±1,45	A	A

i: Clone que foi atacado por insetos; E: *Eucalyptus*; *: Tratamento controle

1- Teste de comparações múltiplas de Dunnett e Tukey a 5% de significância; 2 Comparações múltiplas de Dunn a 5% de significância, análises realizadas comparando o controle com os demais tratamentos.

A) letras iguais minúsculas na coluna não diferem estatisticamente comparado ao controle pelo teste Dunnett, a 5% de significância. B) letras semelhantes maiúsculas na coluna não diferente pelo teste Tukey a 5% de significância.

O teste de Dunnett demonstrou que todos os antibióticos foram semelhantes entre si, já os extratos botânicos apresentaram diferença significativa para os antibióticos testados nos isolados 01 e 03. O poder inibitório dos extratos botânicos dos tratamentos G e N foi semelhante ao dos três antibióticos avaliados para o isolado 02.

Para o isolado 01, o teste de Tukey demonstrou que, além dos antibióticos, apenas os tratamentos E e F não se diferenciaram estatisticamente do tratamento controle (Netilmicina). Todos os tratamentos apresentaram médias semelhantes ao tratamento Sulfazotrim à 5% de significância. Os OEs D, E, F e N apresentaram resultados semelhantes ao antibiótico Norfloxacin.

Quando avaliado o poder inibitório dos tratamentos em relação aos antibióticos no isolado 03, foi possível observar que existe diferença significativa entre os extratos botânicos e o tratamento controle (Netilmicina) e o Norfloxacin. O tratamento F não apresentou diferença significativa para o antibiótico Sulfazotrim.

4 DISCUSSÃO

A regressão para todas as amostras de OE consideradas estatisticamente significativas demonstrou um comportamento único. Verificou-se que o crescimento do isolado bacteriano foi inversamente proporcional à concentração dos OEs.

Os resultados encontrados corroboram com estudos anteriores que comprovaram a eficácia do OE de diferentes espécies de eucalipto na inibição do crescimento para diversas bactérias (KNEZEVIC et al., 2016; LU et al., 2016; ALDOGHAIM et al., 2018; MEKONNEN et al., 2016).

As concentrações 0; 62,5; e 125 ml.L⁻¹ não apresentaram diferenças significativas para nenhum dos isolados, o que demonstra que o OE de eucalipto em pequenas quantidades não é eficaz para a inibição do crescimento desses isolados no modelo experimental utilizado.

A concentração de 1000 ml.L⁻¹ apresentou diferença significativa em todos os isolados estudados, além de apresentar as maiores médias. Desse modo, os genótipos que possuem ação inibitória contra esses isolados apresentaram melhores resultados quando o OE foi utilizado na forma pura (1000 ml.L⁻¹).

Constatou-se que, em todas as concentrações, o OE F testado contra os três isolados bacterianos estudados foi o que inibiu mais o crescimento do isolado bacteriano (obteve as maiores médias de diâmetro de inibição). Os OEs E e D também apresentaram resultados bastante eficientes na inibição dos isolados 01 e 03. Esses OE possuem os monoterpenos 1,8-cineol, α -pineno e acetato de α -terpinil como seus compostos majoritários.

Os compostos 1,8-cineol e α -pineno também são os compostos majoritários dos OEs C e G. Enquanto o OE C apresentou significância apenas na concentração de 250 ml.L⁻¹ do isolado 03, o OE G apresentou diferença significativa para os três isolados.

Identificou-se, em estudos prévios, que as amostras de OE que possuíam entre os seus componentes principais os monoterpenos 1,8-cineol, α -pineno e acetato de α -terpinil, apresentaram atividade bactericida (KNEZEVIC et al., 2016; ALDOGHAIM et al., 2018; JORDAN et al., 2018a; GHASEMI et al., 2020; ESSIEN et al., 2015; ALMEIDA-PEREIRA et al., 2018; SAAD et al., 2017).

Tadtong et al. (2016) constataram que as amostras de OE com maior quantidade de 1,8-cineol e α -pineno reduziram o crescimento de todas as bactérias patogênicas de seres humanos por eles testados. Os autores também concluíram que esses compostos são antimicrobianos ativos.

Cabe destacar que o OE G também possui o composto trans-pinocarveol entre seus compostos principais. Esse monoterpene foi notificado por Almeida-Pereira et al. (2018) como um dos compostos majoritários de OE com comprovada ação bactericida.

O OE C, além do 1,8-cineol e α -pineno, possui entre seus compostos principais o monoterpene γ -terpineno. Por sua vez, os OEs M e N apresentam os compostos γ -terpineno, *p*-cimeno e α -felandreno como majoritários em suas amostras.

O OE M apresentou diferença significativa para o isolado bacteriano 03. Já o OE N se mostrou significativo para os isolados bacterianos 01 e 02. Contudo, em ambos os casos, o resultado foi significativo apenas com a concentração de 1000 ml.L⁻¹.

Esses resultados ratificam os encontrados por outros autores que comprovaram a eficácia de OE contra diferentes bactérias. Os monoterpenos γ -terpineno, *p*-cimeno e α -felandreno foram encontrados entre os constituintes principais dos OEs desses estudos (ESSIEN et al., 2015; CHI et al., 2019; DIMOV et al., 2017; JORDAN et al., 2018b; JORDAN et al., 2013; ALDOGHAIM et al., 2018; KNEZEVIC et al., 2016).

Miladi et al. (2017) constatou que, além de ter comprovada ação antimicrobiana em bactérias, a combinação dos monoterpenos *p*-cymeno e γ -terpineno aumentou de duas a quatro vezes a sua atividade de inibição.

Os resultados encontrados no estudo para o antibiótico Netilmicina diferem do encontrado por Carneiro e Júnior (2006), onde o antibiótico não mostrou eficiência antimicrobiana. Entretanto, em outro estudo, o Netilmicina teve a sua eficácia comprovada em diversas bactérias gram negativas (ÂNGULO; GONZÁLEZ; ESCORZA, 2008).

O antibiótico Norflaxacin, possui eficácia comprovada na literatura para diferentes bactérias gram negativas, o que reafirma os resultados encontrados nesse estudo (VIEIRA, 2020).

Estudos citam que bactérias gram negativas possuem grande resistência ao antibiótico Sulfazotrim, o que difere dos resultados encontrados nesse estudo (VIEIRA, 2020; SOUZA, 2019).

A diferença dos resultados encontrados nesse estudo com os de outros autores, para os antibióticos conhecidos, pode ter ocorrido por se tratar de microrganismos endossimbiontes, que provavelmente não tiveram contato anterior com antibióticos e, dessa forma, foram impossibilitados de criar alguma resistência.

As bactérias gram-negativas possuem uma parede celular que funciona como uma barreira lipídica que impede a entrada de antibióticos. Essa barreira é composta principalmente por porinas (proteínas), fosfolípidos e lipopolissacarídeos, também

conhecidos por endotoxina (MARTINKO; MADIGAN; DUNLAP, 2010). Assim, a parede celular forma uma barreira em direção às macromoléculas e aos compostos hidrofóbicos, permitindo que este grupo de bactérias tenha maior tolerância a estes compostos, tais como os encontrados nos óleos essenciais (NIKAIDO, 2003).

Segundo KOYAMA et al, 1997, muitos componentes dos óleos essenciais, os quais são diferentes em cada óleo essencial, tem a habilidade para romper ou penetrar na estrutura lipídica presente em bactérias Gram-negativas.

Vale lembrar que as principais doenças florestais como a mancha foliar e a murcha vascular tem como agentes causadores bactérias Gram negativas (SILVA, 2019). Dessa forma, OE essencial de eucalipto pode ser uma alternativa viável também para o controle de doenças, sendo um produto de usos múltiplos.

5 CONCLUSÃO

Os isolados bacterianos extraídos do interior do percevejo bronzeado se mostraram sensíveis aos OEs de eucalipto testados nesse estudo. As amostras de OE testadas apresentaram eficiência na inibição dos isolados bacterianos do interior do percevejo bronzeado nas concentrações avaliadas e com a metodologia utilizada.

Os monoterpenos 1,8-cineol, γ -terpineno, α -pineno, acetato de α -terpinil, *p*-cimeno, α -felandreno e trans-pinocarveol constituíram os componentes majoritários das amostras que se mostraram mais efetivas contra os isolados bacterianos estudados.

Os OEs de algumas espécies de eucalipto podem ser promissores agentes antimicrobianos ao serem empregados no controle do percevejo bronzeado por evidenciar que interferem em sua flora natural do sistema digestivo, o que pode ser danoso ao inseto. Essa é uma hipótese que deverá ser avaliada em estudo posterior.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHO, K. **asbio: A Collection of Statistical Tools for Biologists**. R package version 1.6-5. 2020.
- ALDOGHAIM, F. S.; FLEMATTI, G. R.; HAMMER, K. Antimicrobial activity of several cineole-rich Western Australian *Eucalyptus* essential oils. **Microorganisms**, v. 6, n. 4, p. 122, 2018.
- ALMEIDA-PEREIRA, C. S. *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of a *Croton tetradenius* Baill. germplasm. **Journal of Essential Oil Research**, v.31, n.5, p.379-389. 2019.
- ANGULO, G. B.; GONZÁLEZ, N. F. M.; ESCORZA, C. A. Susceptibilidad antimicrobiana in vitro de 1200 microorganismos Gram negativos causales de infecciones de vías urinarias. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología**, v. 28, n. 3, p. 90-98, 2008.
- ATANASOVA, D.; LEATHER, S. R. Plant essential oils: the way forward for aphid control? **Annals of Applied Biology**. V. 1 (2018), p. 10-16. 2018.
- AVILA, R. C. **Resistência clonal à *Thaumastocoris peregrinus* e caracterização química por CG/EM de óleo essencial de eucalipto**. Dissertação de Mestrado em Ciência Florestal na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. 112 p. 2016.
- BARBOSA, L. R.; BELINOVSKI, C.; MACHADO, B. O.; FRANCISCON, L.; SOLIMAN, E. P.; Wilcken, C. F. **Efeito de *Eucalyptus* spp. e da superfície foliar na excreção de honeydew e sobrevivência de adultos do percevejo bronzeado**. Embrapa - Comunicado Técnico. 3 p. 2012.
- BARBOSA, L. R. *et al.* **Criação massal do percevejo bronzeado, *Thaumastocoris peregrinus* : Carpinteiro & Dellapé, 2006 (Hemiptera, Thaumastocoridae)**. Embrapa Florestas-Fôlder/Folheto/Cartilha (INFOTECA-E), 2016.
- BARBOSA, L. R. *et al.* Biological parameters, life table and thermal requirements of *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae) at different temperatures. **Scientific Reports**, v.9, n.1, p.1-8, 2019.
- BATISH, D. R. *et al.* Phytotoxicity of lemon-scented eucalypt oil and its potential use as a bioherbicide. **Crop Protection**, v.23, n.12, p.1209-1214, 2004.
- BAUER, A.W. *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, p.493-496, 1966.
- CARNEIRO, M. S.; JUNIOR, O .D. Bactérias do gênero *Aeromonas* no fluxograma de beneficiamento do leite tipo A e seu comportamento frente à ação de antimicrobianos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 3, p. 271-276, 2006.
- CARPINTERO, D. L.; DELLAPÉ, P.M. A new species of *Thaumastocoris* Kirkaldy from Argentina (Heteroptera: Thaumastocoridae: Thaumastocorinae). **Zootaxa**, v. 1228, p. 61 - 68, 2006.

CAZEMIER, A. E. *et al.* *Promicromonospora pachnodae* sp. nov., a member of the (hemi) cellulolytic hindgut flora of larvae of the scarab beetle *Pachnoda marginata*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.83, n.2, p.135-148, 2003.

CHI, P. T. L. *et al.* Valorization of Citrus Leaves: Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities of Essential Oils. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, p. 1-9, 2019.

DIMOV, M. *et al.* Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of dill essential oils (*Anethum graveolens* L.). **Annual Assen Zlatarov University**, v. 16. 37-42, 2017.

ESSIEN, E. E. *et al.* Essential oil constituents, anticancer and antimicrobial activity of *Ficus mucoso* and *Casuarina equisetifolia* leaves. **American Journal Essential Oils and Natural Products**, v.4, p.1-6, 2016.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. **ExpDes.pt: Pacote Experimental Designs (Portuguese)**. R package version 1.2.0. .2018.

GHASEMI, E. *et al.* Variation in Essential Oil Constituents and Antimicrobial Activity of the Flowering Aerial Parts of *Salvia mirzayanii* Rech. & Esfand. Ecotypes as a Folkloric Herbal Remedy in Southwestern Iran. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v.23, n.1, p.51-64, 2020.

GIRAUDOUX, P. *et al.* **Pgirmess: Spatial Analysis and Data Mining for Field Ecologists**. R package version 1.6.9. 2018.

HIROSE, E.; PANIZZI, A. R. **Os simbiontes e a nutrição dos insetos**. In: PANIZZI, A.R.; PARRA, J.R.P. (Eds.). *Bioecologia e nutrição de insetos: base para o manejo integrado de pragas*. Brasília: Embrapa, p.251-276. 2009.

HOOGAR, R.; MALAKANNAVAR, S.; SUJATHA, H. T. Impact of *Eucalyptus* plantations on ground water and soil ecosystem in dry regions. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v.8, n.4, p.2929-2933, 2019.

IBÁ - Instituto Brasileiro de Árvores. **Relatório 2020**. São Paulo: IBÁ. 2020.

JORDÁN, M. J. *et al.* Effect of the phenological stage on the chemical composition, and antimicrobial and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L essential oil and its polyphenolic extract. **Industrial Crops and Products**, v.48, p.144-152, 2013.

JORDÁN, M. J. *et al.* The composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Salvia officinalis* subsp. oxyodon (Webb & Heldr.) Reales, D. Rivera & Obón cultivated in the region of Murcia (Spain). **Facta Universitatis, Series Physics, Chemistry and Technology**, v.16, n.1, p.108. 2018a.

JORDÁN, M. J. *et al.* Antimicrobial activity and chemical variability of the essential oil of *Thymus hyemalis* Lange cultivated in the region of Murcia (Spain). **Facta Universitatis, Series Physics, Chemistry and Technology**, v.16, n.1, p.109. 2018b.

- KNEZEVIC, P. *et al.* Antimicrobial activity of *Eucalyptus camaldulensis* essential oils and their interactions with conventional antimicrobial agents against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. **Journal of ethnopharmacology**, v.178, p.125-136, 2016.
- KOYAMA, SHOZO *et al.* A new substance (Yoshixol) with an interesting antibiotic mechanism from wood oil of Japanese traditional tree (Kiso-Hinoki), *Chamaecyparis obtusa*. **General pharmacology**, v. 28, n. 5, p. 797-804, 1997.
- LEMES, P. G. *et al.* Forest Stewardship Council (FSC) pesticide policy and integrated pest management in certified tropical plantations. **Environmental Science and Pollution Research**, v.24, n.2, p.1283-1295, 2017.
- LU, H. *et al.* Antimicrobial activity of *Eucalyptus* essential oil against *Pseudomonas* in vitro and potential application in refrigerated storage of pork meat. **International Journal of Food Science & Technology**, v.51, n.4, p.994-1001, 2016.
- MACHADO, D. D. N. *et al.* Avaliação de inseticidas no controle de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) percevejo-bronzeado em condições de laboratório. **Floresta e Ambiente**, v.23, n.2, p.245-250, 2016.
- MARTINKO, J.M.; MADIGAN, M.T.; DUNLAP, P.V. **Microbiologia de Brock**. Artmed, 12 ed., 2010.
- MEKONNEN, A. *et al.* In vitro antimicrobial activity of essential oil of *Thymus schimperi*, *Matricaria chamomilla*, *Eucalyptus globulus*, and *Rosmarinus officinalis*. **International Journal of Microbiology**, v. 2016, 2016.
- MILADI, H. *et al.* Synergistic effect of eugenol, carvacrol, thymol, *p*-cymene and γ -terpinene on inhibition of drug resistance and biofilm formation of oral bacteria. **Microbial pathogenesis**, v.112, p.156-163, 2017.
- NADEL, R. L.; NOACK, A. E. Current understanding of the biology of *Thaumastocoris peregrinus* in the quest for a management strategy. **International Journal of Pest Management**, v.58, n.3, p.257-266, 2012.
- NIKAIDO, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 593-656, 2003.
- PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R.P. **Bioecologia e nutrição de insetos: Base para o manejo integrado de pragas**. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica. 1164 p. (2009)
- SAAD, A. M. *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of the leaves of *Cupressus macrocarpa* Hartweg. Ex Gordon. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.7, n.9, p.207-212, 2017.
- SAAVEDRA, M. C. *et al.* The potential global distribution of the Bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero and Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae). **Agricultural and Forest Entomology**, v.17, n.4, p.375-388, 2015.
- Soliman, E. P. *et al.* Susceptibility of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae), a *Eucalyptus* pest, to entomopathogenic fungi. **Scientia Agricola**, v.76, n.3, p.255-260, 2019.

SILVA, D. F. S. H. S. **Caracterização das doenças causadas por bactérias em viveiros e plantios florestais de *Eucalyptus* spp.** Dissertação (Mestrado) em Ciência Florestal na Universidade Estadual de São Paulo. 154 p. 2019.

SOUSA, T. T. C. D. **Detecção de endobactéria e morfologia do sistema digestório de *Thaumastocoris peregrinus*** . Dissertação (Mestrado) em Ciência Florestal na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. 54 p. 2016.

SOUZA, S. G. P. **BACTÉRIAS COM POTENCIAL DE MULTIRRESISTÊNCIA EM MATERIAL HOSPITALAR.** Dissertação (Mestrado) em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos na Universidade Paraense. 2019.

STEVENS, L.; GIORDANO, R.; FIALHO, R. F. Male-killing, nematode infections, bacteriophage infection, and virulence of cytoplasmic bacteria in the genus *Wolbachia*. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.32, n.1, p.519-545, 2001.

TADTONG, S. *et al.* Antimicrobial constituents and effects of blended *Eucalyptus*, rosemary, patchouli, pine, and cajuput essential oils. **Natural product communications**, v.11, n.2, 1934578X1601100234, 2016.

TEAM, R. Core. R: **A Language and Environment for Statistical Computing.** Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. 2013.

VIEIRA, S. E. Identificação e perfil de sensibilidade antimicrobiana de bactérias causadoras de cistite em cães atendidos no Hospital Veterinário Roque Quagliato. **Almanaque de Ciências Agrárias-ACA**, v. 2, n. 1, p. 22-28, 2020.

WERNEGREN, J. J. Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. **Nature Reviews Genetics**, v.3, n.11, p.850-861, 2002.

WILCKEN, C. F. **Percevejo bronzeado do eucalipto (*Thaumastocoris peregrinus*) (Hemiptera: Thaumastocoridae): ameaça às florestas de eucalipto brasileiras.** ALERTA PROTEF. Piracicaba-SP. 2008.

WILCKEN, C. F. *et al.* Chemical vs entomopathogenic control of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) via aerial application in *Eucalyptus* plantations. **Scientific Reports**, v.9, n.1, p.1-7, 2019.

Cap. III- Atividade antimicrobiana de óleo essencial de eucalipto em bactérias patogênicas de eucalipto

RESUMO

A eucaliptocultura sofre, desde à fase de viveiro até a fase adulta, com o ataque de microrganismos fitopatógenos que causam diversos danos aos produtores da cultura. Atualmente, uma das doenças mais importantes que afeta os plantios é a mancha foliar do eucalipto. O gênero *Xanthomonas* possui maior ocorrência para esta doença do eucalipto no país. Seu controle apresenta um alto grau de dificuldade após se instalar na área devido a rápida disseminação do patógeno. O presente estudo objetivou a análise da atividade antimicrobiana do óleo essencial (OE) de diferentes genótipos de eucalipto em três isolados de *Xanthomonas* cuja patogenicidade foi confirmada em clones de eucalipto. Foi avaliada a atividade bactericida dos diferentes genótipos de eucalipto nas concentrações 1000 ml.L⁻¹; 500 ml.L⁻¹; 250 ml.L⁻¹ e 0 ml.L⁻¹. As amostras de OE testadas possuem ação antimicrobiana, pois foram capazes de inibir o crescimento dos três isolados bacterianos. Os monoterpenos 1,8-cineol, γ -terpineno, α -pineno, acetato de α -terpinil, *p*-cimeno, α -felandreno e trans-pinocarveol constituíam os compostos principais das amostras de OE que se mostraram mais eficazes. Dessa forma, o OE de eucalipto pode auxiliar no manejo dessa praga.

Palavras chave: *Xanthomonas*; *Eucalyptus*; Terpenos.

ABSTRACT

Eucalyptus culture suffers, from nursery to adulthood, with attack of phytopathogenic microorganisms that cause several damages to culture producers. Currently, one of most important diseases affecting plantations is the eucalyptus leaf spot. Genus *Xanthomonas* has a higher occurrence for this eucalyptus disease in country. Control of this disease presents a high degree of difficulty after settling in the area due to the rapid spread in the pathogen. The present study aimed to analyze the antimicrobial activity of essential oil from different eucalyptus genotypes in three *Xanthomonas* isolates whose pathogenicity was confirmed in eucalyptus clones. The bactericidal activity of different eucalyptus genotypes at concentrations of 1000 ml.L⁻¹ was evaluated; 500 ml.L⁻¹; 250 ml.L⁻¹ and 0 ml.L⁻¹. Tested OE samples have antimicrobial action, as they were able to inhibit the growth of three bacterial isolates. Monoterpenes 1,8-cineol, γ -terpinene, α -pinene, α -terpinyl acetate, *p*-cymene, α -felandrene and trans-pinocarveol constituted main compounds of OE samples that were shown to be most effective. Thus, eucalyptus essential oil can assist in the management of this pest.

Keywords: *Xanthomonas*; essential oil; Eucalyptus; Terpenes.

1 INTRODUÇÃO

O eucalipto, como é popularmente conhecido, é composto por espécies majoritariamente de porte arbóreo que pertencem aos gêneros *Eucalyptus*, *Corymbia* e *Angophora*. Originário da Austrália, Indonésia e outras Ilhas da Oceania possui cerca de 700 espécies catalogadas, dos quais aproximadamente 20 são de relevante interesse comercial de usos múltiplos (HOOGAR et al., 2019; PIERI et al., 2017). As espécies desse gênero possuem ampla plasticidade e sua dispersão se dá em escala mundial. Por apresentar diversas vantagens em relação aos demais cultivos, como rápido crescimento, rusticidade, facilidade de manejo e de propagação vegetativa o eucalipto constitui várias espécies que produzem produtos madeireiros e não madeireiros com destaque cada vez maior em programas de reflorestamento (SIVIERO et al., 2019; PIERI et al., 2017).

Não obstante a sua importância, a eucaliptocultura sofre, desde à fase de viveiro até a fase adulta, com o ataque de microrganismos fitopatógenos que causam diversos danos à cultura (PIERI et al., 2017). Atualmente, uma das doenças mais importantes que afetam os plantios é a mancha foliar do eucalipto (FERRAZ et al., 2018). A doença está amplamente distribuída no Brasil e tem causado expressivas perdas em viveiros, especialmente em regiões e épocas do ano mais quentes, especialmente quando relacionada com maior intensidade e frequência de chuvas (MAFIA et al., 2017). Essa doença ocorre principalmente em viveiros, contudo, também é comumente encontrada no campo. No Brasil, existem diversos agentes etiológicos associados à mancha foliar do eucalipto, entre espécies de fungos e bactérias. Todavia, o gênero *Xanthomonas* possui maior ocorrência para esta doença do eucalipto no país (FERRAZ et al., 2018).

Os principais sintomas da mancha foliar bacteriana do eucalipto podem variar devido à idade da planta, do estado de desenvolvimento da lesão e da espécie do eucalipto (GONÇALVES et al., 2008). É uma doença foliar e inicialmente se configura por lesões em que os tecidos apresentam aspecto de encharcamento que ficam translúcidos ao serem postos contra a luz. As lesões se concentram por toda a extensão da nervura e nas margens da folha causando redução da área fotossintética, desfolha, redução de crescimento das plantas no campo e até a morte de plantas jovens (SIVIERO et al 2019; FAVAN, 2020; FERRAZ et al., 2018; MAFIA et al., 2017; REZENDE et al., 2019).

A desfolha ocasionada pela mancha foliar ocorre em função do aumento no número e no tamanho das lesões nas folhas, gerando perda de sustentação das folhas (REZENDE et al 2019).

O controle dessa doença apresenta um alto grau de dificuldade após se instalar na área devido a rápida disseminação no patógeno. As práticas mais recomendadas para o controle compreendem em utilizar mudas sadias, fazer rotação de cultura com espécies não hospedeiras, evitar ferimentos durante os tratos culturais, escolher áreas com boa drenagem e controlar os insetos causadores de lesões foliares (SIVIERO et al., 2019). Não obstante, todas essas técnicas possuem elevado custo ao produtor; sendo necessárias medidas alternativas para manter a lucratividade e consequente viabilidade do plantio (SILVA et al., 2018).

Segundo Batish et al. (2008), as folhas de diversas espécies de eucalipto possuem óleos essenciais (OEs) em abundância com ampla atividade biológica como fungicida, inseticida, herbicida e acaricida. Por conseguinte, os OEs têm ganhado destaque no controle de bactérias, pois se aplicados em dosagens apropriadas, apresentam efeitos inibitórios satisfatórios nesses microrganismos (ALMEIDA-PEREIRA et al., 2018; SAAD et al., 2017).

Os terpenos como o 1,8-cineol, α -pineno, γ -terpineno, p -cimeno, α -felandreno e acetato de α -terpinil, foram descritos previamente como os componentes principais de amostras de OE que apresentaram atividade antimicrobiana para diferentes bactérias (GHASEMI et al., 2020; CHI et al., 2019). A partir da produção de diversos metabólitos secundários pelas plantas com atividade bactericida, pode-se esperar que o uso desses metabólitos pode ser de grande utilidade como alternativa de controle de doenças que possuem microrganismos como agentes etiológicos.

Em um estudo prévio, Anjos (2016) analisou a patogenicidade de isolados bacterianos retirados de folhas de eucalipto com sintomas da mancha foliar do eucalipto. A patogenicidade das cepas a partir da inoculação em plantas saudáveis foi confirmada uma vez que os sintomas desenvolvidos nas plantas inoculadas foram semelhantes aos observados em condições de campo e viveiro e aos descritos em estudos anteriores. A partir de uma análise genético-molecular, a autora encontrou uma grande quantidade de goma xantana, produzido por espécies *Xanthomonas*, permitindo inferir que os isolados pertencem à essa espécie.

O presente estudo objetivou a análise da atividade antimicrobiana do OE de diferentes genótipos de eucalipto em três isolados bacterianos cuja patogenicidade foi confirmada em clones de eucalipto, a fim de propor uma alternativa para o controle da mancha bacteriana em viveiros e em plantios de eucalipto.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Genética e Biotecnologia Florestal (LGBF), localizado no Departamento de Engenharia Florestal, na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Campus de Diamantina.

2.1 Óleo Essencial (OE)

Para o presente estudo, foram utilizadas sete amostras de OE extraídas de folhas de clones comerciais provenientes da empresa Gerdau S/A e de plantas de *Eucalyptus camaldulensis* localizadas Centro Integrado de Propagação de Espécies Florestais (CIPEF).

As metodologias de extração e caracterização química das amostras do OE utilizadas para esse experimento foram descritas em Avila (2016). Na Tabela 14 pode-se observar os principais compostos em cada amostra de OE com as suas respectivas proporções médias (%).

Tabela 14- Principais compostos em cada amostra de OE com suas respectivas proporções médias (%).

OE	1,8-cineol	γ -terpineno	α -pineno	acetato de α -terpinil	<i>p</i> -cimeno	α -felandreno
C13	49,21	17,02		9,26		
C8	50,39	15,56	27,99			
C1	49,21		32,41	6,52		
C17	56,20		18,81			
C11	57,4		24,45	5,97		
C25	52,49		28,80	5,19		
E. cam.		43,86			12,61	51,08

E. cam.= *Eucalyptus camaldulensis*.

2.2 Teste de sensibilidade antimicrobiano (antibiograma)

Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados em três isolados bacterianos (A15, A22 e U01) retirados de folhas de eucalipto com sintomas da mancha foliar cuja metodologia de isolamento foi descrita por Anjos (2016). Segundo a autora, os isolados tiveram sua patogenicidade confirmada uma vez que os sintomas desenvolvidos nas plantas inoculadas foram semelhantes aos observados em condições de campo e viveiro, bem como aos descritos em estudos anteriores. A partir de uma análise genético-molecular, a autora encontrou uma grande quantidade de goma xantana, produzido por espécies *Xanthomonas*, permitindo inferir que os isolados pertencem a indivíduos dessa espécie.

Para o teste de sensibilidade antimicrobiana, utilizou-se a técnica de difusão de disco em meio sólido (disco difuso). Os ensaios foram realizados utilizando os métodos modificados de Kirby e Bauer, descrita por Mekonnen et al. (2016). Com a finalidade de aumentar a solubilidade, diminuir a volatilização e evitar perdas as amostras de OE, foram diluídas em Dimetilsulfóxido (DMSO). Para cada amostra de OE foram preparadas quatro concentrações (1000 ml.L⁻¹; 500 ml.L⁻¹; 250 ml.L⁻¹ e 0 ml.L⁻¹).

Discos de papel filtro de 6 mm de diâmetro foram acondicionados em placas de petri autoclavadas e posteriormente foram embebidos com 5 µl de cada concentração. Com vistas a evitar que o OE evapore, cada placa foi vedada com papel filme e coberta com papel alumínio, sendo armazenada em câmara de fluxo à temperatura ambiente por 24 horas para posterior ensaio.

Findo esse prazo, os isolados bacterianos foram inoculados em placas de Petri contendo 20 ml de meio Agar Mueller Hinton e os discos com as concentrações foram arranjados nas placas. Após montagem, as placas foram lacradas com papel filme e acondicionadas em BOD à 28 °C e fotoperíodo de 12 horas e mantidas por 24 horas.

Os testes foram realizados em triplicatas e os resultados expressos pela média aritmética do diâmetro (mm) dos halos de inibição formado ao redor dos discos. Os halos de inibição foram medidos com auxílio de um paquímetro.

2.3 Análise Estatística

Os Clones 17 e 25 do isolado U01 não foram analisados pelo procedimento de curva dose resposta, pois apresentaram diâmetro igual em todas as medições, logo não geraram curva adequada.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) com três isolados, sete extratos vegetais, quatro concentrações e três repetições. Os dados foram analisados pelos testes de Shapiro Wilk e Levene para verificar a normalidade dos dados e homogeneidade das variâncias, respectivamente. Em seguida, submetidos a Análise de Variância. Os diferentes isolados das bactérias foram testados separadamente para determinação da curva dose-resposta obtida pelo modelo matemático log-logístico.

A representação do modelo de cinco parâmetros, utilizado para confecção da curva dose resposta, é representado pela equação:

$$f(x) = c + \frac{d - c}{(1 + \exp(b(\log x) - (\log e))))^f}$$

A fim de comparar a eficácia dos produtos biológicos, foi realizada uma análise das amostras puras (1000 ml.L^{-1}) com antibióticos conhecidos. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) com três isolados, sete concentrações de extratos vegetais e três de antibióticos, com três repetições cada. Os dados foram analisados pelos testes de Shapiro Wilk e Levene para verificar a normalidade dos dados e homogeneidade das variâncias, respectivamente. Em seguida, submetidos a Análise de Variância (Teste F ou Kruskal-Wallis). Quando significativas, as diferenças entre os tratamentos foram verificadas pelos procedimentos de Dunnett e Tukey, tendo o antibiótico Netilmicina como controle, ou método de Dunn, quando não atendia os pressupostos dos testes paramétricos.

Todos os testes foram conduzidos a 5% de significância com auxílio do software R versão 4.0.1 (TEAM R CORE, 2013), pacote ExpDes.pt (FERREIRA et al., 2018), pacote pgirmess (GIRAUDOUX et al., 2018), pacote asbio (AHO, K., 2014) e pacote dcr (RITZ et al., 2015).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que algumas das amostras de OE testadas possuem ação antimicrobiana, pois foram capazes de inibir o crescimento dos três isolados bacterianos (Figura 11).

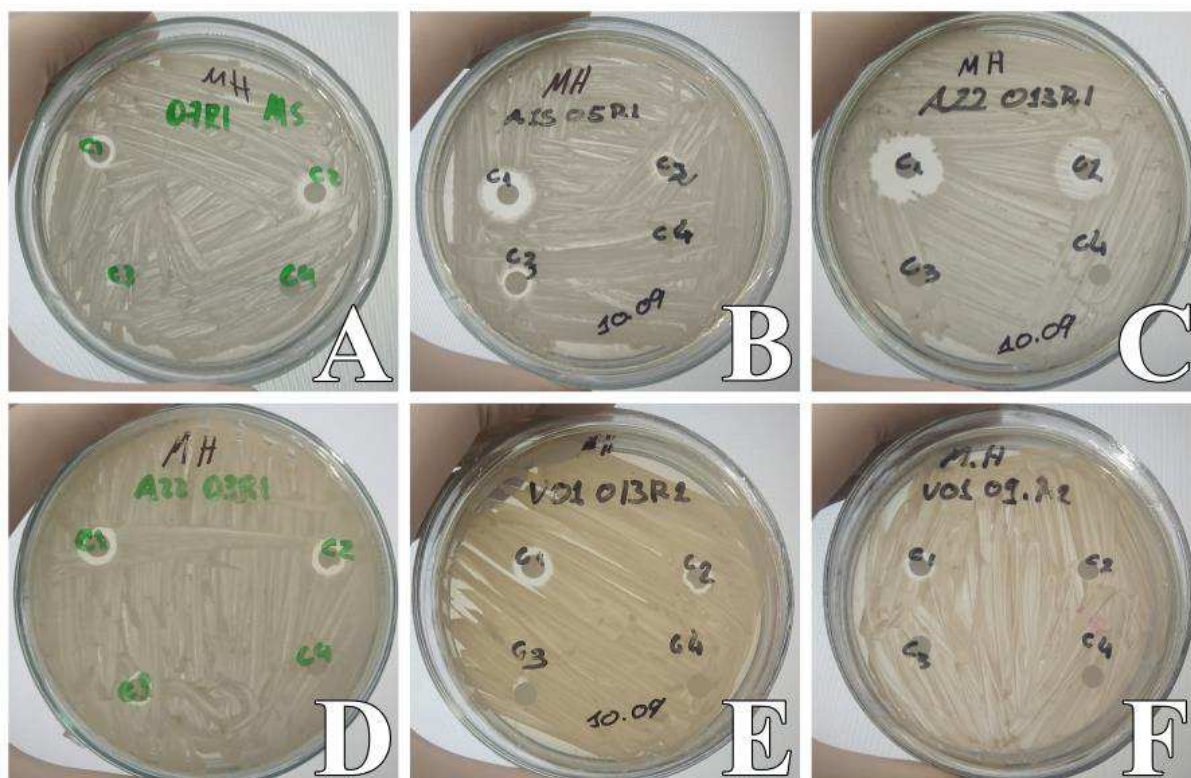


Figura 11- A- Efeito do OE do C17 no isolado bacteriano A15 sob as concentrações 1000, 500, 250 e 0 mL.L⁻¹; B- Efeito do OE do C1 no isolado bacteriano A15 sob as concentrações 1000, 500, 250 e 0 mL.L⁻¹; C- Efeito do OE de *E. camaldulensis* no isolado bacteriano A22 sob as concentrações 1000, 500, 250 e 0 mL.L⁻¹; D- Efeito do OE do C8 no isolado bacteriano A22 sob as concentrações 1000, 500, 250 e 0 mL.L⁻¹; E- Efeito do OE de *E. camaldulensis* no isolado bacteriano U01 sob as concentrações 1000, 500, 250 e 0 mL.L⁻¹; VI- Efeito do OE do C11 no Isolado bacteriano U01 sob as concentrações 1000, 500, 250 e 0 mL.L⁻¹.

As curvas dose resposta para os isolados A15 e A22 se mostraram parecidas para todos os extratos botânicos analisados (Figura 12 a Figura 15). Os extratos vegetais dos clones 1, 8, 13, 17 e 25 não apresentaram efeito de inibição do crescimento até próximo a dosagem 500 mL.L⁻¹, quando começaram a apresentar efeito positivo para inibição. Apesar disso, foi perceptível o aumento do poder de inibição sobre o crescimento das bactérias A15 e A22, próximo da concentração do extrato puro (1000 mL.L⁻¹).

Os clones 13 e 25 foram os que apresentaram o menor efeito de inibição para esses dois isolados, tendo pouco efeito apenas na concentração de 1000 mL.L⁻¹. Para o clone 11, o efeito de inibição se mostrou apenas próximo a concentração de 1000 mL.L⁻¹, mas nessa concentração se mostrou evidente a inibição de crescimento desse isolado.

Embora o *E. camaldulensis* não ter apresentado efeito inibitório nas concentrações, a não ser superior à concentração de 500 ml.L⁻¹, este foi o tratamento com maior poder inibitório de crescimento para os isolados A15 e A22 na maior concentração.

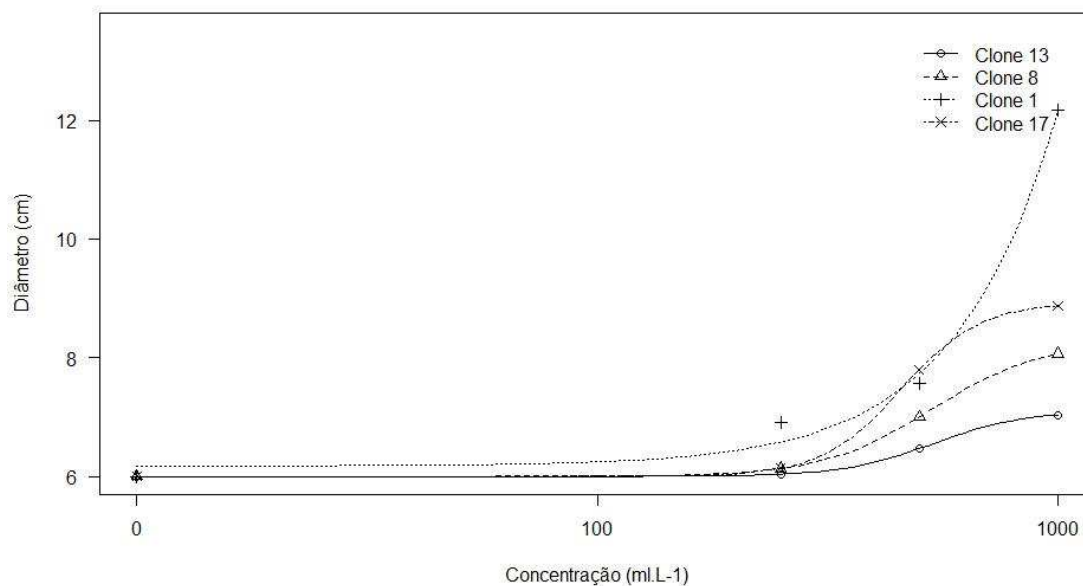


Figura 12- Curvas doses respostas dos diâmetros do Isolado A15 submetidos as concentrações de 0, 250, 500 e 1000 ml.L⁻¹ dos extratos vegetais do Clone 13, Clone 8, Clone 1 e Clone 17, sob condições de laboratório.

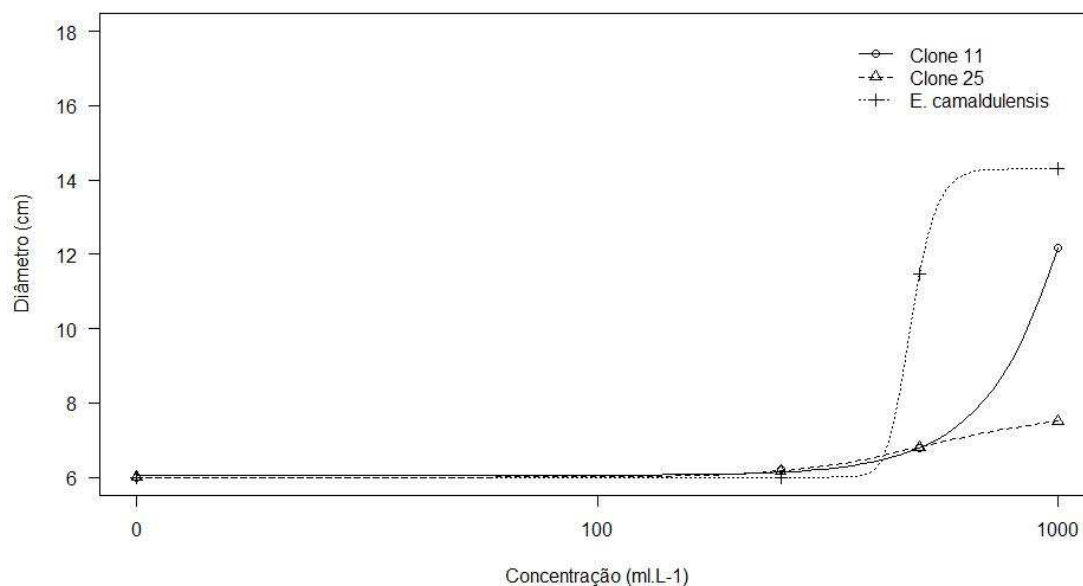


Figura 13- Curvas doses respostas dos diâmetros do Isolado A15 submetidos as concentrações de 0, 250, 500 e 1000 ml.L⁻¹ dos extratos vegetais do Clone 11, Clone 25 e *Eucalyptus camaldulensis*, sob condições de laboratório.

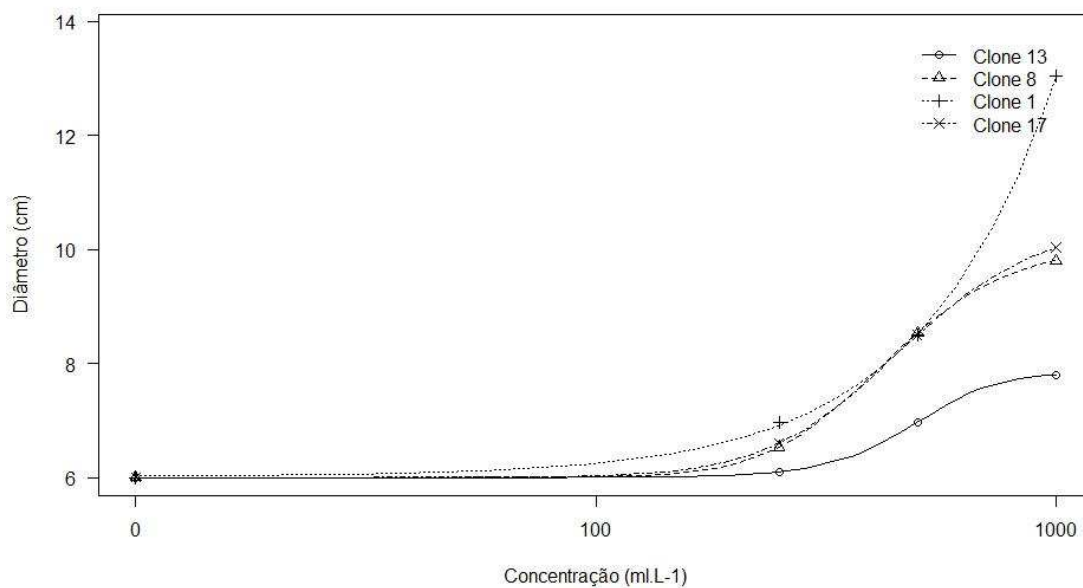


Figura 14- Curvas doses respostas dos diâmetros do Isolado A22 submetidos as concentrações de 0, 250, 500 e 1000 ml.L-1 dos extratos vegetais do Clone 13, Clone 8, Clone 1 e Clone 17, sob condições de laboratório.

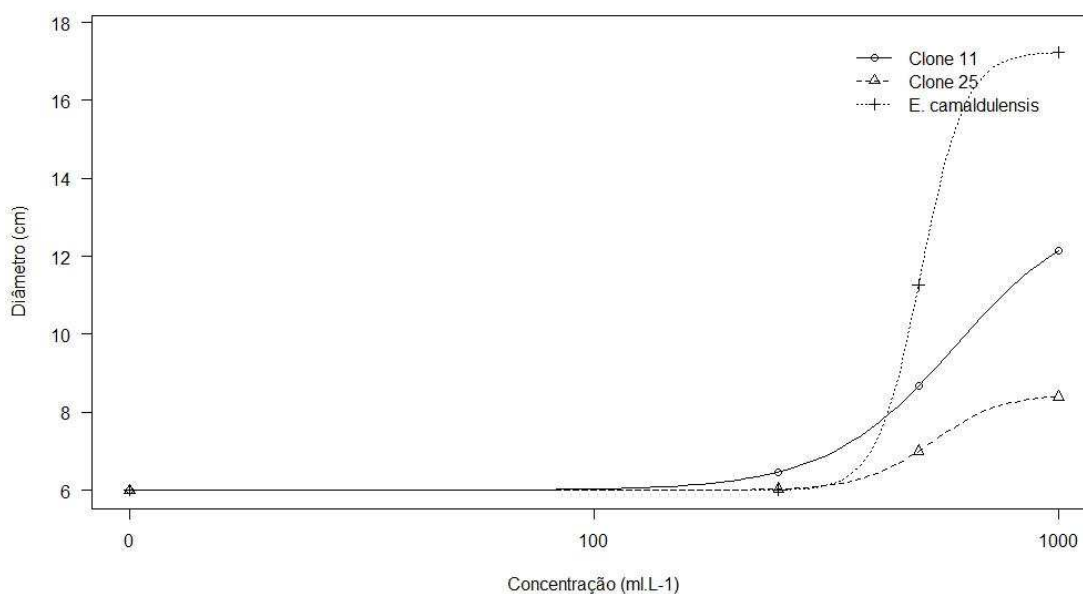


Figura 15- Curvas doses respostas dos diâmetros do Isolado A22 submetidos as concentrações de 0, 250, 500 e 1000 ml.L-1 dos extratos vegetais do Clone 11, Clone 25 e *Eucalyptus camaldulensis*, sob condições de laboratório.

Em relação ao isolado U01, os Clone 17 e 25 não tiveram efeitos de inibição do crescimento, não sendo possível obter uma curva dose resposta. Os extratos vegetais dos clones 1, 8 e 13 tiveram suas tendências muito parecidas e quase não apresentaram efeito de inibição para esse isolado. O extrato vegetal do *E. camaldulensis*, não apresentou efeito de inibição do crescimento até próximo a dosagem 500 ml.L⁻¹. Apesar disso, próximo da concentração do extrato puro (1000 ml.L⁻¹), foi perceptível aumento do poder de inibição sobre o crescimento do isolado U01 (Figura 16).

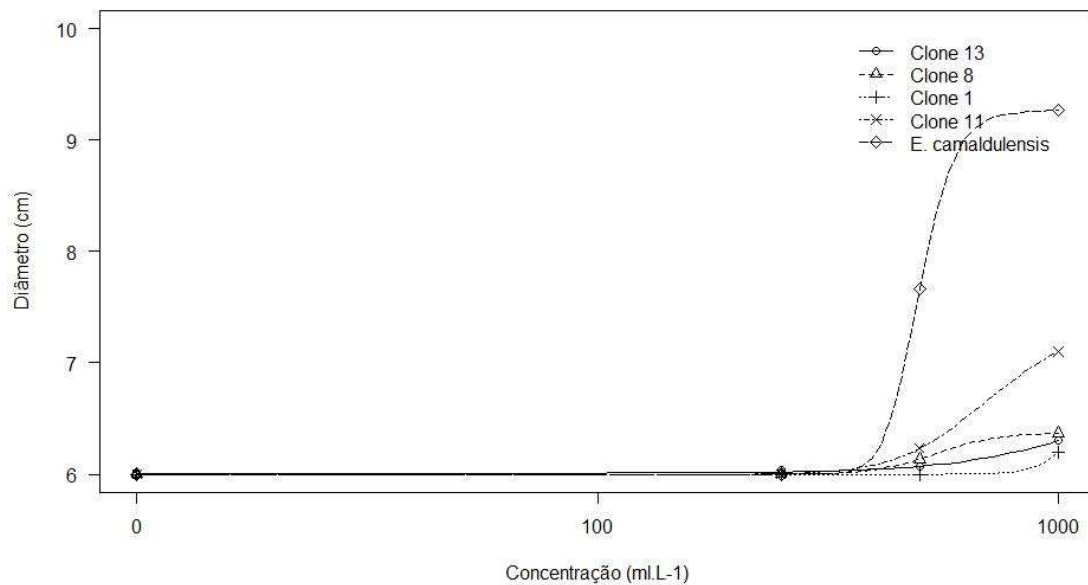


Figura 16- Curvas doses respostas dos diâmetros do Isolado U01 submetidos as concentrações de 0, 250, 500 e 1000 ml.L-1 dos extratos vegetais do Clone 13, Clone 8, Clone 1, Clone 11 e *Eucalyptus camaldulensis*, sob condições de laboratório.

Houve diferença no crescimento entre os extratos vegetais e os antibióticos (A22- GL = 9, F = 85,286, $p < 0,01$; U01- GL = 9, $\chi^2 = 23,098$, $p < 0,01$; A15- GL = 9, F = 45,813, $p < 0,01$). Na Tabela 15, pode-se verificar que houve diferença na inibição de crescimento entre os extratos vegetais e os antibióticos.

Tabela 15- Diâmetro (média±desvio padrão) dos isolados 1, 2 e 3 submetidos a concentração de 1000 ml.L-1 de extratos vegetais de 7 clones e espécie de *Eucalyptus* spp. e as concentrações de três antibióticos: Norfloxacin (10 mgc.ml-1), Sulfazotrim (25 mgc.ml-1) e Netilmicina (30 mgc.ml-1).

Tratamento	Diâmetro (cm)							
	Isolado A22 ¹			Isolado U01 ²		Isolado A15 ¹		
	média	Dunnett	Tukey	média	Dunn	média	Dunnett	Tukey
Clone 13	7,8±0,35	b	D	7,03±1,29	b	6,3±0,2	b	D
Clone 8	9,8±0,2	b	CD	8,07±0,4	b	6,37±0,12	b	CD
Clone 1	13,03±0,93	b	C	12,17±1,89	b	6,2±0,26	b	BC
Clone 17	10,03±1,37	b	CD	8,87±0,72	b	6±0	b	CD
Clone 11	12,13±0,95	b	C	12,17±1,26	b	7,1±0,66	b	BC
Clone 25	8,4±0,85	b	D	7,5±0,5	b	6±0	b	D
E. cam.	17,23±0,4	b	B	14,3±3,44	a	9,27±0,64	b	B
Sulfazotrim	24,4±0,53	a	A	22,6±0,36	b	7,33±2,31	a	A
Norfloxacin	21,73±2,64	a	A	20,97±1,45	a	6±0	a	A
Netilmicina*	22,4±1,35	a	A	20±1	a	14,93±5,86	a	A

i: Clone que foi atacado por insetos; E cam.: *Eucalyptus camaldulensis*; *: Tratamento controle

1- Teste de comparações múltiplas de Dunnnett e Tukey a 5% de significância; 2 Comparações múltiplas de Dunn a 5% de significância, análises realizadas comparando o controle com os demais tratamentos.

A) letras iguais minúsculas na coluna não diferem estatisticamente comparado ao controle pelo teste Dunnnett, a 5% de significância. B) letras semelhantes maiúsculas na coluna não diferente pelo teste Tukey a 5% de significância

Os testes de Dunnett e de Tukey demonstraram que todos os antibióticos foram semelhantes entre si, já os extratos botânicos apresentaram diferença significativa para os antibióticos testados nos isolados A22 e A15. O poder inibitório do extrato botânico do *E. camaldulensis* foi semelhante ao tratamento controle (Netilmicina) e do antibiótico

Norfloxacina avaliados para o isolado U01. O antibiótico Sulfazotrim não apresentou resultado positivo para esse isolado.

O gênero *Xanthomonas*, como grande parte das bactérias fitopatogênicas, abrange espécies gram-negativas e são aeróbias. São bactérias móveis por um único flagelo polar e suas células apresentam-se em formato de bastonetes. O gênero é classificado como pertencente ao filo Proteobacteria, classe Gammaproteobacteria, ordem Xanthomonadales e sendo da família Xanthomonadaceae (MHEDBI-HAHRIN; JACQUES, KOEBNIK, 2011).

Os resultados encontrados nesse estudo ratificam os encontrados por outros autores que comprovaram a eficácia de OE contra diferentes bactérias e também contra *Xanthomonas* spp. fitopatogênicas.

O extrato botânico que obteve as maiores médias (*E. camaldulensis*) possui os monoterpenos γ -terpineno, *p*-cimeno e α -felandreno como seus constituintes principais. Esses compostos foram descritos por outros autores como inibidores de crescimento de *Xanthomonas* spp. (TRAVIESO et al., 2018; SACA, 2019).

As amostras de OE dos clones 01, 17 e 11 que, também, se mostraram eficazes na inibição do crescimento dos isolados avaliados, possuem os monoterpenos 1,8-cineol, α -pineno e acetato de α -terpinil como seus compostos majoritários. O clone 08 apresentou os monoterpenos γ -terpineno 1,8-cineol e α -pineno.

Identificou-se, em estudos prévios, que as amostras de OE que possuíam entre os seus componentes principais os monoterpenos 1,8-cineol, α -pineno, apresentaram atividade bactericida para *Xanthomonas* spp. fitopatogênicas (GUIMARÃES et al, 2014; TRAVIESO, et al., 2018; PÉREZ, et al., 2014).

Os monoterpenos *p*-cymeno e γ -terpineno, quando encontrados em amostras de OE, tiveram comprovada ação antimicrobiana em diferentes bactérias e a combinação desses monoterpenos aumentaram, de duas a quatro vezes a sua atividade de inibição (MILADI et al., 2017)

Diversos componentes presentes nos óleos essenciais, os quais se diferem em cada OE, têm a habilidade para romper ou penetrar na estrutura lipídica presente em bactérias Gram-negativas (KOYAMA et al., 1997).

Segundo Martinko, Madigan e Dunlap (2010) as bactérias gram-negativas possuem uma barreira lipídica que impede a entrada de antibióticos. Assim, a parede celular forma uma barreira em direção às macromoléculas e aos compostos hidrofóbicos, permitindo que este grupo de bactérias tenha maior tolerância a estes compostos, tais como os encontrados nos óleos essenciais (NIKAIDO, 2003).

Algumas bactérias gram negativas possuem grande resistência ao antibiótico Sulfazotrim, o que corrobora com os resultados encontrados nesse estudo (VIEIRA, 2020; SOUZA, 2019).

4 CONCLUSÃO

Os isolados bacterianos analisados se mostraram sensíveis aos OEs de eucalipto testados nesse estudo. As amostras de OE testadas apresentaram eficiência na inibição das *Xanthomonas* spp. fitopatogênicas nas concentrações avaliadas e com a metodologia utilizada.

Os monoterpenos 1,8-cineol, γ -terpineno, α -pineno, acetato de α -terpinil, *p*-cimeno, α -felandreno e trans-pinocarveol constituíram os componentes majoritários das amostras que se mostraram mais efetivas contra os isolados bacterianos estudados.

O OE de algumas espécies de eucalipto pode ser promissor agente antimicrobiano a ser empregado no controle de doenças florestais causadas por bactérias gram negativas, podendo ser considerado um produto de múltiplos usos, podendo ser eficaz contra doenças e pragas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHO, K. **asbio: A Collection of Statistical Tools for Biologists**. R package version 1.6-5. 2020.

ALMEIDA-PEREIRA, C. S. *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of a *Croton tetradenius* Baill. germplasm. **Journal of Essential Oil Research**, v.31, n.5, p.379-389, 2019.

ANJOS, V. F. **VARIABILIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS BACTERIANOS CAUSADORES DE MANCHA FOLIAR EM EUCALIPTO**. Dissertação (Mestrado) em Ciência Florestal na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. 31 p. 2016.

AVILA, R. C. **Resistência clonal à *Thaumastocoris peregrinus* e caracterização química por CG/EM de óleo essencial de eucalipto**. Dissertação de Mestrado em Ciência Florestal na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. 112 p. 2016.

BATISH, D. R. *et al.* Phytotoxicity of lemon-scented eucalypt oil and its potential use as a bioherbicide. **Crop Protection**, v.23, n.1), p.1209-1214. 2004.

BAUER, A.W. *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal Clinical Pathology**, v.45, p.493-496, 1966.

CHI, P. T. L. *et al.* Valorization of Citrus Leaves: Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities of Essential Oils. **Waste and Biomass Valorization**, v.11, p.1-9, 2019.

FAVAN, J. R. *et al.* Modelos computacionais e estatísticos para a predição da severidade da mancha foliar causada por *Xanthomonas* spp. em clone híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. **Tekhne e Logos**, v.11, n.2, p.50-65, 2020.

FERRAZ, H. G. M. *et al.* *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalyptorum* pv. nov. causing bacterial leaf blight on eucalypt in Brazil. **The plant Pathology Journal**, v.34, n.4, p.269, 2018.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. **ExpDes.pt: Pacote Experimental Designs (Portuguese)**. R package version 1.2.0. .2018.

GHASEMI, E. *et al.* Variation in Essential Oil Constituents and Antimicrobial Activity of the Flowering Aerial Parts of *Salvia mirzayanii* Rech. & Esfand. Ecotypes as a Folkloric Herbal Remedy in Southwestern Iran. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v.23, n.1, p.51-64, 2020.

GIRAUDOUX, P. *et al.* **Pgirmess: Spatial Analysis and Data Mining for Field Ecologists**. R package version 1.6.9. 2018.

GONÇALVES, R. C. *et al.* Etiology of bacterial leaf blight of *Eucalyptus* in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v.33, p.3, p.180-188, 2008.

- GUIMARAES, L. G. L. *et al.* Óleo essencial de *Lippia sidoides* nativas de Minas Gerais: composição, estruturas secretoras e atividade antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, n. 2, p. 267-275, 2014.
- HOOGAR, R.; MALAKANNAVAR, S.; SUJATHA, H. T. Impact of *Eucalyptus* plantations on ground water and soil ecosystem in dry regions. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v.8, n.4, p.2929-2933, 2019.
- IBÁ - Instituto Brasileiro de Árvores. **Relatório 2020**. São Paulo: IBÁ. 2020.
- KOYAMA, SHOZO *et al.* A new substance (Yoshixol) with an interesting antibiotic mechanism from wood oil of Japanese traditional tree (Kiso-Hinoki), *Chamaecyparis obtusa*. **General Pharmacology**, v. 28, n. 5, p. 797-804, 1997.
- MAFIA, R. G.; TEIXEIRA, L. P.; FERREIRA, M. A. Production of eucalypt clones under two irrigation systems and the occurrence of foliar bacteriosis (*Xanthomonas axonopodis* Vauterin). **Scientia Forestalis**, v.45, n.116, p.697-704. 2017.
- MARTINKO, J.M.; MADIGAN, M.T.; DUNLAP, P.V. **Microbiologia de Brock**. Artmed, 12 ed., 2010.
- MEKONNEN, A. *et al.* In vitro antimicrobial activity of essential oil of *Thymus schimperi*, *Matricaria chamomilla*, *Eucalyptus globulus*, and *Rosmarinus officinalis*. **International Journal of Microbiology**. 2016.
- MHEDBI-HAJRI, N.; JACQUES, M. A.; KOEBNIK, R. **Adhesion Mechanisms of Plant-Pathogenic Xanthomonadaceae**. In: LINKE, D. GOLDMAN, A. (Eds.). Bacterial Adhesion: Chemistry, Biology and Physics. Netherlands: Springer, v. 715, 2011, p. 71-89.
- MILADI, H. *et al.* Synergistic effect of eugenol, carvacrol, thymol, *p*-cymene and γ -terpinene on inhibition of drug resistance and biofilm formation of oral bacteria. **Microbial Pathogenesis**, v.112, p.156-163, 2017.
- NIKAIDO, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 593-656, 2003.
- PÉREZ, Y. S. *et al.* Composición química del aceite esencial de *Piper hispidum* Sw. y actividad antimicrobiana sobre *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson y *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson. **Revista de Protección Vegetal**, v. 29, n. 3, p. 185 . 2015.
- PIERI, C. *et al.* Principais doenças na eucaliptocultura no Brasil. In: BALDIN, E. L. *et al.* **Inovações em manejo fitossanitário**. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, p. 16-31, 2017.
- TEAM, R. Core. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: **R Foundation for Statistical Computing**; 2013.
- REZENDE, E. H. *et al.* Avaliação da resistência de progênies de *Eucalyptus grandis* para mancha foliar de *Cylindrocladium* e *Kirramyces*. **Summa Phytopathologica**, v.45, n.3, p.295-301, 2019.

RITZ, C. *et al.* **Dose-Response Analysis Using R** PLOS ONE, v.10, n.12, 2015.

SAAD, A. M. *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of the leaves of *Cupressus macrocarpa* Hartweg. Ex Gordon. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.7, n.9, p.207-212, 2017.

SACA, W. A. O. **Determinación de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de Chilca (*Baccharis latifolia*) y Cilantro (*Coriandrum sativum*) para el control de la *Xanthomona* sp., en condiciones in vitro.** Trabalho de Conclusão de Curso para a obtenção do título de Engenheiro de Biotecnologia dos Recursos Naturais na Universidade Politécnica Salesiana. Cuenca. 146 p. 2019.

SILVA, D. F. S. H. S. **Caracterização das doenças causadas por bactérias em viveiros e plantios florestais de *Eucalyptus* spp.** Dissertação (Mestrado) em Ciência Florestal na Universidade Estadual de São Paulo. 156 p. 2019.

SIVIERO, A. *et al.* **Doenças em eucalipto no Acre.** Embrapa Acre-Circular Técnica (INFOTECA-E). 16 p. 2019.

SOUZA, S. G. P. **BACTÉRIAS COM POTENCIAL DE MULTIRRESISTÊNCIA EM MATERIAL HOSPITALAR.** Dissertação (Mestrado) em Ciência Animal com ênfase em produtos bioativos na Universidade Paraense. 2019.

TRAVIESO, M. C. *et al.* Nanopartículas de prata obtidas a partir del extracto residual de la hidrodestilación de *Thymus vulgaris* L. y su efecto sobre *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli*. **Revista de Protección Vegetal**, v. 33, n. 3, 2018.

VIEIRA, S. E. Identificação e perfil de sensibilidade antimicrobiana de bactérias causadoras de cistite em cães atendidos no Hospital Veterinário Roque Quagliato. **Almanaque de Ciências Agrárias**, v. 2, n. 1, p. 22-28, 2020.