



POLITÉCNICO DE COIMBRA
ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA

Teresa Martins Duarte da Costa

Potencial biocida de extratos e óleos essenciais
de plantas para *Erwinia amylovora*

Orientadora: Doutora Cristina Galhano
Coorientador: Doutor João Pedro Luz

Coimbra, 2016



POLITÉCNICO DE COIMBRA
ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA

Teresa Martins Duarte da Costa

Potencial biocida de extratos e óleos essenciais de plantas para *Erwinia amylovora*

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre em Agricultura Biológica.

Orientadora: Doutora Cristina Galhano
Coorientador: Doutor João Pedro Luz

Coimbra, 2016

Agradecimentos

À Professora Doutora Cristina Galhano, pela orientação, transmissão de conhecimento, incentivo, disponibilidade, ajuda e amizade, que desde o início teve para comigo.

Ao Professor Doutor João Pedro Luz, pela coorientação, transmissão de conhecimento, incentivo, disponibilidade e ajuda, que desde o início, também, teve para comigo.

À Eng.^a Conceição Amaro, da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco, pela orientação, partilha de conhecimento, incentivo e por toda a sua ajuda e disponibilidade.

À Professora Doutora Susana Dias, por toda a colaboração prestada no laboratório de Microbiologia da Escola Agrária de Coimbra.

À D. Helena Marques, à D. Rosa Barreto e ao Sr. Fernando Couceiro, técnicos do Núcleo de Ensino da Escola Agrária de Coimbra, pelo auxílio que me prestaram ao longo das atividades laboratoriais.

Aos meus pais, a quem dedico o meu trabalho, agradeço por tudo o que sempre fizeram por mim. Obrigada pela educação e formação pessoal e pela oportunidade única de me formar academicamente.

Ao Orlando e ao Dinis, pelo apoio, pela paciência e pelo incentivo, por não me deixarem desistir. Também a vós dedico este trabalho.

Resumo

O fogo bacteriano é uma doença provocada pela bactéria *Erwinia amylovora*, que se propaga rapidamente, causando elevados prejuízos económicos essencialmente aos produtores de pomoideas, nomeadamente de maçãs, peras e marmelos que, para além de verem as suas produções reduzidas, são obrigados a adotar programas de erradicação e controlo de elevados custos.

Atualmente não são conhecidos métodos de controlo suficientemente eficazes para esta doença. No entanto, a estratégia de controlo tem-se focado fundamentalmente na prevenção e na redução do inóculo. Para tal, têm sido essenciais os sistemas de previsão de risco da doença, que procuram determinar o tempo adequado para intervir, realizando tratamentos nos momentos de maior risco de desenvolvimento da doença, conjugados com outros meios de controlo. É permitida a aplicação de cobre e antibióticos, contudo, os produtos cúpricos não podem ser utilizados após a ponta verde, por serem fitotóxicos e prejudicarem folhas e frutos e os antibióticos de utilização autorizada não têm apresentado eficácia, para além de poderem induzir resistência bacteriana. Entre os antibióticos, a estreptomicina tem mostrado alguma eficácia no controlo do fogo bacteriano, no entanto, o seu uso é interdito na União Europeia. Pelos motivos atrás mencionados, nos últimos anos, tem-se assistido a um aumento no interesse do uso de plantas aromáticas e medicinais. Procura-se igualmente que estas plantas possam vir a servir como alternativa aos compostos químicos de síntese, com o intuito de reduzir os drásticos efeitos negativos por estes causados, tanto a nível ambiental como de saúde pública, nomeadamente o aumento das resistências das bactérias aos antibióticos. Neste contexto, surge este trabalho, no qual foi avaliado o potencial biocida de várias plantas em relação a *Erwinia amylovora*.

Foram preparados extratos aquosos, obtidos por maceração, na concentração de 5 g de planta em 30 mL de água, de *Acacia dealbata*, *Allium sativum*, *Cinnamomum camphora*, *Eucalyptus globulus*, *Laurus nobilis*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus mastichina*, *T. vulgaris* e óleo de *Ricinus communis* puro. Foi ainda avaliado o efeito biocida dos óleos essenciais de *Cinnamomum camphora*, *Eucalyptus globulus*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus mastichina* e de *T. vulgaris*. O efeito

antibacteriano em *Erwinia amylovora* foi avaliado primeiramente utilizando antibiogramas, através do método de difusão em meio sólido. Posteriormente foi determinada a concentração mínima inibitória (CMI) dos óleos que apresentaram efeito antibacteriano nos antibiogramas, tendo ainda sido determinada a concentração mínima bactericida (CMB) dos óleos essenciais que demonstraram ter concentração mínima inibitória.

Os resultados obtidos mostraram que os extratos aquosos das plantas estudadas não inibiram o crescimento de *Erwinia amylovora*. No entanto, no que se refere aos óleos, verificou-se que todos inibiram o crescimento da bactéria, com exceção do óleo de rícino. O óleo que apresentou o maior halo de inibição foi o de *Origanum vulgare*, com 3,3 cm, seguido do de *Thymus vulgaris*, com 3,2 cm, e do de *Rosmarinus officinalis*, com 2,4 cm. Todos estes apresentaram maior halo de inibição do que a estreptomicina a uma concentração de 0,02% que serviu de controlo positivo. Observou-se que, na determinação das CMI e CMB para a *Erwinia amylovora*, todos os óleos essenciais apresentaram efeito inibitório e bactericida, sendo o de *Rosmarinus officinalis* o que apresentou melhores resultados, CMI = 0,5 µL/mL e CMB = 23,3 µL/mL.

Palavras-chave: concentração mínima bactericida, concentração mínima inibitória, controlo biológico, fogo bacteriano, plantas aromáticas e medicinais (PAM).

Abstract

Fire blight is a disease, caused by the bacterium *Erwinia amylovora*, that spreads rapidly, causing elevated economic losses, essentially to pome fruit growers, namely apples, pears and quinces, which apart from seeing the yield reduced are forced to adopt costly eradication and control programmes.

Currently there is no known method for controlling this disease with sufficient efficacy. So, the control strategy has focused fundamentally on the prevention and the reduction of the inoculum. For such strategy, prediction systems that evaluate the risk of the disease are essential, these systems seek to determine the appropriate period to intervene, applying treatments at the moment of greater risk in disease development, conjugated with other control methods. The application of copper and antibiotics is allowed, however, the cupric products cannot be used after initial blossoming as they are phytotoxic and harmful to leaves and fruits, and the authorized antibiotics, as well as inducing bacterial resistance, are not proven to be efficient. Amongst the available antibiotics, the streptomycin has shown some efficacy in controlling fire blight however, its usage is prohibited in the European Union. For the same reasons mentioned above, there is an increased interest in the use of aromatic and medicinal plants. We equally agree that these plants provide an alternative to the synthesis of chemical compounds, aiming to reduce the drastic negative effects caused to public health and to the environment, namely increasing bacterial resistance to antibiotics.

In this dissertation, the biocide potential of various plants in relation to *Erwinia amylovora* is evaluated.

Aqueous extracts of plants were obtained by maceration, in the concentration of 5 g of plant in 30 mL of water of *Acacia dealbata*, *Allium sativum*, *Cinnamomum camphora*, *Eucalyptus globulus*, *Laurus nobilis*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus mastichina*, *T. vulgaris*; and the pure concentration of *Ricinus communis* oil. The biocide effects of the essential oils of *Cinnamomum camphora*, *Eucalyptus globulus*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus mastichina* and *T. vulgaris* were also evaluated.

The antibacterial effect was initially assessed using antibiograms through the disk-diffusion method in solid medium. Subsequently, it was determined the

minimum inhibitory concentration (MIC) of the oil that showed antibacterial effect in antibiograms, having also been determined the minimum bactericidal concentration (MBC) of essential oils that demonstrated minimal inhibitory concentration.

The results showed that the plant extracts did not inhibit the growth of *Erwinia amylovora*. However, all the oils inhibited the bacterial growth except for castor oil (*Ricinus communis*). The oil that presented the largest halo of inhibition was *Origanum vulgare*, with 3,3 cm, followed by *Thymus vulgaris*, with 3,2 cm, and *Rosmarinus officinalis*, with 2,4 cm. All the oils induced a larger halo of inhibition than the streptomycin in a concentration of 0,02%, which served as a positive control. When determining the CMI and CMB (MICs and MBCs) for *Erwinia amylovora* it was observed that all essential oils presented inhibitory and bactericidal effects, being *Rosmarinus officinalis* the one that presented best results, CMI = 0,5 µL/mL and CMB = 23,3 µL/mL.

Keywords: biological control, fire blight, essential oils, medicinal and aromatic plants (MAP), minimum inhibitory concentration, minimum bactericidal concentration.

ÍNDICE

Lista de Figuras	9
Lista de Tabelas	11
Lista de Anexos	13
1 Introdução.....	1
1.1 A importância económica do fogo bacteriano	1
1.2 Bioecologia do agente patogénico causador do fogo bacteriano, <i>Erwinia amylovora</i>	3
1.3 Meios de controlo do fogo bacteriano	9
1.4 Plantas com potencial antibacteriano.....	16
1.4.1 Efeito antibacteriano de plantas em estudo	18
1.4.2 Plantas com potencial antibacteriano sobre <i>Erwinia amylovora</i>	22
1.5 Objetivo	22
2 Materiais e métodos.....	23
2.1 Obtenção dos extratos aquosos por maceração	24
2.2 Obtenção dos óleos essenciais	25
2.3 Obtenção e manutenção da bactéria <i>Erwinia amylovora</i>	26
2.4 Avaliação da atividade antibacteriana das plantas.....	28
2.4.1 Antibiograma	28
2.4.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC)	29
2.4.3 Concentração Mínima Bactericida (MBC)	32
2.5 Análise estatística.....	33
3 Resultados e discussão.....	35
3.1 Antibiograma	35
3.2 Determinação da concentração mínima inibitória (MIC).....	39
3.3 Determinação da concentração mínima bactericida (MBC)	45
4 Considerações finais.....	49
5 Referencias Bibliográficas.....	51

Lista de Figuras

Figura 1: Distribuição da <i>Erwinia amylovora</i> pelo mundo (fonte: EPPO, s/d).	4
Figura 2: Ciclo biológico da <i>Erwinia amylovora</i> (Burr.) (fonte: adaptado de Agrios, 2005).	6
Figura 3: Ramo e folhas com aspeto queimado.	8
Figura 4: Curvatura dos jovens ramos em forma de cajado.	8
Figura 5: Corimbo com pequenos frutos infetados.	8
Figura 6: Corimbo com frutos e flores infetados.	9
Figura 7: Corimbo com flores infetadas.	9
Figura 8: Exsudado bacteriano.	9
Figura 9: Exsudado bacteriano no tronco.	9
Figura 10: Cancro no ramo.	9
Figura 11: Centrifugadora utilizada na preparação dos extratos aquosos das várias plantas.	24
Figura 12: Extratos aquosos de várias plantas, após centrifugação e filtração.	25
Figura 13: (a) membrana de filtração; (b) tubos Eppendorf com extratos esterilizados.	25
Figura 14: Óleos essenciais utilizados no ensaio (a) <i>Cinnamomum camphora</i> ; (b) <i>Thymus mastichina</i> ; (c) <i>Origanum vulgare</i> e <i>T. vulgaris</i> ; (d) <i>Rosmarinus officinalis</i> ; (e) <i>Eucalyptus globulus</i>	26
Figura 15: Tubos Eppendorf com os óleos essenciais de várias plantas.	26
Figura 16: Cultura de <i>Erwinia amylovora</i> em caixa de Petri com meio King B.	27
Figura 17: Preparação do meio de cultura King-B.	27
Figura 18: Suspensão de bactérias.	28
Figura 19: Preparação das caixas de Petri com meio de cultura King B para a realização dos antibiogramas.	29
Figura 20: Esquema do teste de microdiluição em microplaca para determinação da MIC.	30
Figura 21: Microplaca de microdiluição pronta para incubar	31
Figura 22: a) Adição de 30 µL de solução de resazurina a 0,01; b) poços todos preenchidos com a resazurina pronta para incubar até 4 horas.	32

Figura 23: Placas identificadas com a letra e o número correspondente ao poço do qual foi retirado o conteúdo.	33
Figura 24: Colocação de 10 µL de inóculo retirado de cada poço da microplaca em placas de agar nutritivo para determinar a MBC.	33
Figura 25: Antibiogramas em que se pode observar os halos de inibição, em relação a <i>Erwinia amylovora</i> , dos óleos essenciais de (a) <i>Cinnamomum camphora</i> ; (b) <i>Eucalyptus globulus</i> ; (c) <i>Origanum vulgare</i> ; (d) <i>Rosmarinus officinalis</i> ; (e) <i>Thymus mastichina</i> e (f) <i>T. vulgaris</i> . Os extratos das mesmas plantas (representados pelos respetivos números), o antibiótico estreptomicina (0,02%) (controlo positivo) e água destilada esterilizada (controlo negativo).	35
Figura 26: Resultados obtidos na determinação da concentração mínima inibitória (MIC) dos óleos essenciais de <i>Cinnamomum camphora</i> (A), <i>Eucalyptus globulus</i> (B), <i>Origanum vulgare</i> (C), <i>Rosmarinus officinalis</i> (D), <i>Thymus mastichina</i> (E) e <i>T. vulgaris</i> (F) em relação a <i>Erwinia amylovora</i>	40
Figura 27: Alguns resultados obtidos na determinação da concentração mínima bactericida (MBC) dos óleos essenciais de <i>Cinnamomum camphora</i> (a), <i>Eucalyptus globulus</i> (b), <i>Origanum vulgare</i> (c), <i>Rosmarinus officinalis</i> (d), <i>Thymus mastichina</i> (e) e <i>T. vulgaris</i> (f) em relação a <i>Erwinia amylovora</i>	45

Lista de Tabelas

Tabela 1: Sensibilidade de alguns porta-enxertos de pereira a <i>Erwinia amylovora</i> (adaptado de Cruz <i>et al.</i> , 2013).	10
Tabela 2: Sensibilidade de alguns porta-enxertos de macieira a <i>Erwinia amylovora</i> (adaptado de Cruz <i>et al.</i> , 2013).	10
Tabela 3: Sensibilidade de algumas cultivares de pereira a <i>Erwinia amylovora</i> (adaptado de Cruz <i>et al.</i> , 2013).	11
Tabela 4: Sensibilidade de algumas cultivares de macieira a <i>Erwinia amylovora</i> (adaptado de Cruz <i>et al.</i> , 2013).	12
Tabela 5: Produtos autorizados para o combate ao fogo bacteriano (DGAV, 2013). ..	15
Tabela 6: Produtos com base em microrganismos autorizados para combater ao fogo bacteriano (DGAV, 2013).....	16
Tabela 7: Plantas utilizadas no estudo do potencial antibacteriano sobre <i>Erwinia amylovora</i>	23
Tabela 8: Halos de inibição (cm) observados em antibiogramas, das várias plantas em estudo (extrato aquoso e óleos essenciais) em relação a <i>Erwinia amylovora</i> , comparativamente ao controlo positivo, estreptomicina, e ao controlo negativo, água destilada esterilizada.	36
Tabela 9: Índice da atividade antimicrobiana (IAA) dos óleos essenciais das plantas em estudo em relação a <i>Erwinia amylovora</i>	37
Tabela 10: Quantidade de óleo essencial (μL óleo/mL de meio) administrados em cada um dos poços para a determinação das Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI) em relação a <i>Erwinia amylovora</i>	40
Tabela 11: Valores de concentração mínima inibitória (MIC) de <i>Cinnamomum camphora</i> em relação a <i>Erwinia amylovora</i>	41
Tabela 12: Avaliação da concentração mínima inibitória (MIC) do óleo de <i>Eucalyptus globulus</i> em relação a <i>Erwinia amylovora</i>	41
Tabela 13: Avaliação da concentração mínima inibitória (MIC) do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> em relação a <i>Erwinia amylovora</i>	42
Tabela 14: Avaliação da concentração mínima inibitória (MIC) do óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> em relação a <i>Erwinia amylovora</i>	42
Tabela 15: Avaliação da concentração mínima inibitória (MIC) do óleo essencial de <i>Thymus mastichina</i> em relação a <i>Erwinia amylovora</i>	43
Tabela 16: Avaliação da concentração mínima inibitória (MIC) do óleo essencial de <i>Thymus vulgaris</i> em relação a <i>Erwinia amylovora</i>	43

Tabela 17: Avaliação da concentração mínima bactericida (MBC) do óleo essencial de <i>Cinnamomum camphora</i> em relação a <i>Erwinia amylovora</i>	46
Tabela 18: Avaliação da concentração mínima bactericida (MBC) do óleo essencial de <i>Eucalyptus globulus</i> , em relação a <i>Erwinia amylovora</i>	46
Tabela 19: Avaliação da concentração mínima bactericida (MBC) do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> em relação a <i>Erwinia amylovora</i>	47

Lista de Anexos
Anexo 1 – Estatística

1 INTRODUÇÃO

São conhecidas mais de 1600 espécies de bactérias, no entanto, apenas 100 espécies são fitoparasitas (Agrios, 2005). A existência de doenças de plantas causadas por bactérias somente foi reconhecida na segunda metade do século XIX. O primeiro estudo que reporta uma doença de plantas causada por uma bactéria é atribuído ao botânico alemão F.M. Draenert que, numa visita ao Recôncavo Baiano, Brasil, em 1869, pela primeira vez, atribuiu a possibilidade da gomose da cana-de-açúcar ser de origem bacteriana. No entanto, considera-se que os primeiros trabalhos de investigação científica sobre o assunto foram os do americano Burrill em 1882, sobre o fogo bacteriano da macieira e da pereira. Erwin F. Smith, considerado o pai da Fitobacteriologia, em 1889 demonstrou que cinco doenças de plantas eram causadas por bactérias. No início do século XX, já existia um número considerável de trabalhos científicos que comprovavam que as bactérias eram agentes fitopatogénicos relevantes. Este facto deve-se não apenas à elevada incidência e severidade em culturas de valor económico, mas também à facilidade com que se disseminam e às dificuldades encontradas para o seu controlo (Agrios, 2005).

1.1 A IMPORTÂNCIA ECONÓMICA DO FOGO BACTERIANO

O fogo bacteriano é a doença, nas plantas, de maior impacto económico, no mundo. Ameaça a produção global de espécies de rosáceas ornamentais e fruteiras com grande interesse comercial, como maçã, pêra e marmelo, podendo destruir árvores e mesmo pomares inteiros numa só época, restringindo, assim, o comércio internacional. De facto, esta doença altamente contagiosa e de rápida propagação, sem métodos de controlo eficazes, para além dos prejuízos económicos causados diretamente relacionados com a produção, exige o estabelecimento de programas de erradicação e quarentena que implicam também elevados custos (Braun-Kiewnick *et al.*, 2011; DGADR, 2011 e 2012; Buhlmann *et al.*, 2013; Luz, 2013).

Existem várias referências relativamente ao impacte económico causado pelo fogo bacteriano, em diferentes países. Por exemplo, em Marrocos, desde o

aparecimento da doença em 2006 até 2010, estima-se que cerca de 2000 ha de pomares de pereira e marmeleiro foram arrancados e incinerados, provocando quebras de rendimentos de 55 milhões de euros. Nalguns estados dos EUA, o cultivo da pera foi abandonado em grande escala, tendo em conta que a rápida propagação da infeção impossibilita a recuperação das árvores, mesmo quando se praticam podas drásticas e imediatas. De facto, as plantas morrem num curto período de tempo após a observação dos primeiros sintomas (Luz, 2013; Van der Zwet & Keil *cit. in* EPPO, s/d).

Em Portugal, apesar de serem várias as referências relativas à doença do fogo bacteriano, não foram conseguidos dados concretos relativamente ao impacte económico desta doença (DGADR, 2011; Amaro & Luz, 2012; COTHN, 2012; Cruz, 2012; DGADR, 2012; Franco, 2013; Luz, 2013; DRAPLVT, 2014; Luz & Amaro, 2014; EPPO, sd).

Os primeiros focos da doença foram detetados em 2006, nos pomares de macieiras e pereiras no concelho do Fundão, nomeadamente na Póvoa da Atalaia e em Vale dos Prazeres (Pinto, 2013). Após confirmação laboratorial, todo o material vegetal infetado foi arrancado e destruído, bem como os hospedeiros circundantes (Pinto, 2013).

Em 2010, no âmbito do programa de prospeção, foram assinalados novos focos em pereiras e macieiras dos concelhos de Alcobaça, Bombarral, Caldas da Rainha e Torres Vedras (Pinto, 2013), num total de 1250 árvores (Serra & Pinto, 2015). Segundo estes autores, em 2011, o fogo bacteriano foi assinalado, em pomares de macieiras e pereiras, nos concelhos da Guarda e Viseu. Nesse mesmo ano, foi detetada nos concelhos de Ferreira do Alentejo e Alandroal em pomares de macieiras, pereiras e marmeleiros. O número de árvores infetadas totalizou 12126 árvores (Serra & Pinto, 2015). Com vista à sua erradicação, para todos os focos de infeção detetados, foram aplicadas as medidas fitossanitárias legalmente estabelecidas (Pinto, 2012 e 2013).

Em 2012, foram registados três novos focos no concelho de Coimbra, num viveiro de macieiras e num campo de pés-mãe de pereiras e num pomar de marmeleiros em Campo Maior. Nesse ano foram queimadas um total de 36246 plantas (Pinto, 2013).

Em 2013, foram registados novos focos nas regiões Norte, Centro e reincidência no Alentejo (Pinto, 2013). Como consequência, na região Norte, no

conselho de Sernancelhe foram destruídos dois pomares de macieiras, um pomar de marmeleiro e outro pomar de macieiras que se encontrava localizado na zona de segurança, mas que apresentava sintomas (Pinto, 2012). Nesse ano foram queimadas 7609 plantas infetadas com *Erwinia amylovora* (Serra & Pinto, 2015).

Em 2014, foram detetados novos focos de contaminação, só na zona de atuação da DRAP Centro, dois viveiros no concelho de Viseu, um pomar de macieiras no concelho de Gouveia, dois pomares de macieiras no concelho de Porto de Mós, dois pomares de macieiras e um de pereiras em Leiria. Nesse ano, foram queimadas 24834 plantas infetadas com *Erwinia amylovora* (Serra *et al.*, 2015) sendo a maioria provenientes de dois viveiros (Pinto *et al.*, 2014).

1.2 BIOECOLOGIA DO AGENTE PATOGÉNICO CAUSADOR DO FOGO BACTERIANO, *ERWINIA AMYLOVORA*

O fogo bacteriano é causado pela bactéria *Erwinia amylovora* (Burr) Winslow *et al.*, considerado organismo de quarentena a nível comunitário e, como tal, incluído no Anexo II da Diretiva n.º 2000/29/CE, do Conselho, de 8 de maio (Taylor *et al.*, 2003; Agrios, 2005; DGADR, 2011; DGADR, 2012).

A bactéria *Erwinia amylovora* é uma enterobactéria, gram-negativa, necrotrófica. Caracteriza-se por ter a forma de bastonete curto, com terminações arredondadas, de aproximadamente 0,5-1,0 por 1,0-3,0 µm, podendo variar de tamanho conforme as condições de desenvolvimento e técnicas de observação. É móvel por flagelos peritriciais, não esporula, resistente a ácidos, quimio-organotrófica, catalase positiva e oxidase negativa, anaeróbia facultativa, produzindo ácido e não gás a partir de glicose, tanto em condições de aerobiose como de anaerobiose. Esta bactéria cresce facilmente em laboratório (Pelczar *et al.*, 1980; Taylor *et al.*, 2003; Agrios, 2005; Braun-Kiewnick *et al.*, 2011; Buhlmann *et al.*, 2013; EPPO, SD).

Segundo Agrios (2005), em termos taxonómicos, *Erwinia amylovora* inclui-se no reino Procaryotae, na divisão Gracilicutes, classe Proteobacteria, família Enterobacteriaceae e género *Erwinia*.

São vários os sinónimos para esta espécie: *Micrococcus amylovorus* Burrill; *Bacillus amylovorus* (Burrill) Trevisan; *Bacterium amylovorus* (Burrill) Chester; *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al* f.sp. *rubi* Starr, *et al* (EPPO, s/d).

O fogo bacteriano foi identificado, pela primeira vez, na América do Norte, área considerada o seu centro de origem geográfica por Burrill, em 1883, como referido acima (Ozrenk *et al.*, 2011; Buhlmann *et al.*, 2013). Esta doença foi reportada em 1920 na Nova Zelândia e, em 1957, em Inglaterra, tendo-se posteriormente disseminado por uma grande parte dos países da Europa (DGADR, 2011). Em 2012 o fogo bacteriano já estava presente em 49 países, como pode ser observado na Fig. 1 (EPPO, s/d).

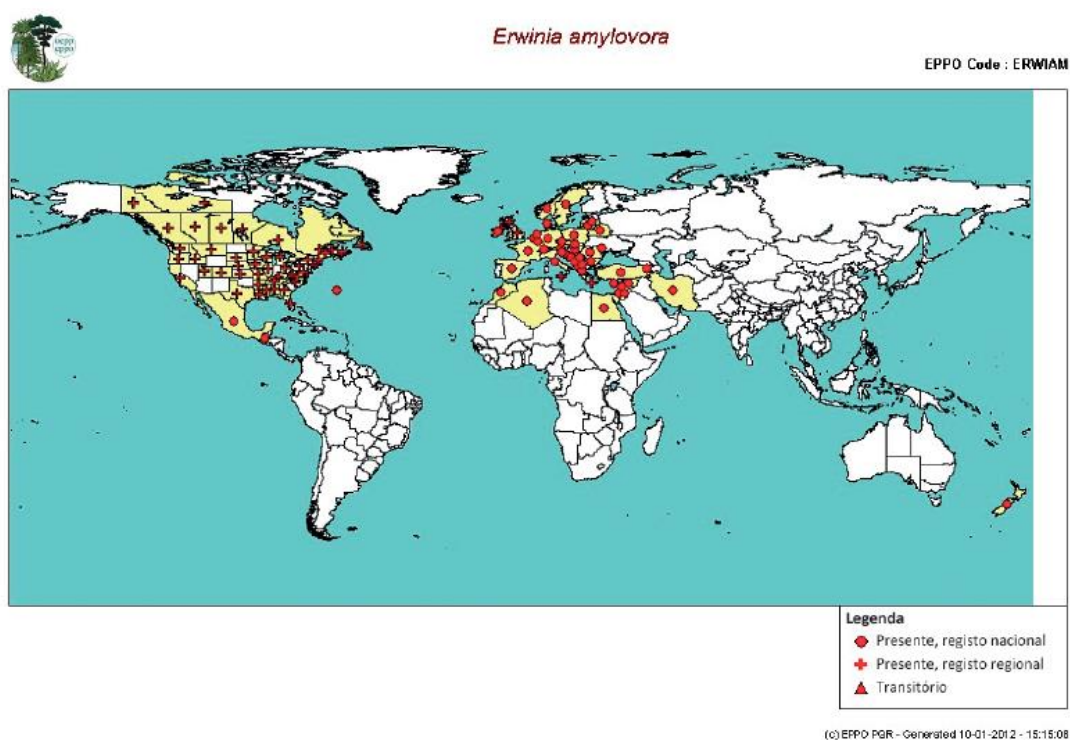


Figura 1: Distribuição da *Erwinia amylovora* pelo mundo (fonte: EPPO, s/d).

Portugal foi considerado o único país da União Europeia, com área integral protegida, até 2006. Nessa altura, foi detetado um foco de doença com sintomas atribuíveis a *Erwinia amylovora*, tendo sido tomadas medidas de controlo e erradicação. Desde então, não foram detetados novos focos da doença até que, na campanha de 2010/11, na sequência de observações efetuadas no âmbito do programa nacional de prospeção, foram detetados novos focos de fogo bacteriano, para os quais foram tomadas novamente medidas de controlo e

erradicação (DGADR, 2011; Pinto, 2012; Luz, 2013; Luz *et al.*, 2014; Pinto, 2013; Pinto *et al.*, 2014).

São várias as espécies fruteiras e ornamentais referidas como hospedeiras naturais, como por exemplo: nespereiras (*Eriobotrya japonica* Lindl.), *Rubus* spp., ameixeira japonesa (*Prunus salicina* Lindl.), pilriteiros (*Crataegus* spp.), piracantas (*Pyracantha* spp.) e roseiras (*Rosa* spp.). São igualmente dados como importantes na dispersão da bactéria plantas do género *Crataegus*, muito usadas em sebes, e a planta espontânea *Pyrus amygdaliformis* Vill. dadas como frequentes na área Mediterrânica (DGADR, 2011; Ozrenk *et al.*, 2012). Em Portugal, a doença foi identificada tanto em ornamentais como em pereiras (*Pyrus communis* L.), macieiras (*Malus pumila* Mill.) e marmeleiros (*Cydonia oblonga* Mill.) (DGADR, 2011; Ozrenk *et al.*, 2011).

Os sintomas do fogo bacteriano estão associados ao desenvolvimento vegetativo da planta hospedeira. Resumidamente, pode dizer-se que, na primavera, é produzido o inóculo primário, durante o verão, ocorre a infeção das flores, raminhos e frutos, no outono, ocorre a formação de cancrios na planta, permanecendo a bactéria na forma latente, durante o período de repouso vegetativo da planta (Palacio-Bielsa *et al.*, 2009; Luz, 2013).

De facto, o ciclo desta doença é algo complexo (Fig. 2). No entanto, sabe-se que dependendo dos fatores climatéricos, a bactéria pode sobreviver durante um período de tempo variável como endófito ou como epífita (Thomson, 2000; Luz, 2013).

A infeção inicia-se na parte terminal dos raminhos, sendo esta a que os agricultores detetam primeiro. Após a infeção floral, em condições de muita humidade, as bactérias também entram nas folhas e caules jovens através dos estomas e lentículas (Van der Zwet *et al.*, 2012; Luz, 2013). De facto, em condições de humidade superior a 80% e temperatura superior a 15°C, a bactéria penetra nos tecidos do hospedeiro através das aberturas naturais como gomos, estomas, lentículas, hidátodos e feridas provenientes da queda das pétalas, granizo, picadas de insetos e poda. As bactérias estabelecem-se nos estigmas das flores e a água transporta-as para a parte inferior do cálice onde ocorre a infeção. Nesta situação, a bactéria multiplica-se rapidamente e invade pedúnculos, ramos, raminhos jovens ou frutos imaturos (Thomson, 1986; DGADR, 2011; Buhlmann *et al.*, 2013; Franco, 2013; Luz, 2013).

Tendo em conta as condições ambientais e o estado fisiológico da planta, o período de incubação da bactéria pode variar entre 4 e 8 dias, em macieiras, e 4 e 10 dias, em pereiras (Ficke *et al.*, 1988 *cit. in* Luz, 2013).

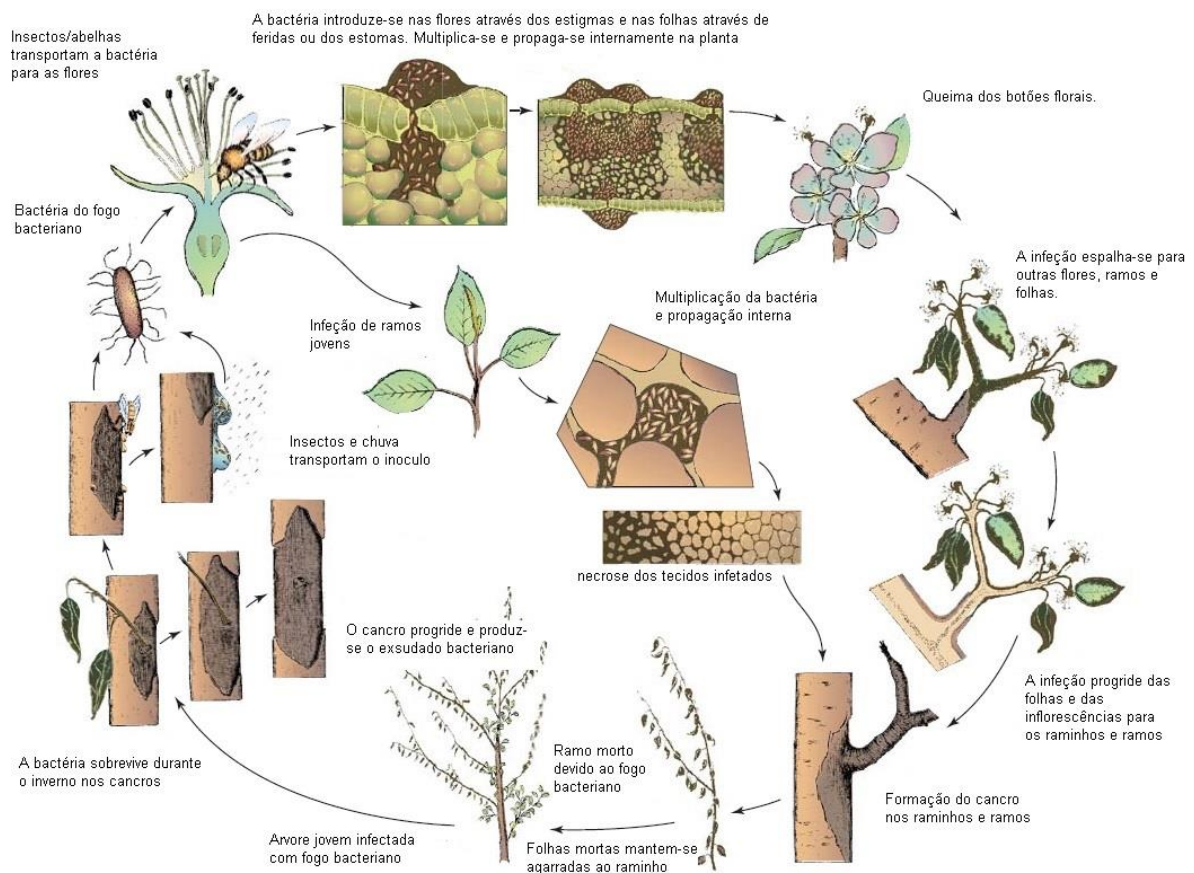


Figura 2: Ciclo biológico da *Erwinia amylovora* (Burr.) (fonte:adaptado de Agrios, 2005).

O inóculo primário forma-se quando as condições climáticas são favoráveis, no início da primavera, altura em que ocorre a multiplicação da bactéria. Assim, surge a infeção primária, a primeira infeção do período vegetativo. Esta pode ter origem nos exsudados dos cancras que se formaram no ano anterior ou em bactérias já existentes nos tecidos das plantas (Van der Zwet *et al.*, 1988 *cit. in* Luz, 2013). Apesar das infeções provenientes dos cancras hibernantes serem atualmente bastante desvalorizadas, diversos autores consideram que os cancras formados no final do ciclo vegetativo anterior são os principais responsáveis pela produção de inóculo primário. Os cancras vão contaminando os gomos foliares e florais até provocar a morte, alastrando a bactéria para ramos e troncos através dos exsudados e pólen contaminado. Na primavera do ano seguinte, os cancras

vão ser a principal fonte de contaminação dos gomos foliares e florais. A bactéria também pode hibernar em frutos atacados, em pequenos raminhos e eventualmente em ramos deixados no solo após a poda (Van der Zwet *et al.*, 2012). É nesta época que as bactérias em multiplicação, formando o exsudado bacteriano de cor creme a alaranjado, que emerge de órgãos afetados, também podem ser disseminadas a longa distância, através de aves migratórias e transporte de material infetado, assim como a curta distância, através da chuva, vento, aves, insetos, máquinas e material de poda (Melgarejo *et al.*, 2010 *cit. in* Luz, 2013; DGADR, 2011; Buhlmann *et al.*, 2013; Franco, 2013).

Após as infecções primárias, produz-se o inóculo secundário a partir dos exsudados, produzidos durante a primavera, verão e outono e formados nos rebentos, folhas, frutos ou ramos (Luz, s/d). Este inóculo secundário pode ser disseminado por agentes bióticos e abióticos, originando infecções secundárias que podem provocar maiores prejuízos nas plantas e são mais numerosas do que as infecções primárias (Thomson, 2000; Ordax, 2008; Palacio-Bielsa *et al.*, 2009).

Os tecidos necrosados inicialmente aparentam-se húmidos, depois vermelhos ou acastanhados (Thomson, 2000; Ordax, 2008; Palacio-Bielsa *et al.*, 2009).

A paragem do ciclo vegetativo inicia-se no outono, quando a bactéria diminui ou cessa a sua multiplicação, instalando-se nos tecidos lenhificados produzindo os cancos nos troncos e ramos com a necrose dos tecidos (Blachinsky *et al.*, 2003 *cit. in* Luz, 2013).

No inverno, com a diminuição da temperatura, a planta hospedeira entra em repouso vegetativo, a bactéria aloja-se nos cancos dos ramos e troncos e interrompe o seu crescimento, sobrevivendo assim durante o inverno, podendo iniciar novas infecções na primavera seguinte (Cambra *et al.*, 2002; Ordax, 2008; Palacio-Bielsa *et al.*, 2009).

A disseminação da doença a longa distância faz-se principalmente através da introdução de material vegetal contaminado, plantação de fruteiras, plantas ornamentais e uso de material vegetal para enxertia, provenientes de zonas afetadas pelo fogo bacteriano (Cambra *et al.*, 2002 *cit. in* Luz, 2013; DGADR, 2011). Uma vez instalado o primeiro foco numa nova zona, a bactéria dispersa-se facilmente entre árvores e parcelas próximas através dos insetos, especialmente os polinizadores, chuva, vento, rega por aspersão, instrumentos de poda e outros utensílios, maquinaria e até o próprio agricultor (DGADR, 2011; Luz, 2013). Para

além dos factores atrás mencionados, McManus & Jones (*cit. in* Buhlmann *et al.*, 2013) apontam os aerossóis como podendo ter contribuído para a dispersão da doença na Europa.

A doença deve a sua designação de fogo bacteriano aos sintomas evidenciados pelos órgãos das plantas doentes, nomeadamente dos gomos e raminhos que mostram a presença de necroses de cor castanha ou negra, fazendo lembrar o aspeto de queima (DGADR, 2011; Buhlmann *et al.*, 2013; Franco, 2013).

O período crítico é o início de cada ciclo vegetativo, em que, dos ápices afetados se geram raminhos necrosados (“queimados”) (Fig. 3) sempre aderentes à planta e que ganham a forma de bordão, o chamado efeito cajado de pastor (DGADR, 2011; Franco, 2013) (Fig. 4). No período do vingamento das flores, originam-se frutos imaturos e mumificados (Figs. 5 e 6) e as folhas adquirem uma cor castanha a negra (Fig. 7). A zona subepidérmica dos ramos e troncos apresentam lesões de cor avermelhada e, nos feixes lenhosos, surge o exsudado bacteriano (Figs. 8 e 9) que tanto pode provocar o definhamento do órgão como originar cancro (Fig. 10) (Buhlmann *et al.*, 2013; Franco, 2013).



Figura 3: Ramo e folhas com aspeto queimado.



Figura 4: Curvatura dos jovens ramos em forma de cajado.



Figura 5: Corimbo com pequenos frutos infetados.

Fonte: (DRAPLVT, 2014).



Figura 6: Corimbo com frutos e flores infetados.



Figura 7: Corimbo com flores infetadas.



Figura 8: Exsudado bacteriano.

Fonte: (DRAPLVT, 2014).



Figura 9: Exsudado bacteriano no tronco.



Figura 10: Cancro no ramo.

Fonte: (DRAPLVT, 2014).

1.3 MEIOS DE CONTROLO DO FOGO BACTERIANO

Como já referido anteriormente, o fogo bacteriano é uma doença difícil de controlar e, em solos que apresentam elevada fertilidade e humidade, que permitem um rápido crescimento da planta, pode ocorrer um aumento da gravidade dos danos provocados pela bactéria (Ozrenk *et al.*, 2012).

Sabendo que não existem meios de combate eficazes, Amaro & Luz (2012) defendem que, o controlo do fogo bacteriano deverá ser baseado numa estratégia integrada, na qual se visa reduzir o inóculo, evitar o estabelecimento da bactéria no hospedeiro e diminuir a suscetibilidade do hospedeiro à infeção. Segundo estes autores, esta estratégia deve incluir sistemas de previsão de risco e medidas de controlo baseadas tanto na prevenção, como na coexistência com a doença.

Já em 1994, Wilcox defendia como melhor medida de controlo do fogo bacteriano a combinação de práticas culturais, técnicas de minimização do inóculo no pomar, assim como aplicações bem sincronizadas de bactericidas.

Ozrenk *et al.* (2011), concordando com Wilcox, acrescentam que a resistência da planta hospedeira é o factor mais importante no controlo ao fogo bacteriano, sublinhando a necessidade de criar variedades resistentes em porta-enxertos resistentes.

Cruz & Sousa (2013) também defendem que a sensibilidade dos porta-enxertos influencia a capacidade dos cultivares resistirem a *E. amylovora* e, como tal, compilaram tabelas com o grau de sensibilidade de alguns porta-enxertos de pereira (Tabela 1) e macieiras (Tabela 2).

Tabela 1: Sensibilidade de alguns porta-enxertos de pereira a *Erwinia amylovora* (adaptado de Cruz *et al.*, 2013).

Cultivares	Muito pouco	Pouco	Medianamente	Sensível	Muito
OHF 333® Brokmal	X				
Marmeleiro EMC				X	
Marmeleiro d'Adams 332				X	
Marmeleiro EMA				X	
Marmeleiro Sydo				X	
Marmeleiro BA29				X	
Francos (<i>Pyrus communis</i>)					X

Tabela 2: Sensibilidade de alguns porta-enxertos de macieira a *Erwinia amylovora* (adaptado de Cruz *et al.*, 2013).

Cultivares	Muito pouco	Pouco	Medianamente	Sensível	Muito
M7		X			
M25		X			
M27			X		
M111			X		
M26				X	
Pajam 1® Lancep				X	
M9 NAKB				X	
Pajam 2® Cepiland				X	
M9 EMLA				X	
M 106				X	

Tendo por base que só algumas espécies de rosáceas são sensíveis a *E. amylovora*, existindo diferenças entre cultivares da mesma espécie, Cruz & Sousa (2013) analisaram o grau de sensibilidade de alguns cultivares de pereira (Tabela 3) e macieiras (Tabela 4) a *Erwinia amylovora*.

Em Portugal, perante sintomas suspeitos, é aconselhado: a comunicação e coordenação com a respetiva Direção Regional de Agricultura. Uma rápida intervenção, assim como boas práticas culturais, das quais se destaca o uso de material de propagação certificado, evitar a contaminação cruzada, queimar todo o material suspeito removido e desinfetar todas as ferramentas e utensílios utilizados nos cortes e podas (DGADR, 2012; Franco, 2013).

Tabela 3: Sensibilidade de algumas cultivares de pereira a *Erwinia amylovora* (adaptado de Cruz et al., 2013).

Cultivares	Muito pouco	Pouco	Medianamente	Sensível	Muito
Harrow Sweet	X				
Ercolini (Coscia)		X			
Beurré Bosc			X		
Beurré Hardy			X		
Général Leclerc			X		
Louise Bonne d'Avranches			X		
Precoce Morettini			X		
Rocha			X		
Santa Maria			X		
Williams			X		
Abbé Fetel				X	
Blanquilla				X	
Carmen				X	
Conférence				X	
Limonera (Dr. Jules Guyot)				X	
Alexandrine Douillard					X
Doyenné du Comice					X
Packham's Triumph					X
Passe Crassane					X

A estratégia de combate ao fogo bacteriano tem-se focado na prevenção e, para além disso, na redução do inóculo através do uso de tratamentos antimicrobianos e cúpricos. Também têm sido realizados estudos químicos e genéticos, com o intuito de aumentar a resistência do hospedeiro (Amaro *et al.*, 2012).

Tabela 4: Sensibilidade de algumas cultivares de macieira a *Erwinia amylovora* (adaptado de Cruz *et al.*, 2013).

Cultivares	Muito pouco	Pouco	Medianamente	Sensível	Muito
Early Red One		X			
Golden Delicious		X			
G. Smoothee		X			
Lysgolden		X			
Mutsu		X			
Oregon Spur		X			
Ozark Gold		X			
Red Chief		X			
Reineta branca		X			
Royal Gala		X			
Starking		X			
Topred		X			
Gala			X		
Granny Smith			X		
Jonagold			X		
Rome Beauty				X	
Fuji				X	
Gloster				X	
Jonathan				X	
Melrose				X	
Idared					X

No controlo do fogo bacteriano é também de salientar a importância dos sistemas de previsão de risco desta doença. Disponibilizam informações que contribuem para a realização de tratamentos nos momentos mais oportunos, quando os riscos de desenvolvimento da doença são mais elevados (Billing, 2000 *cit. in* Amaro *et al.*, 2012), que permitem programar as datas para as inspeções,

para colheita de amostras e poda (Johnson, 2000 *cit. in* Amaro *et al.*, 2012) e ainda delimitar as áreas com maiores riscos de contágio, estando o risco de infecção dependente da quantidade de inóculo, virulência do agente patogénico, sensibilidade do hospedeiro, temperatura e disponibilidade de água, não sendo deste modo uniforme ao longo do ciclo cultural (Montesinos *et al.*, 2009 *cit. in* Amaro *et al.*, 2012). Estes sistemas de previsão, apesar de ajudarem na avaliação da necessidade de intervenção (Amaro *et al.*, 2012), não são perfeitos, por existirem sempre fontes de infecção que não são passíveis de serem tomadas em consideração (Carter, 2010 *cit. in* Amaro *et al.*, 2012). Assim sendo, o seu uso tem que ser conjugado com outros meios de luta (Johnson, 2000 *cit. in* Amaro *et al.*, 2012).

Também os métodos químicos podem ser utilizados no controlo do fogo bacteriano, como seja a aplicação de produtos de carácter bacteriostático ou bactericida, como cobre e antibióticos, ou outros que estimulam os mecanismos de defesa das plantas (Ordax *cit. in* Amaro *et al.*, 2012).

O cobre é solubilizado pelos exsudados bacterianos, causando morte celular ou inibindo algumas atividades biológicas na célula. No entanto, os produtos cúpricos não deverão ser utilizados após a ponta verde, uma vez que são fitotóxicos, prejudicando folhas e frutos (DGADR, 2011; Amaro *et al.*, 2012).

No controlo químico ao fogo bacteriano, a estreptomicina é o antibiótico que tem apresentado os melhores resultados (Psallidas *et al.*, 2000 *cit. in* Amaro *et al.*, 2012; Kokoskoval *et al.*, 2011). No entanto, devido à possibilidade de transferência de resistência a bactérias patogénicas que infetam o homem e outros animais, o seu uso está proibido na União Europeia (Amaro *et al.*, 2012). Nos EUA, o uso de estreptomicina é permitido, no entanto, apresenta problemas de resistência, justificando a existência de estudos que procuram antibióticos alternativos (Agaskaveg *et al.*, 2011 *cit. in* Amaro *et al.*, 2012).

Apesar de não terem uma ação inibitória direta, há outros compostos químicos (Tabela 5) que apresentam atividade no controlo desta doença (Amaro *et al.*, 2012), das quais destacamos fosetil, prohexadiona-cálcio, acibenzolar-S-metilo, e o extrato da alga *Laminaria digitata* (Franco, 2013; Montesinos *et al.*, *cit. in* Amaro *et al.*, 2012). Apesar dos resultados de campo terem mostrado alguma falta de consistência, o fosetil, em laboratório, tem demonstrado bons resultados em determinadas concentrações e condições (Ordax *cit. in* Amaro *et al.*, 2012).

No Regulamento 1107/2009, ao abrigo do artigo 51.º (autorizações a utilizações menores) são autorizados os produtos apresentados na Tabela 5, para o combate ao fogo bacteriano.

Franco (2013) refere também que o uso de produtos bioestimulantes, que incrementam a espessura da parede celular, ativa mecanismos de defesa natural das plantas e auxilia os novos crescimentos. Estes produtos, indutores de resistência sistémica adquirida (SAR), estão disponíveis no mercado.

Milcevicová *et al.* (2010) concluíram que as plantas mais resistentes poderão apresentar um ambiente mais desfavorável ao crescimento bacteriano. Este facto justifica-se por estas apresentarem níveis mais elevados de compostos de defesa, tais como o ácido salicílico e da enzima fenilalanina amónia-liase. Estes autores verificaram ainda, que nas plantas infectadas com o fogo bacteriano, os mecanismos de síntese de ácido salicílico e a maioria dos genes fenilpropanoides são inibidos mas, podem ser, no entanto, compensados por outros mecanismos de regulação. Concluíram deste modo que, tanto a natureza como a quantidade de compostos de defesa existentes no momento são capazes de influenciar o resultado de interações planta-agente patogénico.

Tabela 5: Produtos autorizados para o combate ao fogo bacteriano (DGAV, 2013).

Substância ativa	Produto comercial	Forma	Concentração	IS (dias)	Classificação toxicológica**	Época de aplicação
cobre (oxicloreto)	CUPRITAL (SAPEC AGRO)	WP	(a) 500-1000g (b) 400g	-	Xn; N	(a) Queda das folhas (b) Estado B-C (até ao aparecimento da ponta verde)
	CUPRITAL SC (SAPEC AGRO)	SC	(a) 400g (b) 300g	-	Xi; N	
fosetil	ALIETTE FLASH (BAYER CROP SCIENCE)	WG	375G	21	Xi; N	Realizar no máximo 3 aplicações. Tratar no início da floração e, repetir com intervalo de três a quatro dias. Realizar o terceiro tratamento apenas se os riscos de contaminação forem importantes, ou, se a floração se prolongar.
	ETYLIT PREMEIER (SAPEC AGRO)	WP	375G	21	Xi	
	ALFIL (AFRASA)	WP	375g	21	Xn	
laminarina	VACCIPLANT * (GOEMAR/SELECTIS)	SL	75ml	-	Is	Iniciar as aplicações uma semana antes da infecção ou na ausência de conhecimento realizar as aplicações, durante a floração, desde o botão verde até à queda das últimas pétalas, a intervalos de 10 dias.
prohexadiona-cálcio	REGALIS (BASF)	WG	Macieira: 125g Pereira: 150g	-	Is	Realizar no máximo 2 aplicações. Efetuar o 1.º tratamento quando os novos lançamentos têm no máximo 5 cm e o 2.º tratamento, três a quatro semanas depois do primeiro.

* autorizado em 17-01-2013, por um período de 120 dias

** Xn-Nocivo; Xi-Irritante; N-Nocivo para o ambiente; Is-Isento

É também autorizada a aplicação de produtos derivados do fungo *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G.Arnaud e da bactéria *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn (Tabela 6) que, atuam preventivamente colonizando as flores

abertas, entrando em competição por nutrientes e espaço com a bactéria (DGAV, 2013; Franco, 2013; Prates *et al.*, 2013).

Segundos estudos realizados por Prates *et al.* (2013), *A. pullulans* também baixa o pH do meio, criando condições desfavoráveis ao crescimento da bactéria. *B. subtilis*, por sua vez, produz peroxidases induzindo resistências por parte da planta.

Tabela 6: Produtos com base em microrganismos autorizados para combater ao fogo bacteriano (DGAV, 2013).

Substâncias ativas	Produto comercial	Forma	Concentração	IS dias	Classificação toxicológica**	Época de aplicação
<i>Aureobasidium pullulans</i>	BLOSSOM PROTECT* (BIO FERM GMBM/SELECTION TIS)	WG	1,5	-	Is	Realizar no máximo 4 tratamentos durante a floração a intervalos de 2 dias.
<i>Bacillus subtilis</i> QST 713	SERENADE MAX (BASF)	WP	2,5-4	-	Is	Realizar no máximo 4 aplicações durante a floração.

* autorizado em 17-01-2013, por um período de 120 dias

**Is-Isento

Por serem ineficazes nas plantas infetadas pelo fogo bacteriano e por existirem dúvidas e possíveis problemas quanto à interação entre vários produtos, as soluções químicas e biológicas são somente preventivas e só devem ser utilizadas no período da floração. No entanto, a estratégia de proteção passa por uma solução integrada das lutas cultural, química e biológica (Franco, 2013).

1.4 PLANTAS COM POTENCIAL ANTIBACTERIANO

A evolução do homem tem sido sempre acompanhada pelo conhecimento do valor terapêutico das plantas (Cunha *et al.*, 2007). O interesse pelo uso das plantas medicinais como complemento terapêutico compatível com a medicina clássica, tem aumentado no mundo ocidental (Cunha, 2009).

As plantas possuem numerosos constituintes de natureza química bem definida. Uma planta é medicinal quando esses constituintes químicos são farmacologicamente ativos, conferindo à planta a possibilidade de ser usada direta

ou indiretamente na terapêutica, com benefícios para o tratamento ou prevenção de uma patologia (Cunha *et al.*, 2007). Para além dos constituintes ativos, existem outros compostos que simultaneamente influenciam a ação dos constituintes ativos (Cunha *et al.*, 2007), os protegem de oxidações e hidrólises, facilitam a passagem de membranas ou inibem sistemas enzimáticos (Cunha *et al.*, 2006). Deste modo, é explicado o facto da ação de um extrato ou planta ter muitas vezes maior atividade do que a mesma quantidade de um dado constituinte ativo isolado (Cunha *et al.*, 2007).

Na natureza, a maioria das plantas é resistente aos diferentes agentes patogénicos. Esta resistência pode estar relacionada com a síntese natural de compostos químicos antimicrobianos (Lemos *et al.*, 1990 *cit. in* Knaak *et al.*, 2010). Nesse contexto, como exemplo, foram identificados óleos essenciais de plantas com ação antimicrobiana contra um grande número de bactérias, incluindo espécies resistentes aos antibióticos sintéticos (Knaak *et al.*, 2010).

De facto, os óleos essenciais podem controlar tanto bactérias, leveduras e fungos filamentosos (Bhavanani & Ballow, 1992 *cit. in* Sousa *et al.*, 2013; Prashar *et al.*, 2003 *cit. in* Knaak *et al.*, 2010; Cunha *et al.*, 2007). Além disso, esses compostos degradam-se mais rapidamente que os produtos sintéticos, e alguns óleos essenciais têm propriedades que favorecem os insetos benéficos (Pillmoor *et al.*, 1993 *cit. in* Knaak *et al.*, 2010).

Os óleos essenciais, metabolitos secundários voláteis caracterizados por serem misturas complexas de compostos orgânicos, têm sido cada vez mais estudados como antioxidantes e para o controlo de microrganismos, tornando-se importantes nas indústrias farmacêuticas, alimentícias, perfumaria e cosméticas. (Bhavanani & Ballow, 1992 *cit. in* Sousa *et al.*, 2013). A maior parte da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais deve-se aos compostos fenólicos (Simões & Spitzer, 2000 *cit. in* Sousa *et al.*, 2013), assim como à presença de monoterpenos, os quais também evidenciam atividade inseticida (Rice *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1997 *cit. in* Knaak *et al.*, 2010). Os monoterpenos interferem na dupla camada fosfolipídica da membrana celular, aumentando a permeabilidade celular e consequentemente a perda dos constituintes celulares, alteram diversos sistemas enzimáticos, afetando a produção da energia celular e síntese de componentes estruturais e ainda promovem a inativação ou destruição do material genético (Lambert *et al.*, 2001 *cit. in* Sousa *et al.*, 2013; Knaak *et al.*,

2010). Exemplos de compostos terpênicos, compostos majoritários dos óleos essenciais, os monoterpenos mais comuns são: linalol, geraniol, tujona, cânfora, limoneno. Já entre os sesquiterpenos mais comuns, encontram-se: farnesol, neurolidol, bisaboleno e outros (Simões *et al.*, 2003). Medice *et al.* (2007) verificaram num estudo sobre o uso de óleos essenciais no controlo da ferrugem asiática da soja, que os óleos de *Thymus vulgaris* L. (tomilho), *Corymbia citriodora* (Hook.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson (eucalipto-limão), *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle (citronela) e *Azadirachta indica* A. Juss. (nim) tiveram efeito direto na germinação de urediniosporos de *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. e reduziram a severidade da doença de plantas em estufa.

De acordo com Burt (2004) *cit. in* Knaak *et al.*, (2010), o timol e o carvacrol, presentes no óleo essencial de orégão, provocam distorção na estrutura física da célula, causando expansão e conseqüente instabilidade na membrana, modificando a sua permeabilidade, desnaturando enzimas essenciais, por meio de variações no pH e do potencial elétrico. Também Craveiro *et al.* (1981, *cit. in* Knaak *et al.* 2010), testando óleo de cravo-da-Índia, constatou que este apresenta excelentes propriedades bactericidas e o eugenol, componente majoritário encontrado em 80-90% no óleo essencial dessa planta, provoca inibição na produção de amilase e proteases pela célula bacteriana, bem como sua deterioração e lise (Knaak & Fiuza, 2010).

1.4.1 Efeito antibacteriano de plantas em estudo

1.4.1.1 Acacia dealbata

No que reporta ao efeito antibacteriano de *Acacia spp.*, Rahman *et al.* (2014) estudaram os extratos etanólicos e clorofórmicos das folhas da *Vachellia nilotica* (L.) P.J.H.Hurter & Mabb. (= *Acacia nilotica* (L.) [Willd.](#) ex [Delile](#)), obtendo uma actividade bacteriostática considerável em três estirpes de bactérias gram-negativas, *Escherichia coli* ([Migula](#)) [Castellani](#) & [Chalmers](#), *Klebsiella pneumoniae* (Schroeter) Trevisan e *Pseudomonas aeruginosa* (Schröter) [Migula](#).

1.4.1.2 *Allium sativum*

O alho (*Allium sativum* L.) tem sido, ao longo dos tempos, utilizado como estimulante, antissético, anti-helmíntico, anti-hipertensivo, carminativo, expetorante, diurético, antiasmático (Meriga *et al.*, 2012), antimicótico e antibacteriano (Cunha *et al.*, 2006)

Meriga *et al.* (2012) analisaram e comprovaram o efeito antibacteriano do alho sobre bactérias gram-negativas, nomeadamente *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*.

Segundo a Farmacopeia Portuguesa (2009) e Cunha *et al.* (2006), o alho é composto essencialmente por alicina, sulfóxidos de alquilcisteína, o que contribui para o seu efeito antissético.

1.4.1.3 *Cinnamomum camphora*

A cânfora possui elevadas percentagens de cineol, α -terpineol, D-cânfora (30 a 40%), safrol, mono e sesquiterpenos. Estes constituintes atribuem à planta efeito antissético (Cunha *et al.*, 2007).

1.4.1.4 *Eucalyptus globulus*

O eucalipto é constituído 1,5% a 3,5% por óleo essencial, com cerca de 70% de cineol ou eucaliptol, monoterpenos 25% (α -pineno, p-cimeno, limoneno, felandreno), butiraldeído, capronaldeído, azulenos, taninos, resina e flavonas derivadas do ácido ursólico (Cunha *et al.*, 2006).

Eucalyptus globulus Labill. tem sido, tradicionalmente, utilizado no tratamento de diversas doenças respiratórias, bronquite, tosse, inflamações orofaríngeas (Sherral & Warnke, 2004; Cunha *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2014) Os óleos essenciais de *E. globulus* e de *E. radiata* Siber ex D.C. demonstraram ter um elevado efeito antibacteriano em bactérias gram-negativas (Luís *et al.*, 2015).

1.4.1.5 *Laurus nobilis*

Constituído por cineol (40%), acetato de terpenilo (cerca de 10%), sabineno (7%), metil-eugenol (cerca de 10%), pinenos, 4-terpineol, linalol, p-cimeno, o loureiro possui atividades antissética e antifúngica (Cunha *et al.*, 2004).

Aumeeruddy-Elalfi *et al.* (2015) concluíram que os óleos essenciais das plantas de *Laurus nobilis* L., *Rosmarinus officinalis* L., entre outras, tiveram um efeito bactericida e bacteriostático sobre diversas bactérias gram-negativas: *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* Hauser e *Pseudomonas aeruginosa*.

1.4.1.6 *Origanum vulgare*

O orégão é constituído por óleos essenciais (0,2% a 1%), com predomínio de fenóis, cerca de 50% (timol e carvacrol), β -bisaboleno, cariofileno, p-cimeno, borneol, linalol, acetato de linalilo, α -pineno; β -pineno; α -tripeno, flavonoides (derivados do apigenol, luteolol, camperol, diosmetol), ácidos fenólicos, ésteres (cafeico, clorogénico, rosmarínico), taninos, constituintes amargos e triterpenos (Cunha *et al.*, 2006).

Os constituintes do orégão, principalmente o carvacrol e o timol, têm sido largamente estudados como antibacterianos e antifúngicos (Botre *et al.*, 2010; Kokoskoval *et al.*, 2011; Aumeeruddy-Elalfi *et al.*, 2015; Pesavento *et al.*, 2015).

1.4.1.7 *Ricinus communis*

O óleo obtido do rícino tem como componente principal o éster glicérico do ácido ricinoleico (80-90%), ésteres dos ácidos oleico, linoleico, esteárico e di-hidroxiesteárico, fitosteróis e tocoferóis (Cunha *et al.*, 2006).

Abew *et al.* (2014) realizaram um ensaio *in vitro* com o intuito de conhecerem o efeito do extrato das folhas de rícino sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* Rosenbach. Confirmaram o potencial antibacteriano do rícino em bactérias gram-negativas e gram-positivas, no entanto não descartaram a necessidade de um maior estudo sobre esta planta.

1.4.1.8 *Rosmarinus officinalis*

Inúmeros estudos indicam que as propriedades antissépticas e antibacterianas desta planta provêm do seu óleo essencial que contem, entre outros compostos, α -pineno, cânfora e eucaliptol (Bakkali *et al.*, 2008; Aumeeruddy-Elalfi *et al.*, 2015; Pesavento *et al.*, 2015). Esta planta também contém flavonoides (luteolina, apigenina, diosmetina), ácidos polifenólicos, derivados do ácido cafeico (ácido rosmarínico), taninos, constituintes amargos (carnosol e rosmanol) ácidos triterpênicos (ácido ursólico e betulínico), álcoois triterpênicos (α -amirina, β -amirina e betulina) (Cunha, *et al.*, 2006).

1.4.1.9 *Thymus mastichina* e *T. vulgaris*

A Farmacopeia Portuguesa VII (2009) indica para o óleo essencial de tomilho, proveniente de *Thymus vulgaris* L. ou *T. zizis* L., um teor de timol entre 36 e 55% e de carvacrol entre 1 e 4% (Cunha, 2004).

Especificamente, as plantas de *T. vulgaris* apresentam na sua constituição óleo essencial (1,0% a 2,5%) com predomínio de fenóis, timol e carvacrol e menores quantidades de geraniol, terpineol, linalol e monoterpenos não oxigenados, flavonoides derivados do apigenol e luteolol, ácidos fenólicos (cafeico, rosmarínico), taninos (10%), saponósidos triterpênicos de geninas dos ácidos ursólico e oleonólico (Cunha *et al.*, 2006; Bouzidi *et al.*, 2013).

Diversos autores consideram que as espécies de *Thymus* estão entre as plantas com maior potencial antimicrobiano devido essencialmente à sua actividade contra microorganismos patogénicos resistentes a antibióticos convencionais. A sua ação antibacteriana provém da capacidade que o timol e o carvacrol têm de permeabilizar e despolarizar a membrana citoplasmática de bactérias (Bouzidi *et al.*, 2013).

Al-Mariri & Swied (2013) concluíram que o o óleo essencial de *T. syriacus*, nomeadamente o timol, carvacrol, dihidro-carvona e linalol inibiam o desenvolvimento de algumas bactérias gram-negativas existentes na Síria.

O efeito antibacteriano dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* L., *T. vulgaris* e *Rosmarinus officinalis* sobre *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen, *Vibrio anguillarum* (Bergeman), *V. splendidus*

(Beijerinck) e *V. alginolyticus* (Miyamoto) Sakazaki foi constatado em ensaios *in vitro* e *in vivo* (Pesavento *et al.*, 2015).

1.4.2 Plantas com potencial antibacteriano sobre *Erwinia amylovora*

Kokoskoval *et al.* (2011) estudaram o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais de cinco plantas aromáticas da família *Lamiaceae* (*Origanum* spp., *Thymus* sp., *Melissa* sp., *Mentha* sp. e *Nepeta* sp.) em três estirpes diferentes de *Erwinia amylovora*. Constataram que os óleos essenciais de *O. compactum* Benth., *O. vulgare* e *T. vulgaris* eram eficazes no controlo da bactéria.

De facto, já em 1993, estudos elaborados por Mosch *et al.* demonstraram que o crescimento de *Erwinia amylovora* era inibido quando era adicionado extratos de *Rhus typhina* L., *Juglans nigra* L., *Berberis vulgaris* L., *Mahonia aquifolium* (Pursh) Nutt., *Allium sativum*, *Hedera helix* L. e *Viscum album* L. (Kokoskoval *et al.*, 2011).

Kokoskoval *et al.* (2011) constataram que o óleo essencial de *T. vulgaris* era um dos mais eficazes no controlo de bactérias, apresentando uma atividade antimicrobiana superior a 50%, quando comparada com a estreptomicina no controlo da *Erwinia amylovora*.

1.5 OBJETIVO

Considerando a inexistência de métodos completamente eficazes no controlo do fogo bacteriano, inclusive em agricultura biológica, este trabalho teve como objetivo principal avaliar o potencial biocida de diversas plantas, em relação a *Erwinia amylovora*.

O objetivo mais específico é avaliar o efeito *in vitro* sobre *E. amylovora* de:

- 1) extratos aquosos obtidos através de maceração de *Acacia dealbata*, *Allium sativum*, *Cinnamomum camphora*, *Eucalyptus globulus*, *Laurus nobilis*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus mastichina*, *T. vulgaris* e *Ricinus communis*;
- 2) óleos essenciais de *C. camphora*, *E. globulus*, *O. vulgare*, *R. officinalis*, *T. mastichina* e *T. vulgaris*.

Estas plantas foram incluídas neste estudo porque, por um lado, foi já demonstrada a sua atividade antibacteriana, por outro, são das espécies mais abundantes da flora portuguesa, com exceção da canforeira, constituindo uma fonte de matéria-prima acessível. Para além disso, o estudo do seu potencial biocida, valorizará um recurso endógeno que poderá constituir a base de uma alternativa eficaz, utilizável em Agricultura Biológica, para um problema economicamente importante tanto a nível nacional como internacional, como é o fogo bacteriano.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste trabalho pretendeu-se estudar o potencial antibacteriano de diversas plantas na forma de extrato aquoso por maceração, assim como de óleo essencial. A Tabela 7 resume a forma sob a qual as plantas foram utilizadas neste trabalho. Neste primeiro estudo, apenas foram estudados os óleos essenciais comercializados.

Em todas as experiências foram efetuadas seis repetições, para cada modalidade, assim como, para os respetivos controlos: utilizou-se estreptomicina, na concentração de 0,02%, como controlo positivo e a água destilada como controlo negativo.

Tabela 7: Plantas utilizadas no estudo do potencial antibacteriano sobre *Erwinia amylovora*.

Planta				
Nome científico	Nome vulgar	Família	Extrato por maceração	Óleo
<i>Acacia delbata</i>	mimosa	Fabaceae	X	
<i>Allium sativum</i>	alho	Amaryllidaceae	X	
<i>Cinnamomum camphora</i>	canforeira	Lauraceae	X	X
<i>Eucalyptus globulus</i>	eucalipto	Myrtaceae	X	X
<i>Laurus nobilis</i>	loureiro	Lauraceae	X	
<i>Origanum vulgare</i>	orégão	Lamiaceae	X	X
<i>Ricinus communis</i>	ricino	Euphorbiaceae		X
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Alecrim	Lamiaceae	X	X
<i>Thymus mastichina</i>	bela-luz	Lamiaceae	X	X
<i>Thymus vulgaris</i>	tomilho-vulgar	Lamiaceae	X	X

2.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS AQUOSOS POR MACERAÇÃO

O material vegetal da canforeira e do tomilho bela-luz foram recolhidos no jardim de Plantas Aromáticas e Medicinais da Escola Superior Agrária de Coimbra (ESAC), todo o restante material vegetal foi gentilmente cedido pela empresa Engisaúde, Lda., que desenvolve atividade numa exploração de produção de plantas medicinais e aromáticas, em conversão para modo biológico, situada na aldeia de Oliveira do Sul, freguesia de Sul, concelho de São Pedro do Sul, distrito de Viseu.

Os extratos aquosos foram preparados adaptando a metodologia utilizada por Martins et al. (2014), bem como da Farmacopeia Portuguesa (2009), onde é referido que o extrato por maceração é preparado utilizando água para extrair o composto ativo da planta seca que se encontra reduzida a pó.

As partes das plantas utilizadas para a obtenção dos extratos foram ramos e folhas visivelmente isentos de qualquer doença ou praga. O material vegetal foi seco, durante sete dias, num compartimento com condições controladas de temperatura a 25°C e humidade relativa inferior a 60%.

Primeiramente, para a preparação dos extratos de cada uma das plantas, a planta seca foi triturada, utilizando-se um moinho elétrico (Kenwood) durante 3 minutos. Posteriormente, foi preparada uma mistura constituída por 5 g de planta e 30 mL de água, que foi mantida em garrafas de vidro âmbar, à temperatura de 19°C no escuro. Após 24 horas, a mistura foi centrifugada (Hettich Universal 1200 centrifuge®) a 4800 rpm (Fig. 11), durante 5 minutos, filtrando-se de seguida o sobrenadante com um filtro Whatman n.º1® (Fig. 12).



Figura 11: Centrifugadora utilizada na preparação dos extratos aquosos das várias plantas.

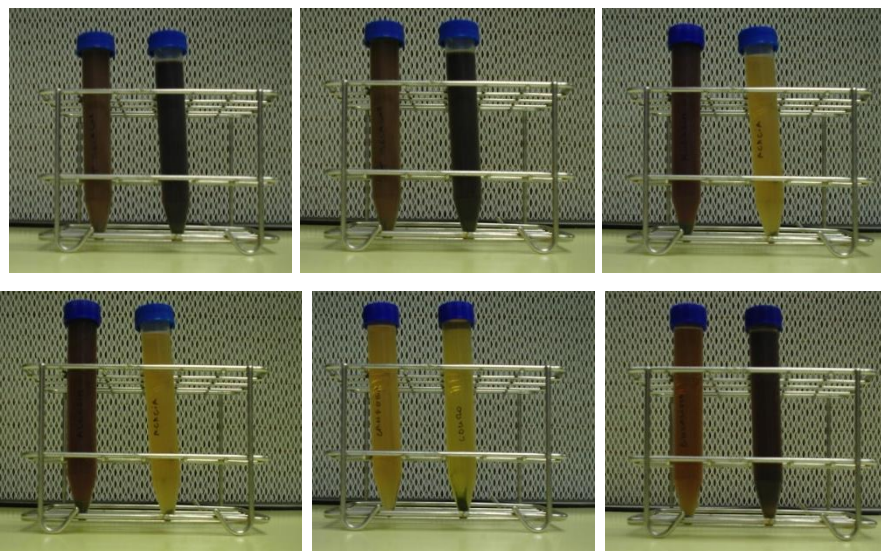


Figura 12: Extratos aquosos de várias plantas, após centrifugação e filtração.

Utilizando membranas de filtração (Filtros Fioroni, MCE Syring, 0,2 μm), o filtrado que constituiu o extrato foi esterilizado para tubos Eppendorf e armazenado num frigorífico a 4°C até utilização posterior (Fig. 13).



Figura 13: (a) membrana de filtração; (b) tubos Eppendorf com extratos esterilizados.

2.2 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais foram adquiridos a um distribuidor português, J. F. Campos – Comércio de Produtos Dietéticos. O óleo essencial de cânfora foi adquirido a um distribuidor francês, a Aroma-zone, e o óleo essencial do tomilho bela-luz foi gentilmente fornecido pela Prof. Doutora Fernanda Ferreira da ESAC.



Figura 14: Óleos essenciais utilizados no ensaio (a) *Cinnamomum camphora*; (b) *Thymus mastichina*; (c) *Origanum vulgare* e *T. vulgaris*; (d) *Rosmarinus officinalis*; (e) *Eucalyptus globulus*.

Tal como os extratos, os óleos essenciais foram esterilizados utilizando membranas de filtração, para tubos Eppendorf e armazenados num frigorífico a 4°C até utilização posterior. O mesmo procedimento foi seguido para a solução de estreptomicina na concentração de 0,02% e para a água destilada.



Figura 15: Tubos Eppendorf com os óleos essenciais de várias plantas.

2.3 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DA BACTÉRIA ERWINIA AMYLOVORA

A bactéria utilizada neste trabalho é uma estirpe portuguesa gentilmente cedida pelo Prof. Doutor João Pedro Luz da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

Sob condições de assepsia, a estirpe foi repicada e mantida em caixas de Petri em meio de King B num frigorífico a 4°C (Fig. 16).



Figura 16: Cultura de *Erwinia amylovora* em caixa de Petri com meio King B.

Para a realização das várias experiências, sempre que necessário, a bactéria foi repicada para novo meio, de modo a obter-se a cultura na fase lag de crescimento. O meio de cultura King-B foi preparado do seguinte modo: colocou-se um Erlenmeyer de 2 L com 500 mL de água destilada sobre uma placa de agitação com aquecimento. De seguida, adicionaram-se sequencialmente 15 g de ágar, 20 g proteose de peptona n.º 3, 1,5 g de K_2PO_4 , 1,5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e 10 mL de glicerina. Finalmente, com água destilada, perpez-se o volume final do meio pra 1 L (Figura 17). Após o pH do meio ter sido ajustado para 7, o meio foi esterilizado em autoclave, durante 15 minutos a $121^\circ C$. Distribuiu-se o meio por caixas de Petri descartáveis com 9 cm de diâmetro, tendo sido mantido no frigorífico a $4^\circ C$, até posterior utilização.



Figura 17: Preparação do meio de cultura King-B

2.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS PLANTAS

O efeito antibacteriano das plantas foi avaliado através de três metodologias:

- i. antibiograma, utilizado para avaliar o efeito de extratos e óleos das plantas;
- ii. determinação da concentração mínima inibitória (MIC) dos óleos essenciais que demonstraram atividade antibacteriana;
- iii. Determinação da concentração mínima bactericida (MBC) dos óleos essenciais em que se determinou a concentração mínima inibitória.

2.4.1 Antibiograma

Tendo por base os trabalhos de Kokoskoval *et al.* (2011), EPPO (2013) e Silva (2013), preparou-se uma suspensão-mãe com a concentração de 10^8 ufc.mL⁻¹ (Fig. 18).



Figura 18: Suspensão de bactérias

Sob condições de assepsia, as caixas de Petri com o meio King B foram inundadas com a suspensão-mãe, tendo o excesso sido posteriormente retirado com uma pipeta de Pasteur. Após a sementeira, em cada uma das caixas de Petri foram colocados, de forma a ficarem equidistantes entre si, quatro discos de papel de filtro previamente esterilizados, obtidos utilizando um furador de papel. Destes quatro discos de papel, um deles continha 20 μ L de água destilada esterilizada como controlo negativo, outro uma solução de estreptomicina de 0,02% como controlo positivo e os outros dois discos de papel uma gota de 20 μ L de cada um dos extratos ou dos óleos essenciais (Fig. 19). Foram realizadas seis repetições para cada extrato e óleo essencial.

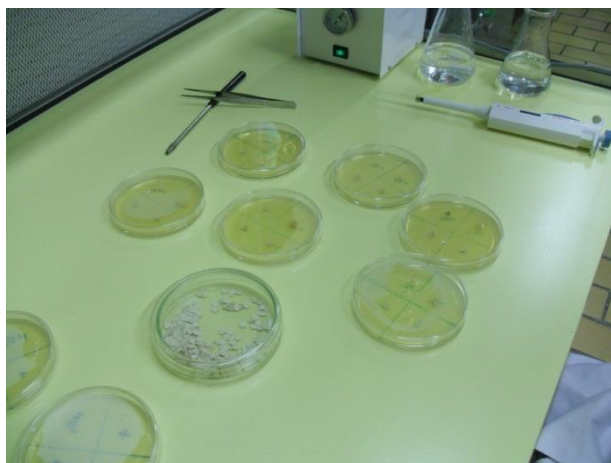


Figura 19: Preparação das caixas de Petri com meio de cultura King B para a realização dos antibiogramas.

Trinta e oito horas após a incubação a 25°C, foram medidos e registados os diâmetros dos halos de inibição dos extratos e dos óleos essenciais e respetivos controlos. De seguida, foram calculadas as médias e respetivos desvios-padrão.

A eficácia dos extratos e dos óleos vegetais foi determinada comparando os seus halos de inibição com o do controlo positivo.

Os resultados obtidos nos antibiogramas foram também avaliados de acordo com a fórmula proposta por Vancheva *et al.* (2015). Assim, foi calculado o índice da actividade antimicrobiana (IAA) utilizando a seguinte expressão:

$$IAA (\%) = \{-1 \times [(C-T)/(C+T)]\} \times 100$$

em que,

C – é a média da zona de inibição (mm) promovida pela estreptomicina

T – é a média da zona de inibição (mm) promovida pelo óleo essencial

2.4.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC)

Para os óleos essenciais que demonstraram ter efeito antibacteriano sobre *Erwinia amylovora* foi determinada a Concentração Mínima Inibitória (MIC), concentração mínima do óleo essencial para a qual não se observou crescimento da bactéria. Para a sua determinação recorreu-se ao procedimento interno de trabalho pelo método de suscetibilidade em microdiluição em caldo, definido pelo Prof. Doutor João Pedro Luz e Eng.^a Conceição Amaro na ESA-IPCB. Este

método implica o uso de volumes pequenos colocados em microplacas estéreis com 96 poços distribuídos como de seguida se demonstra e o uso de um indicador de oxidação-redução, a resazurina que se torna rosa quando é reduzido a “resorufina” por oxirredutases existentes no interior de células viáveis, permitindo a deteção de crescimento microbiano em volumes extremamente pequenos de solução sem a utilização de um espectrofotómetro (Sarker *et al.*, 2007).

Para a realização deste método foram utilizadas microplacas estéreis de 96 poços (Tissue Culture Testplates, orange Scientific, 96 Wells Flat, USA), de fundo plano e tampa.

Inicialmente procedeu-se às marcações na placa, identificando cada coluna de 1 a 9. A décima coluna correspondia ao controlo positivo, sem óleo essencial, e a décima primeira coluna ao controlo negativo, sem inóculo bacteriano.

Assim, com uma micropipeta, foram colocados meio de cultura em cada um dos poços. O meio de cultura utilizado foi o caldo nutritivo, com base no ensaio elaborado por Mihajilov-Krstev *et al.* (2010). Tendo em conta que o Tween 80 ajuda à dispersão dos óleos, ao caldo nutritivo foi adicionado Tween 80 numa concentração de 0,8% (Groppo *et al.*, 2002).

No primeiro poço de cada linha colocaram-se 263 μL e nos seguintes (do 2.º ao 9.º) 140 μL de meio de cultura (Fig. 20).

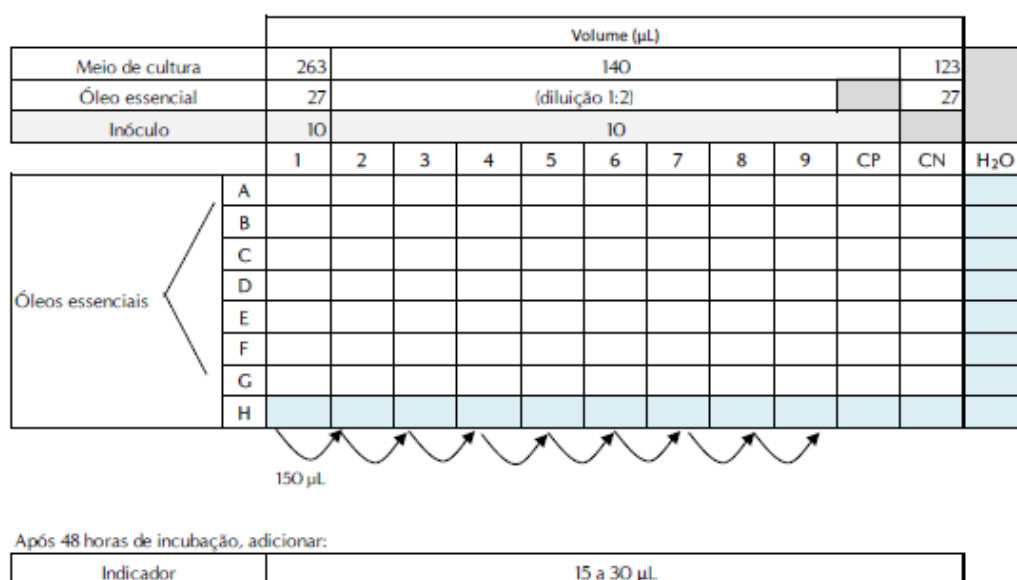


Figura 20: Esquema do teste de microdiluição em microplaca para determinação da MIC.

Neste ensaio colocaram-se 27 μL de óleo no 1.^o poço e homogeneizou-se por pipetagem. As diluições procederam-se retirando-se 150 μL do primeiro poço para o segundo poço e homogeneizando-se. Procedeu-se de igual modo nos poços seguintes. Este procedimento foi repetido para cada um dos tipos de óleos, sendo que cada óleo ocupou uma linha distinta.

Posteriormente inoculou-se cada poço com 10 μL da suspensão bacteriana de *E. amylovora*, na concentração de 10^8 ufc mL^{-1} para que a concentração final fosse na ordem de 10^6 ufc mL^{-1} . Nos poços correspondentes ao controlo positivo (CP) colocaram-se 140 μL de meio de cultura e 10 μL de inóculo bacteriano. Nos poços correspondentes ao controlo negativo (CN) colocaram-se 123 μL de meio de cultura e 27 μL do respetivo óleo. Preencheram-se depois, com água destilada esterilizada, todos os poços não ocupados no teste para criar um ambiente húmido. Posteriormente a placa foi colocada num agitador de placas apropriado, a 300 rpm, durante 20 segundos para homogeneizar, e de seguida foi incubada a 25°C (Fig. 21).

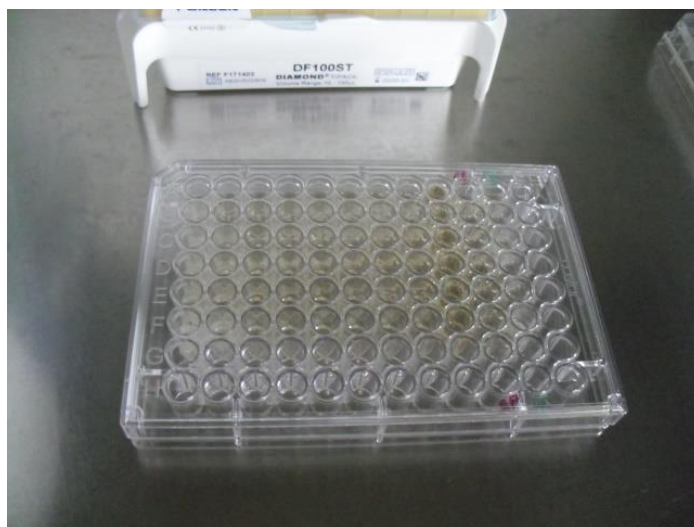


Figura 21: Microplaca de microdiluição pronta para incubar

A leitura dos resultados foi efetuado 48 horas após a incubação, tendo-se observado a turvação nos poços. De modo a confirmar os resultados, de seguida adicionaram-se 30 μL de solução de resazurina a 0,01% em cada poço (Fig. 22a) e reincubaram-se as placas durante 4 horas (Fig. 22b).

Neste ensaio recorreu-se à Resazurina tablets (BDH, marca Merck). A resazurina foi preparada diluindo uma tablete em 25 mL de água destilada,

obtendo-se assim a concentração pretendida de 0,01%. Posteriormente o indicador foi esterilizado por filtração e mantido em ambiente escuro, num frasco âmbar ou envolto em papel de alumínio.

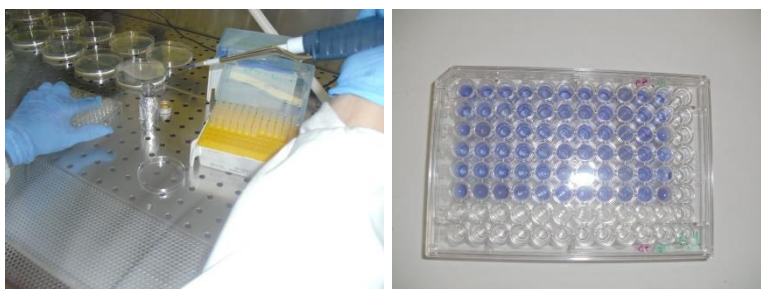


Figura 22: a) Adição de 30 μ L de solução de resazurina a 0,01; b) poços todos preenchidos com a resazurina pronta para incubar até 4 horas.

Os valores da MIC são determinados pela leitura após revelação com resazurina, por comparação com os controlos positivos e negativo. A alteração de cor azul para rosa indica que ocorreu crescimento bacteriano. A MIC será a concentração do óleo existente na diluição mais elevada que não apresentou crescimento microbiano. Por forma a validar os resultados, foram efetuadas seis repetições do ensaio.

2.4.3 Concentração Mínima Bactericida (MBC)

Considerou-se a MBC a menor concentração que não apresentava crescimento visível, depois das placas terem sido incubadas a 25°C, durante 48 horas. A MBC é definida como a menor concentração de óleo essencial requerida para matar 99,9% das células bacterianas.

Assim sendo, antes da colocação da resazurina, 5 μ L do conteúdo de cada um dos poços foi colocado, em placas de agar nutritivo Mueller-Hinton. As placas de Petri foram divididas em pequenos quadrados, os quais foram identificados com a letra e o número correspondente ao poço do qual foi retirado o conteúdo (meio de cultura + óleo essencial + suspensão bacteriana) (Fig. 23).

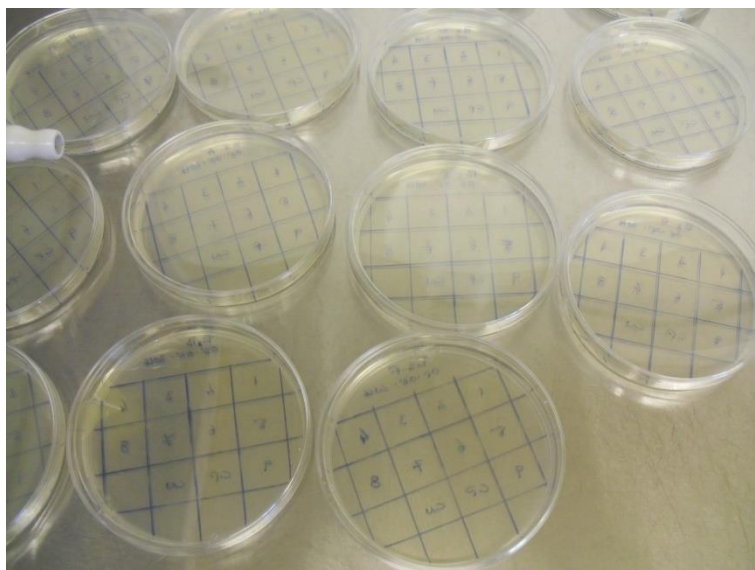


Figura 23: Placas identificadas com a letra e o número correspondente ao poço do qual foi retirado o conteúdo.



Figura 24: Colocação de 10 μL de inóculo retirado de cada poço da microplaca em placas de agar nutritivo para determinar a MBC.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise dos dados, utilizou-se o programa SPSS, versão 23 (SPSS, Inc. Chicago, Illinois, USA). Foi realizada análise estatística descritiva em relação aos halos de inibição de cada planta em comparação com o antibiótico atualmente existente, a estreptomicina (controlo positivo).

Os resultados obtidos foram posteriormente submetidos a uma análise da variância, recorrendo-se ao teste t de Student relacionado ou emparelhado, de forma a verificar se as variáveis apresentavam diferenças estatisticamente significativas ($p=0,05$) entre as plantas estudadas, o controlo positivo (estreptomicina) e o controlo negativo (água destilada).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ANTIBIOGRAMA

Das plantas estudadas, todos os óleos essenciais apresentaram efeito antibacteriano, em relação a *Erwinia amylovora*. O mesmo foi observado no controlo positivo, o antibiótico estreptomicina (0,02%), conforme esperado.

Todavia, os extratos aquosos das plantas estudadas, na concentração de 5 g de planta seca/30 mL, não tiveram efeito antibacteriano na bactéria, tendo apresentado comportamento semelhante ao controlo negativo, água destilada esterilizada.

Os resultados da atividade antibacteriana contra *E. amylovora*, traduzem-se nas medições dos halos de inibição observados (Fig. 25) pela medida do diâmetro da zona de inibição para os diferentes extratos/óleos essenciais (OE) das plantas estudadas. Estes resultados são apresentados na Tabela 8.

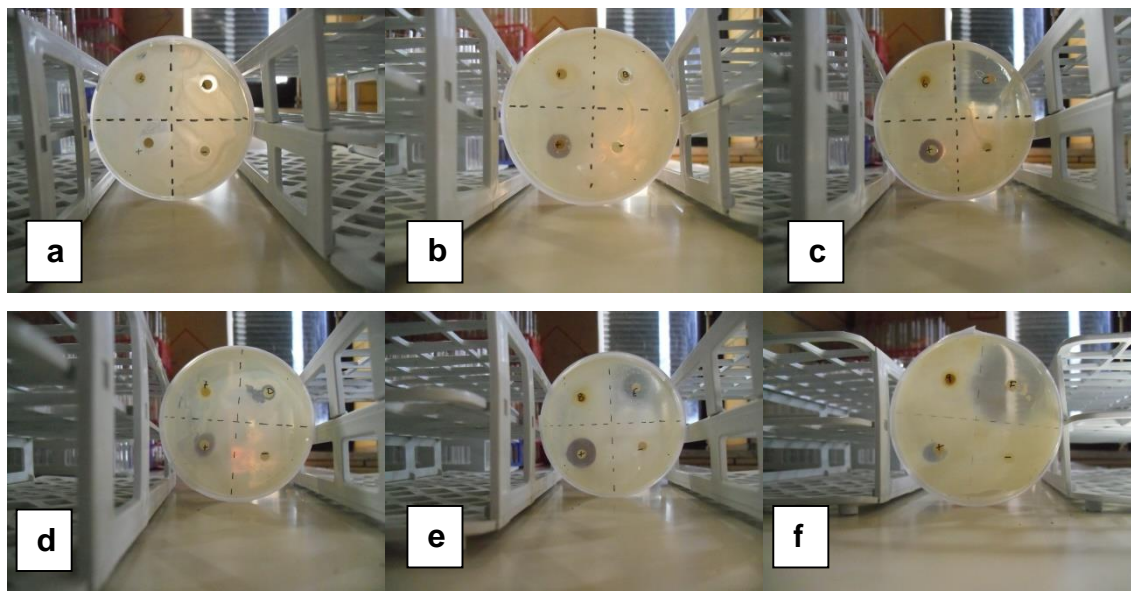


Figura 25: Antibiogramas em que se pode observar os halos de inibição, em relação a *Erwinia amylovora*, dos óleos essenciais de (a) *Cinammomum camphora*; (b) *Eucalyptus globulus*; (c) *Origanum vulgare*; (d) *Rosmarinus officinalis*; (e) *Thymus mastichina* e (f) *T. vulgaris*. Os extratos das mesmas plantas (representados pelos respetivos números), o antibiótico estreptomicina (0,02%) (controlo positivo) e água destilada esterilizada (controlo negativo).

Tabela 8: Halos de inibição (cm) observados em antibiogramas, das várias plantas em estudo (extrato aquoso e óleos essenciais) em relação a *Erwinia amylovora*, comparativamente ao controlo positivo, estreptomicina, e ao controlo negativo, água destilada esterilizada.

Planta	Óleo (cm)	Extrato (cm)	Controlo positivo: Estreptomicina (cm)	Controlo negativo: água destilada esterilizada (cm)
<i>Acacia dealbata</i>	Não testado	n.d.	1,60±0,580	n.d.
<i>Allium sativum</i>	Não testado	n.d.	1,60±0,580	n.d.
<i>Cinnamomum camphora</i>	0,92±0,360 a)	n.d.	1,55±0,745 b)	n.d.
<i>Eucalyptus globulus</i>	1,07±0,266 a)	n.d.	1,42±0,279 a)	n.d.
<i>Laurus nobilis</i>	Não testado	n.d.	2,08±0,264	n.d.
<i>Origanum vulgare</i>	3,33±1,633 a)	n.d.	1,77±1,294 b)	n.d.
<i>Ricinus cominis</i>	n.d	Não testado	1,00±1,112	n.d.
<i>Rosmarinus officinalis</i>	2,37±1,227 a)	n.d.	1,40±0,518 a)	n.d.
<i>Thymus mastichina</i>	2,58±0,736 a)	n.d.	2,18±0,204 a)	n.d.
<i>Thymus vulgaris</i>	3,17±2,562 a)	n.d.	1,13±0,920 b)	n.d.

Os valores apresentados são médias de 6 repetições.

n.d. – Valor de halo de inibição não detetável

Para cada planta, letras diferentes para os valores dos halos de inibição do óleo e da estreptomicina indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Os óleos que evidenciaram um efeito bactericida mais relevante foram os de *Origanum vulgare* com um halo de inibição de 3,33 cm, seguido de *Thymus vulgaris* com um halo de inibição de 3,17 cm, de *T. mastichina* 2,58 cm e de *Rosmarinus officinalis* 2,37 cm. É de salientar que os halos de inibição observados para os óleos essenciais das plantas atrás referidas foram maiores do que os observados para a estreptomicina colocada em cada uma das caixas de Petri, possibilitando uma comparação mais rigorosa com o controlo positivo.

Tendo em consideração as informações retiradas da análise estatística dos resultados, pode considerar-se que os OE de *Eucalyptus globulus* (eucalipto), de *R. officinalis* (alecrim) e de *T. mastichina* (tomilho-bela-luz) tiveram um efeito comparável ao da estreptomicina; por outro lado os OE de *Cinnamomum camphora* (cânfora), de *O. vulgare* (orégão) e de *T. vulgaris* (tomilho-vulgar) apresentaram comportamento significativamente diferente do da estreptomicina, tendo a cânfora tido um menor efeito bactericida do que a estreptomicina, ao contrário do orégão e do tomilho-vulgar que apresentaram um efeito bactericida superior ao da estreptomicina.

De facto, analisando os dados obtidos, verifica-se que os valores dos níveis de significância, no teste de amostras emparelhadas [Sig. (2-tailed)] dos OE de *C. camphora* (cânfora), de *O. vulgare* (orégão) e de *T. vulgaris* (tomilho-vulgar) são de 0,031, 0,026 e 0,041 respetivamente, todos eles $p < 0,05$, logo, pode-se dizer, com 95% de confiança, que existem diferenças significativas entre a média do halo de inibição desses mesmos OE e a média do halo de inibição da estreptomicina. No que reporta a *E. globulus* (eucalipto), a *R. officinalis* (alecrim) e a *T. mastichina* (tomilho-bela-luz), observa-se que os níveis de significância no teste de amostras emparelhadas [Sig. (2-tailed)], para cada um destes óleos têm, respetivamente, os valores de 0,137, 0,110 e 0,224, todos eles $p > 0,05$, logo, pode-se dizer, com 95% de confiança, que não existem diferenças significativas entre as médias dos halos de inibição destes óleos e a média do halo de inibição da estreptomicina.

Os IAA (índices de atividade antimicrobiana) dos óleos calculados, utilizando a expressão proposta por Vancheva *et al.* (2015), encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9: Índice da atividade antimicrobiana (IAA) dos óleos essenciais das plantas em estudo em relação a *Erwinia amylovora*.

Óleo essencial	IAA (%)
<i>Cinnamomum camphora</i>	-25,8
<i>Eucalyptus globulus</i>	-14,1
<i>Origanum vulgare</i>	30,7
<i>Rosmarinus officinalis</i>	25,7
<i>Thymus mastichina</i>	8,4
<i>Thymus vulgaris</i>	47,3

Assim, é evidenciado que, tendo apresentado efeito bactericida em relação a *E. amylovora*, os óleos de *C. camphora* e de *E. globulus* tiveram um efeito inferior ao da estreptomicina. Contudo, destaca-se que os restantes óleos tiveram um efeito superior ao da estreptomicina, tendo os IAA para *T. vulgaris* sido superior em 47,3%, para *O. vulgare* 30,7%, para *R. officinalis* 25,7% e para *T. mastichina* 8,4%.

Vários estudos evidenciaram o efeito antibacteriano de óleos essenciais, nomeadamente em relação a *E. amylovora*. No estudo efetuado por Kokoskova *et al.* (2011), verificou-se que os valores dos halos de inibição de crescimento desta

bactéria obtidos para os OE de *T. vulgaris* e de *O. vulgare* foram, respetivamente, $28,11 \pm 10,71$ mm e $21,39 \pm 5,10$ mm, valores estes superiores aos apresentados pela estreptomicina a 0,02%, $7,78 \pm 3,62$ mm. Num outro estudo com *T. vulgaris*, Karami-Osboo *et al.* (2010) também obtiveram um halo de inibição de 25 mm, comprovando o efeito antibacteriano desta planta sobre a bactéria causadora do fogo bacteriano. Estes autores aprofundaram o estudo e concluíram que o efeito antibacteriano provinha do carvacrol e do timol presentes no óleo essencial desta planta. Assim, estes resultados são concordantes com os obtidos no estudo aqui apresentado, em que o halo de inibição de *T. vulgaris* foi de 3,17 cm. Kokoskova *et al.* (2011) também constataram que o óleo essencial de *T. vulgaris* era um dos mais eficazes no controlo de bactérias, apresentando uma atividade antimicrobiana superior a 50%, quando comparada com a estreptomicina no controlo de *E. amylovora*. No estudo aqui apresentado, o IAA para esta planta foi comparável, 47,23%.

De facto, diversos autores consideram que as espécies do género *Thymus* estão entre as plantas com maior potencial antimicrobiano devido essencialmente à sua atividade contra microrganismos patogénicos resistentes a antibióticos convencionais. A sua ação antibacteriana provém da capacidade que o timol e o carvacrol têm de permeabilizar e despolarizar a membrana citoplasmática de bactérias (Bouzidi *et al.*, 2013). Para além do timol e do carvacrol, Al-Mariri & Swied (2013) concluíram que os compostos dihydro-carvona e linalol do óleo essencial de *T. syriacus* também inibiam o desenvolvimento de algumas bactérias gram-negativas existentes na Síria.

Pesavento *et al.* (2015), para além de *T. vulgaris* estudou também o efeito antibacteriano de *O. vulgare* e de *R. officinalis* sobre bactérias gram-negativas tendo constatado que os três óleos essenciais inibiam o crescimento bacteriano, tendo o maior halo de inibição sido apresentado por *T. vulgaris*, seguido de *O. vulgare* e por fim de *R. officinalis*. No estudo aqui apresentado, analisando os valores dos halos de inibição, verifica-se que o que apresentou maior valor foi *O. vulgare*, seguido de um valor muito próximo de *T. vulgaris* e de *R. officinalis*. No entanto, se considerarmos os valores do IAA, o OE que teve um valor superior foi o de *T. vulgaris*, seguido do de *O. vulgare* e do de *R. officinalis*. Num próximo estudo, dever-se-á colocar em cada caixa de Petri discos impregnados com OE

das várias plantas e da estreptomicina, de modo a conseguir-se confirmar os resultados obtidos.

Pereira *et al.* (2014), após a análise do efeito antibacteriano do óleo essencial e dos extratos de *E. globulus* sobre *Pseudomonas aeruginosa*, verificaram que alguns extratos e óleos essenciais obtiveram um efeito inibitório significativo do crescimento da bactéria. Já Harkat-Madouri *et al.* (2015) verificaram que o óleo essencial de *E. globulus* inibia o crescimento de seis bactérias gram-negativas e de seis bactérias gram-positivas. Também neste estudo se verificou o efeito desta planta em relação a *E. amylovora*.

Cunha *et al.* (2007) considerou que um dos efeitos mais importantes dos OE é a ação antisséptica sobre bactérias patogénicas, fungos e leveduras. Para além do tomilho, a cânfora, alfazema, canela, cravinho e o eucalipto estão dotados desta ação.

3.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (MIC)

Andrews (2001) define a concentração mínima inibitória como a concentração mínima de um agente antimicrobiano capaz de inibir o crescimento dos microorganismos, após um período de incubação de 18-24 horas. Este método é usualmente considerado uma ferramenta fundamental para a determinação do perfil de suscetibilidade dos microorganismos aos agentes antimicrobianos. Utiliza um meio líquido e, através de diluições sucessivas, determina-se a concentração mínima do composto que inibe o crescimento bacteriano.

Na Fig. 26 apresentam-se os resultados obtidos na determinação da MIC dos OE das plantas em estudo que no antibiograma inibiram o crescimento da bactéria *Erwinia amylovora*.

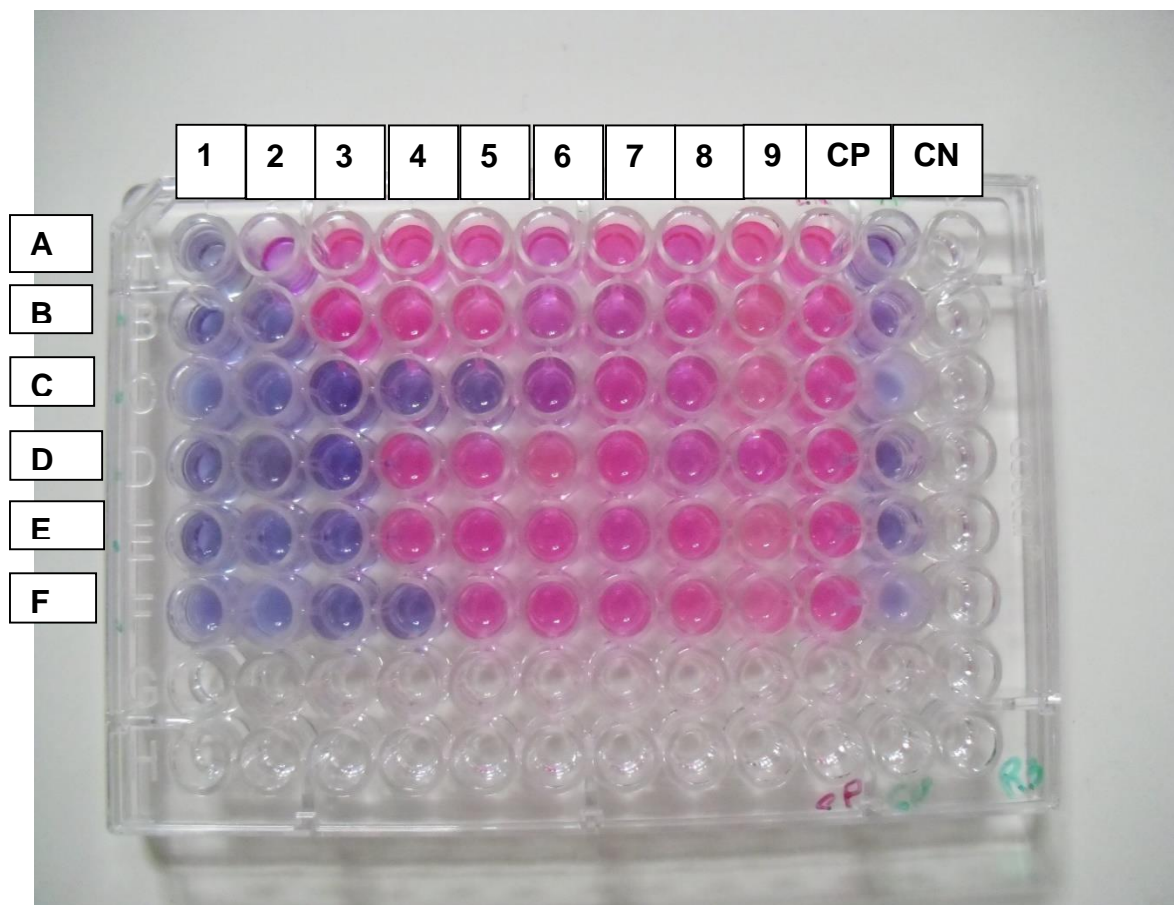


Figura 26: Resultados obtidos na determinação da concentração mínima inibitória (MIC) dos óleos essenciais de *Cinnamomum camphora* (A), *Eucalyptus globulus* (B), *Origanum vulgare* (C), *Rosmaninus officinalis* (D), *Thymus mastichina* (E) e *T. vulgaris* (F) em relação a *Erwinia amylovora*.

Rosa – com desenvolvimento bacteriano; o OE não inibiu o crescimento bacteriano;

Azul – sem desenvolvimento bacteriano; o OE inibiu o crescimento bacteriano.

CP: Controlo positivo: meio de cultura + inóculo bacteriano;

CN: Controlo negativo: meio de cultura + OE

De modo a facilitar a análise dos resultados, na Tabela 10 encontram-se as concentrações dos OE utilizadas em cada um dos poços.

Tabela 10: Quantidade de óleo essencial (μL óleo/mL de meio) administrados em cada um dos poços para a determinação das Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI) em relação a *Erwinia amylovora*

Poço n.º	Quantidade de óleo no poço ($\mu\text{L}/\text{mL}$)
1	86,90
2	44,95
3	23,25
4	12,03
5	6,22
6	3,22
7	1,66
8	0,86
9	0,45

Nas Tabelas 11 a 16, encontram-se apresentados os valores obtidos para as MIC para cada um dos OE que no ensaio inicial apresentaram efeito inibitório do crescimento da *E. amylovora*.

Analisando a Tabela 11, verifica-se que, quando se transferiu o conteúdo de cada um dos poços para placas de Petri, das seis repetições efetuadas, apenas a concentração 86,90 µL/mL do OE de *Cinnamomum camphora* inibiu o crescimento da bactéria, tendo-se observado esta inibição em quatro das seis repetições efetuadas.

Tabela 11: Valores de concentração mínima inibitória (MIC) de *Cinnamomum camphora* em relação a *Erwinia amylovora*.

	Poço 1	Poço 2	Poço 3	Poço 4	Poço 5	Poço 6	Poço 7	Poço 8	Poço 9	CP	CN
Ensaio 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Ensaio 2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Ensaio 3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Ensaio 4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Ensaio 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Ensaio 6	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

(+): inibição de crescimento de *E. amylovora*;

(-): não observada inibição de crescimento de *E. amylovora*.

CP: Controlo positivo: meio de cultura + inóculo bacteriano;

CN: Controlo negativo: meio de cultura + OE

Relativamente ao OE de *Eucalyptus globulus*, constatou-se que a inibição do crescimento bacteriano ocorreu em todas as repetições, na concentração de 86,90 µL/mL, no entanto, em duas repetições essa inibição também ocorreu na concentração de 44,95 µL/mL (Tabela 12).

Tabela 12: Avaliação da concentração mínima inibitória (MIC) do óleo de *Eucalyptus globulus* em relação a *Erwinia amylovora*.

	Poço 1	Poço 2	Poço 3	Poço 4	Poço 5	Poço 6	Poço 7	Poço 8	Poço 9	CP	CN
Ensaio 1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Ensaio 2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Ensaio 3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Ensaio 4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Ensaio 5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Ensaio 6	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

(+): inibição de crescimento de *E. amylovora*;

(-): não observada inibição de crescimento de *E. amylovora*.

CP: Controlo positivo: meio de cultura + inóculo bacteriano;

CN: Controlo negativo: meio de cultura + OE

O OE de *Origanum vulgare*, de um modo geral, teve um efeito inibitório superior no crescimento de *E. amylovora* ao dos OE das duas plantas anteriores. Na primeira repetição, observou-se inibição do crescimento da bactéria até à concentração de 3,22 µL/mL, nas segunda e terceira verificou-se inibição até à concentração 6,22 µL/mL. No entanto, nas repetições 4 e 6 essa inibição só ocorreu à concentração de 44,95 µL/mL e na repetição 5 só na concentração de 86,90 µL/mL (Tabela 13).

Tabela 13: Avaliação da concentração mínima inibitória (MIC) do óleo essencial de *Origanum vulgare* em relação a *Erwinia amylovora*.

	Poço 1	Poço 2	Poço 3	Poço 4	Poço 5	Poço 6	Poço 7	Poço 8	Poço 9	CP	CN
Ensaio 1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
Ensaio 2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
Ensaio 3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
Ensaio 4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Ensaio 5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Ensaio 6	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+

(+): inibição de crescimento de *E. amylovora*;

(-): não observada inibição de crescimento de *E. amylovora*.

CP: Controlo positivo: meio de cultura + inóculo bacteriano;

CN: Controlo negativo: meio de cultura + OE

No caso do OE de *Rosmarinus officinalis*, a inibição do crescimento bacteriano ocorreu à concentração de 23,25 µL/mL nas repetições 1, 3, 4 e 6. Na repetição 2 a inibição de crescimento observou-se à concentração de 12,03 µL/mL, enquanto que na repetição 5 apenas foi observada na concentração de 44,95 µL/mL (Tabela 14).

Tabela 14: Avaliação da concentração mínima inibitória (MIC) do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* em relação a *Erwinia amylovora*.

	Poço 1	Poço 2	Poço 3	Poço 4	Poço 5	Poço 6	Poço 7	Poço 8	Poço 9	CP	CN
Ensaio 1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Ensaio 2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
Ensaio 3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Ensaio 4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Ensaio 5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Ensaio 6	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+

(+): inibição de crescimento de *E. amylovora*;

(-): não observada inibição de crescimento de *E. amylovora*.

CP: Controlo positivo: meio de cultura + inóculo bacteriano;

CN: Controlo negativo: meio de cultura + OE

O efeito inibitório do OE de *Thymus mastichina* foi observado em todas as repetições nas concentrações de 86,90 e de 44,95 µL/mL, tendo-se ainda observado na concentração de 6,03 µL/mL, contudo, apenas na repetição 2 (Tabela 15).

Tabela 15: Avaliação da concentração mínima inibitória (MIC) do óleo essencial de *Thymus mastichina* em relação a *Erwinia amylovora*.

	Poço 1	Poço 2	Poço 3	Poço 4	Poço 5	Poço 6	Poço 7	Poço 8	Poço 9	CP	CN
Ensaio 1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Ensaio 2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
Ensaio 3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Ensaio 4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Ensaio 5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Ensaio 6	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+

(+): inibição de crescimento de *E. amylovora*;

(-): não observada inibição de crescimento de *E. amylovora*.

CP: Controlo positivo: meio de cultura + inóculo bacteriano;

CN: Controlo negativo: meio de cultura + OE

O OE de *T. vulgaris* apresentou um comportamento muito semelhante ao de *O. vulgare*. O OE *T. vulgaris* inibiu o crescimento bacteriano até à concentração de 44,95 µL/mL em todas as repetições. Na primeira repetição obteve-se o maior efeito inibitório, tendo inibido o crescimento da bactéria até à concentração de 1,66 µL/mL. Na segunda repetição, ocorreu inibição até à concentração de 6,22 µL/mL, no terceiro ensaio inibiu até à concentração de 12,03 µL/mL (Tabela 16).

Tabela 16: Avaliação da concentração mínima inibitória (MIC) do óleo essencial de *Thymus vulgaris* em relação a *Erwinia amylovora*.

	Poço 1	Poço 2	Poço 3	Poço 4	Poço 5	Poço 6	Poço 7	Poço 8	Poço 9	CP	CN
Ensaio 1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
Ensaio 2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
Ensaio 3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
Ensaio 4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Ensaio 5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Ensaio 6	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+

(+): inibição de crescimento de *E. amylovora*;

(-): não observada inibição de crescimento de *E. amylovora*.

CP: Controlo positivo: meio de cultura + inóculo bacteriano;

CN: Controlo negativo: meio de cultura + OE

Em suma, e de um modo geral, após a observação das microplacas, verifica-se que todos os OE inibiram o crescimento da bactéria *E. amylovora* no poço 1, ou seja, na concentração de 86,90 µL/mL. Esta foi a única concentração inibitória para *C. camphora* (cânfora) e para *E. globulus*, eucalipto.

Harkat-Madouri *et al.* (2015), no seu ensaio verificaram que as bactérias gram-negativas eram muito sensíveis ao OE de *E. globulus* tendo obtido MIC a variar entre 0,28 a 9,13 µL/mL, dependendo das bactérias estudadas. No entanto, no estudo aqui apresentado a MIC para *E. amylovora* foi superior, tendo a concentração de 44,95 µL/mL inibido o crescimento apenas em duas repetições.

O OE de *O. vulgare* (oregão) inibiu o crescimento bacteriano nas cinco repetições na concentração de 44,95 µL/mL. Este valor é bastante mais elevado do que o obtido no estudo de Pesavento *et al.* (2015), que constatou que o OE desta planta inibia o crescimento das de outras bactérias gram-negativas numa concentração de 0,125 µL/mL.

O OE de *R. officinalis* (alecrim) inibiu o crescimento da bactéria em todas as repetições até à concentração 44,95 µL/mL tendo havido inibição do crescimento em cinco repetições na concentração de 12,03 µL/mL. No estudo de Pesavento *et al.* (2015), o valor da MIC do OE de *R. officinalis* para bactérias gram-negativas foi de 0,5 µL/mL.

No caso dos OE de *T. mastichina* (tomilho-bela-luz) e de *T. vulgaris* (tomilho-vulgar, considerando a totalidade das seis repetições, pode dizer-se que a MIC foi de 44,95 µL/mL, à semelhança do que se observou para o OE de *R. officinalis*. No entanto, salienta-se o facto do OE de *T. vulgaris* ter sido o que apresentou menor MIC, 3,22 µL/mL, assim como o OE de *O. vulgare*, tendo os OE destas duas plantas apresentado resultados semelhantes.

Pesavento *et al.* (2015) verificaram que o OE de *T. vulgaris* tinha um elevado efeito bactericida noutras bactérias gram-negativas, tendo a MIC inferior sido 0,5 µL/mL.

3.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA BACTERICIDA (MBC)

No que reporta à determinação da concentração mínima bactericida (MBC), após 24h verificou-se que os OE apresentavam efeitos bactericidas nas concentrações em que inibiram o desenvolvimento de *Erwinia amylovora*.

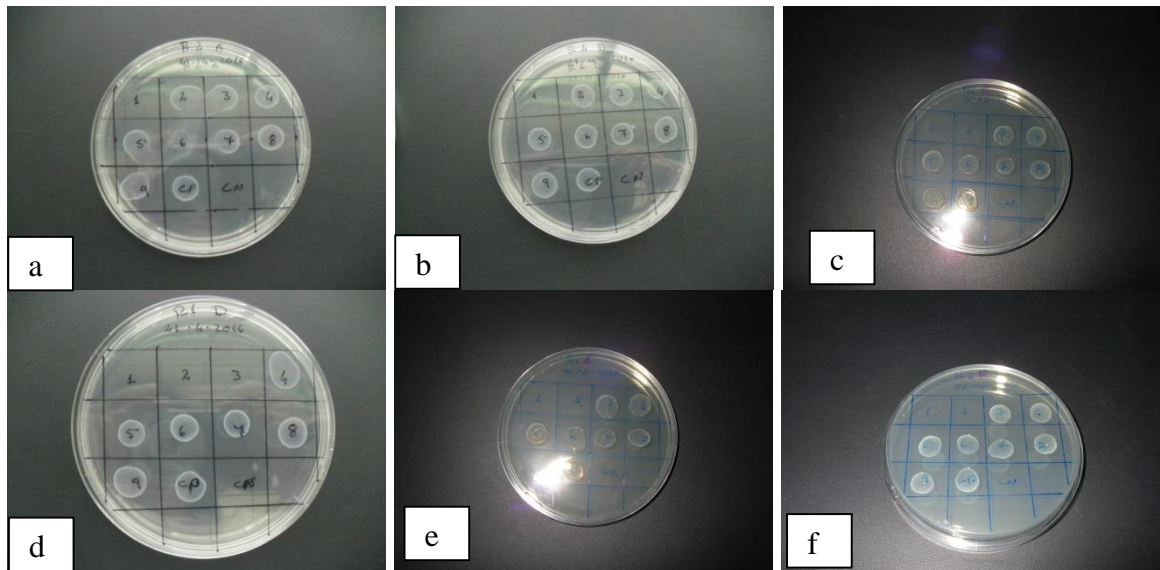


Figura 27: Alguns resultados obtidos na determinação da concentração mínima bactericida (MBC) dos óleos essenciais de *Cinnamomum camphora* (a), *Eucalyptus globulus* (b), *Origanum vulgare* (c), *Rosmaninus officinalis* (d), *Thymus mastichina* (e) e *T. vulgaris* (f) em relação a *Erwinia amylovora*.

A presença de mancha branca indica existência de desenvolvimento da bactéria

CP: Controlo positivo: meio de cultura + inóculo bacteriano;

CN: Controlo negativo: meio de cultura + OE

Analisando a Tabela 17, verifica-se que não houve crescimento da bactéria da suspensão retirada do poço 1, com exceção da primeira repetição. Estes resultados confirmaram o que se observou anteriormente quando se determinou a MIC. Assim, considera-se que a CMB do OE de *Cinnamomum camphora* é de 86,90 $\mu\text{L/mL}$.

Tabela 17: Avaliação da concentração mínima bactericida (MBC) do óleo essencial de *Cinnamomum camphora* em relação a *Erwinia amylovora*.

	Poço 1	Poço 2	Poço 3	Poço 4	Poço 5	Poço 6	Poço 7	Poço 8	Poço 9	CP	CN
Ensaio 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Ensaio 2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Ensaio 3	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Ensaio 4	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Ensaio 5	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Ensaio 6	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

(+): houve crescimento de *E. amylovora*

(-): não houve crescimento de *E. amylovora*.

CP: Controlo positivo: meio de cultura + inóculo bacteriano;

CN: Controlo negativo: meio de cultura + OE

No que respeita ao OE de *Eucalyptus globulus*, constatou-se que não houve crescimento bacteriano na concentração de 86,90 µL/mL, em qualquer das seis repetições, tal como o observado aquando da determinação da MIC. Também não houve crescimento bacteriano em duas repetições na concentração de 44,95 µL/mL. Deste modo, considera-se que a CMB é de 86,9 µL/mL (Tabela 18).

Tabela 18: Avaliação da concentração mínima bactericida (MBC) do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*, em relação a *Erwinia amylovora*

	Poço 1	Poço 2	Poço 3	Poço 4	Poço 5	Poço 6	Poço 7	Poço 8	Poço 9	CP	CN
Ensaio 1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Ensaio 2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Ensaio 3	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Ensaio 4	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Ensaio 5	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Ensaio 6	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

(+): houve crescimento de *E. amylovora*

(-): não houve crescimento de *E. amylovora*.

CP: Controlo positivo: meio de cultura + inóculo bacteriano;

CN: Controlo negativo: meio de cultura + OE

No caso do OE de *Origanum vulgare*, verificou-se que não houve crescimento bacteriano, em qualquer uma das repetições, na concentração de 86,9 µL/mL; na concentração de 44,95 µL/mL também não foi observado crescimento bacteriano, com exceção de uma das repetições, considerando-se, por isso, a MBC para o OE de *Origanum vulgare* 44,95 µL/mL (Tabela 19.).

Tabela 19: Avaliação da concentração mínima bactericida (MBC) do óleo essencial de *Origanum vulgare* em relação a *Erwinia amylovora*.

	Poço 1	Poço 2	Poço 3	Poço 4	Poço 5	Poço 6	Poço 7	Poço 8	Poço 9	CP	CN
Ensaio 1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
Ensaio 2	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
Ensaio 3	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
Ensaio 4	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Ensaio 5	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Ensaio 6	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-

(+): houve crescimento de *E. amylovora*

(-): não houve crescimento de *E. amylovora*.

CP: Controlo positivo: meio de cultura + inóculo bacteriano;

CN: Controlo negativo: meio de cultura + OE

No caso do OE de *Rosmarinus officinalis*, verificou-se que não houve crescimento da bactéria nas concentrações de 86,9 e de 44,95 $\mu\text{L/mL}$, em nenhuma das repetições. Na concentração de 23,25 $\mu\text{L/mL}$ apenas se observou crescimento numa das repetições, por isso, considerouse esta concentração a MBC (Tabela 20).

Tabela 20: Avaliação da concentração mínima bactericida (MBC) do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* em relação a *Erwinia amylovora*.

	Poço 1	Poço 2	Poço 3	Poço 4	Poço 5	Poço 6	Poço 7	Poço 8	Poço 9	CP	CN
Ensaio 1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Ensaio 2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
Ensaio 3	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Ensaio 4	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Ensaio 5	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Ensaio 6	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-

(+): houve crescimento de *E. amylovora*

(-): não houve crescimento de *E. amylovora*.

CP: Controlo positivo: meio de cultura + inóculo bacteriano;

CN: Controlo negativo: meio de cultura + OE

No que respeita ao OE de *Thymus mastichina*, verificou-se que não houve crescimento bacteriano, quer na concentração de 86,9 $\mu\text{L/mL}$ quer na de 44,95 $\mu\text{L/mL}$, nas seis repetições. Assim, considera-se a concentração de 44,95 $\mu\text{L/mL}$ a MBC (Tabela 21).

Tabela 21: Avaliação da concentração mínima bactericida (MBC) do óleo essencial de *Thymus mastichina* em relação a *Erwinia amylovora*.

	Poço 1	Poço 2	Poço 3	Poço 4	Poço 5	Poço 6	Poço 7	Poço 8	Poço 9	CP	CN
Ensaio 1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Ensaio 2	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
Ensaio 3	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Ensaio 4	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Ensaio 5	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Ensaio 6	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-

(+): houve crescimento de *E. amylovora*

(-): não houve crescimento de *E. amylovora*.

CP: Controlo positivo: meio de cultura + inóculo bacteriano;

CN: Controlo negativo: meio de cultura + OE

Resultados semelhantes aos do OE de *T. mastichina* foram obtidos para o OE de *T. vulgaris* sendo a MBC também de 44,95 µL/mL (Tabela 22).

Tabela 22: Avaliação da concentração mínima bactericida (MBC) do óleo essencial de *Thymus vulgaris* em relação a *Erwinia amylovora*.

	Poço 1	Poço 2	Poço 3	Poço 4	Poço 5	Poço 6	Poço 7	Poço 8	Poço 9	CP	CN
Ensaio 1	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Ensaio 2	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
Ensaio 3	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
Ensaio 4	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Ensaio 5	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Ensaio 6	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-

(+): houve crescimento de *E. amylovora*

(-): não houve crescimento de *E. amylovora*.

CP: Controlo positivo: meio de cultura + inóculo bacteriano;

CN: Controlo negativo: meio de cultura + OE

Em suma, verifica-se que os resultados obtidos nas placas para os valores de MBC vieram confirmar os resultados observados nos ensaios de determinação da MIC. Assim sendo, considera-se que a MBC dos OE de *C. camphora* e de *E. globulus* é de 86,90 µL/mL. Considerou-se que a MBC do OE de *O. vulgare*, de *T. mastichina* e de *T. vulgaris* é de 44,95 µL/mL. O OE de *Rosmarinus officinalis* foi o que apresentou maior consistência de resultados, sendo estes mais reprodutíveis, tendo sido também o que apresentou a menor MBC (23,25 µL/mL).

Considerando os resultados obtidos, é fundamental ampliar este tipo de trabalho experimental a outras concentrações, nomeadamente, no caso de extratos das plantas aqui utilizadas e também extratos provenientes de outras plantas, em várias concentrações, e de plantas de diferentes proveniências, pois as condições edafoclimáticas podem influenciar a composição química de extratos

e OE das plantas. Além disso, torna-se importante consolidar conhecimento relevante sobre os efeitos dos OE *in vivo*, assim como, clarificar/consolidar informação relativamente a qual ou quais os componentes dos óleos responsáveis pela ação antibacteriana em relação a *E. amylovora*, bem como, os mecanismos de ação desses compostos.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Vários autores consideram promissor o uso de plantas e seus metabolitos como antibacterianos. Todavia, estudos do efeito antibacteriano de plantas sobre *Erwinia amylovora* ainda é escasso. Com o presente trabalho, pretendeu-se acrescentar informação, através da realização de testes *in vitro* que permitiram avaliar o potencial biocida de extratos e óleos essenciais de plantas em relação a esta bactéria.

Observou-se que os extratos das plantas utilizadas, na concentração de 5 g de planta/30 mL de água, não inibiram o crescimento da bactéria causadora do fogo bacteriano (*E. amylovora*).

Relativamente aos OE estudados, com exceção do OE de rícino, todos inibiram o crescimento de *E. amylovora*, tendo sido o OE de *Origanum vulgare* o que apresentou o maior valor de halo de inibição de crescimento da bactéria (3,33 cm) e o de *Cinnamomum camphora* o menor valor (0,92 cm). Quando se determinou o Índice de Atividade Antimicrobiana (IAA), de modo a comparar o efeito dos OE com o da estreptomicina, usada como controlo positivo nos antibiogramas, verificou-se que os OE de *O. vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus mastichina* e *T. vulgaris*, tiveram IAA de 30,7%, 25,7%, 8,4% e 47,3%, respetivamente, mostrando um efeito superior ao da estreptomicina. Aprofundou-se o estudo do efeito antimicrobiano destes OE, através de ensaios que permitiram determinar a concentração mínima inibitória (MIC) e a concentração mínima bactericida (MBC), tendo os valores sido de 86,90 µL/mL de meio para os OE de *C. camphora* e *E. globulus*, 44,95 µL/mL de meio para o OE de *O. vulgare*, *T. mastichina* e *T. vulgaris*, e 23,25 µL/mL para o OE de *R. officinalis*. Concluiu-se que os OE não só apresentaram efeito inibitório no desenvolvimento de *E. amylovora*, mas também efeito bactericida.

Assim, com base nos resultados obtidos, será importante ampliar aprofundar este tipo de estudos, de modo a contribuir para a descoberta de potenciais soluções ambientalmente sustentáveis para um problema economicamente importante como é o fogo bacteriano.

5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEW, B., SAHILE, S., & MOGES, F.. In vitro antibacterial activity os leaf extracts of *Zehneria scabra* and *Ricinus communis* against *Escherichia coli* and methicillin resistance *Staphylococcus aureus*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, (2014) p.816-820.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. Florida: Elsevier Academic Press,2005.

AL-MARIRI, A., & SWIED, G.. Antibacterial Activity of *Thymus Syriacus* Boiss Essential Oil and Its Components against some Syrian Gram-Negative Bacteria Isolates. **Iranian Journal of Medical Sciences Supplement** Vol 38 No 2, (2013), p.180-186.

ALONSO-AMELOT, M., & AVENDANO, M.. **Human Carcinogenesis and Bracken Fern: A review of the evidence**. Obtido de NCBI Pubmed: <http://www.eurekaselect.com/64558/article#>(07 de dezembro de 2015)

AMARO, C., & LUZ, J. P.. O Fogo Bacteriano - Divulgação Técnica. **Agroforum n.º 29** , (2012) p.7-17.

ANDREWS, J. M.. Determination os minimum inhibitory concentrations. **J Antimicrob Chemother**, vol. 48 Suppl. 1, (2001) p.5-16.

AUMEERUDDY-ELALFI, Z., GURIB-FAKIM, A., & MAHOMOODALLY, F.. Antimicrobial, antibiotic potentiating activity and phytochemical profile of essencial oils from exotic and endemic medicinal plants of Mauritius. **Industrial Crops and Products**, vol. 71, (2015) p.197-204.

BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., & IDAOMAR, M.. Biological effects of essencial oils - A review. **Food and Chemical Toxicology** vol. 46, (2008) p.446-475.

BOTRE, D. A., SOARES, N. d., ESPITIA, P., SOUSA, S., & RENHE, I.. Avaliação de filme incorporado com óleo essencial de orégano para conservação de pizza pronta. **Revista Ceres - Universidade Federal de Viçosa**, (2010) p. 283-291.

BOUZIDI, L. E., JAMALI, C. A., BEKKOUCHE, K., HASSANI, L., WOHLMUTH, H., LEACH, D., & ABBADA, A.. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essencial oils obtained from wild and cultivated Moroccan *Thymus* species. **Industrial Crops and Products**, vol.43, (2013) p. 450– 456.

BRAUN-KIEWNICK, A., ALTENBACH, T., OBERHÄNSLI, T., BITTERLIN, B., & DUFFY, B.. A rapid lateral-flow immunoassay for phytosanitary detection of *Erwinia amylovora* and on-site fire blight diagnosis. **Journal of Microbiological Methods**, (2011) p.1-9.

BUHLMANN, A., POTHIER, J., REZZONICO, F., SMITS, T., ANDREOU, M., BOONHAM, N., FREY, J.. *Erwinia amylovora* loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid pathogen detection and on-site diagnosis of fire blight. **Journal of Microbiological Methods**, (2013), p. 332-339.

CARVALHO, A. J., & RODRIGUES, J. G.. **Aplicação de Produtos Fitofarmacêuticos - Manual do Formando**. Lisboa: Cofagri, (2010).

COSTA-BALLESTER, C. S., LÓPEZ-FERNÁNDEZ, J., ÁLVAREZ-PÉREZ, J., & MARTOS-VIUDA, M. Chemical composition and in vitro antibacterial properties of essential oils of four *Thymus* species from organic growth. **Industrial Crops and Products**, vol. 50, (2013) p.304-311.

COTHN. **Dia de Campo sobre Ensaio de produtos autorizados para o controlo do Fogo bacteriano**. Lisboa: (2012) Cothn.

CRUZ, G., & BRACARENSE, A.. Toxidade da samambaia (*Pteridium aquilinum* (L) Kunh) para a saúde humana. **Semina: Ciências Agrárias vol. 25 (3)**, (2004), p.249-258.

CRUZ, L.. **Diagnóstico Fitossanitário, detecção on-site e ferramentas epidemiológicas no controlo do fogo bacteriano**. INIAV - Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, 2012.

CRUZ, L., & SOUSA, R. d.. Resistência do hospedeiro. **Cadernos Técnicos N.º 2: Fogo Bacteriano "Erwinia Amylovora"** Sustainia - Agricultura Sustentável, Lda, 2013. p. 18,19..

CUNHA, A. **Plantas e Produtos Vegetais em cosmética e Dermatologia**. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 2004.

CUNHA, A., SILVA, A., ROQUE, O., & CUNHA, E. **Plantas e Produtos Vegetais em Cosmética e Dermatologia**. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian 2004.

CUNHA, P. **Farmacognosia e Fitoquímica**. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 2009.

CUNHA, d. P., TEIXEIRA, F., SILVA, A. P., & ROQUE, O. R.. **Plantas na Terapêutica Farmacologia e Ensaio Clínicos**. Lisboa Fundação Calouste Gulbenkian, 2009.

CUNHA, P. A., SILVA, P. A., & ROQUE, R. O. **Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia**. Lisboa Fundação Calouste Gulbenkian. 2006.

DGADR. **Manual de Boas Práticas para o Controlo de Fogo Bacteriano (*Erwinia amylovora*)**. Lisboa Ministério da Agricultura, Mar, Ambiente e Ordenamento do Território. (2011)

DGADR. **Plano de ação nacional para o controlo de *Erwinia amylovora***. Lisboa Ministério da Agricultura, Mar, Ambiente e Ordenamento do Território. 2012.

DGAV. (2013). **Guia dos Produtos Fitofarmacêuticos. Condições de utilização**. [Consultado em 22/07/2014] Disponível em <http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?generico=3666304&cboui=3666304>.

EPPO, E. O. **Data Sheets on Quarantine Pests: *Erwinia amylovora***. EU: EPPO quarantine pest. [Consultado em 22/07/2015] Disponível em <http://www.cabi.org/isc/datasheet/21908>

FONSECA, A., SEBASTIÃO, C., MARTINS, F., RIBEIRO, M., CALHEIROS, I., ABCASSIS, M., BENTO, R. **Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia**. Lisboa, Instituto Nacional de Saúde, Dr Ricardo Jorge, Observatorio Nacional da Saúde. 2004

FRANCO, L.. Jornada Técnica - O Fogo Bacteriano. **Agrotec - Revista Técnico-Científica Agrícola**. 2013.

GROPPO, F., RAMACCIATO, J., SIMÕES, R., FLÓRIO, F., & SARTORATTO, A.. Antimicrobial activity of garlic, tea tree oil and chlorhexidine against oral microorganisms. **International Dental Journal vol 52**, p. 433-437. 2002

HARKAT-MADOURI, L., ASMA, B., MADANI, K., SAID, Z., RIGOU, P., GRENIER, G., BOULEKBACHE-MAKHLOUF, L.. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oil of *Eucalyptus globulus* from Algeria. **Industrial Crops and Products vol. 78**, p.148-153. 2015.

HIRONO. Carcinogenicity in rats of piquiloside isolates from brachen. **Japanese Journal os Cancer, vol. 75**, p.833-836. 1984

JOHNSON, K.B. Fire blight of apple and pear. **The Plant Health Instructor**.DOI: [Consultado em 22/07/2015]. Disponível em <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/prokaryotes/Pages/FireBlight.aspx>

KARAMI-OSBOO, R., KHODAVERDI, M., & ALI-AKBARI, F.. Antibacterial Effect of Effective Compounds of *Staureja hortensis* and *Thymus vulgaris* Essential Oils against *Erwinia amylovora*. **Journal of Agricultural Science and Technology vol 12**, p.35-45. 2010.

KNAAK, N., & FIUZA, L. M.. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. *Neotropical Biology and Conservation*, 120-132. 2010.

KOKOSKOVA, B., POUVOVA, D., & PAVELA, R. (2011). Effectiveness of Plant Essential oils against *Erwinia Amylovora*, *Pseudomonas Syringae* pv. *Syringae*

and associated Saprophytic bacteria on/in host plants. **Journal of Plant Pathology**, vol.93, p.133-139.

KOTAN, R., DADASOGLU, F., KARAGOZ, K., CAKIR, A., OZER, H., KORDALI, C. R., & DIKDAS, N.. Antibacterial activity of the essential oil and extracts of *Satureja hortensis* against plant pathogenic bacteria and their potential use as seed disinfectants. **Scientia Horticulturae** vol. 153, p.34-41. 2013.

KUNZ, S. Fireblight control in organic fruit growing - systematic investigation of the mode of action of potential control agents. **Biocontrol of Bacterial Plant Diseases, 1st Symposium**. 2005.

LABORDIN, S. T. **Manual para Antibiograma. Difusão em Disco (Kirby & Bauer)**. Pinhais, Paraná, Brasil: Labordin. 2011

LUÍS, A., DUARTE, A., GOMINHO, J., DOMINGUES, F., & DUARTE, A. Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils. **Industrial Crops and Products**, vol.9. 2015.

LUZ, J. P.: Fogo Bacteriano "*Erwinia Amylovora*". **Bioecologia e ciclo de Vida. Cadernos Técnicos N.º 2**, Sustinia - Agricultura Sustentável, Lda. .p.16-17. 2013.

LUZ, J. P.. Doenças Bacterianas das Pomóideas. **Manual Bayfruta**. p.107-116. 2013

LUZ, J. p., & AMARO, C. O fogo bacteriano das pomoideas em Portugal. **II Ciclo de Conferências: Conselho Técnico-Científico**. Castelo Branco, Edições IPCB. p.6-11. 2014.

MARTINS, N., BARROS, L., SANTOS-BUELGA, C., SILVA, S., & MATOS HENRIQUES, M.. Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of cultivated thyme: Antioxidant and antibacterial activities, and phenolic characterisation. **Food Chemistry** vol.167, p.131–137. 2014.

MATOS , O. C.. **Substâncias Naturais de Origem Vegetal com Actividade Biocida: Seu uso na protecção das Culturas**. Lisboa, IIR Portugal. 2004.

MEDICE, R., ALVES, E., ASSIS, R. T., & JÚNIOR, R. G. Óleos Essenciais No Controlo da Ferrugem Asiática da Soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. **Ciência e Agrotecnologia**, vol 31, n.º 1, p.83-90. 2007.

MERIGA, B., MOPURI, R., & MURALIKRISHNA, T.. Insecticidal, antimicrobial and antioxidant activities of bulb extracts of *Allium sativum*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p.391-395. 2012.

MICHERFF, S. J.. **Bactérias como agentes de doenças de plantas**. Pernambuco: Universidade Federal Rural de Pernambuco. SD

MIHAJILOV-KRSTEV, T., RADNOVIC, D., & Kitic, D.. Antimicrobial activity of *Satureja L.* essential oils against phytopathogenic bacteria *Erwinia amylovora*. **Biologica Nyssana vol.1 (1-2)**, p.95-98. 2010.

MILCEVICOVÁ, R., GOSCH, C., HALBWITZ, H., STICH, K., & HANKE, M.-V.. *Erwinia amylovora*-induced defense mechanisms of two apple species that differ. **Plant Science vol. 179**, p.60-67. 2010.

MOHAMMAD AMZAD HOSSAIN, K. A.-R., AL-MIJIZY, Z. H., WELI, A. M., & AL-RIYAMI, Q.. Study of total phenol, flavonoids contents and phytochemical screening of various leaves crude extracts of locally grown *Thymus vulgaris*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, vol 3, Issue 9**, p.705-710. 2013

NIKOLIT, M., GLAMOCLIIJA, J., FERREIRA, I., CAHALHA, R., FERNANDES, A., MARKOVIT, T., SOKOVIC, M.. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum L.*, *Thymus algeriensis* Boiss and Reut and *Thymus vulgaris L.* essential oils. **Industrial Crops and Products vol.52**, p.183– 190. 2014.

OZRENK, K., BALTA, F., & ÇELIK, F.. Levels of fire blight (*Erwinia amylovora*) susceptibility of native apple, pear and quince germplasm from Lake Van Basin, Turkey. **European Journal of Plant Pathology, vol. 132**, p.229–236. 2012.

OZRENK, K., BALTA, F., GULERYUZ, M., & KAN, T. Fire blight (*Erwinia amylovora*) resistant/susceptibility of native apple germplasm from eastern Turkey. **Crop Protection vol. 30**, p.526 - 530. 2011.

PAIVA, O. *Fogo Bacteriano. Proteção ambiental*. Lisboa. 2014.

PALACIO-BIELSA, A., & CAMBRA, M.. **El Fuego Bacteriano de las rosáceas (*Erwinia amylovora*)**. Madrid: Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. 2009.

PELCZAR, M., REID, R., & CHAN, E. **Microbiologia**. McGraw Hill. 1980.

PEREIRA, V., DIAS, C., VASCONCELOS, M., ROSA, E., & SAAVEDRA, M.. Antibacterial activity and synergetic effects between *Eucalyptus globulus* leaf residues (essential oils and extracts) and antibiotics against several isolates of respiratory tract infections (*Pseudomonas aeruginosa*). **Industrial Crops and Products, vol.52**, p.1-7. 2014.

PESAVENTO, G., CALONICO, C., BILIA, A., BARNABEI, M., CALESINI, F., ADDONA, R., NOSTRO, A. L.. Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oil against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. **Food Control, vol 54**, p.188-199. 2015.

PINTO, H., BATISTA, V., & FRANCA, F. **Relatório da execução do Plano de ação Nacional para o Controlo do Fogo Bacteriano na DRAPCentro**. Centro: Direção Regional de agricultura e Pescas do Centro. 2014.

PINTO, S. S. **Plano de ação nacional para o controlo do fogo bacteriano - Relatório 2012**. Lisboa: DGVA - DSSV. 2012

PINTO, S. S.. **Plano de ação nacional para o controlo do fogo bacteriano - Relatorio 2013**. Lisboa: Direção Geral de Alimentação e Veterinária - DSSV. 2013.

PIRBALOUTI, A. G., HASEMI, M., GHAFAROKHI, & TAHERIAN, F.. Essential oil and chemical compositions of wild and cultivated *Thymus daenensis* Celak and *Thymus vulgaris* L. **Industrial Crops and Products**, vol. 48, p.43-48. 2013

PRATES, A., & CAVACO, M.. Métodos culturais, biológicos e químicos. Estratégias integradas. **Cadernos Técnicos n.º 2: Fogo Bacteriano "Erwinia amylovora"**, p.24-31. 2013.

ROBERTS R.G & SAWYER, A.J. ,An updated pest risk assessment for spread of *Erwinia amylovora* and fire blight via commercial apple fruit. **Crop Protection**, p.362–368. 2008.

RAHMAN, A., SHAKOOR, A., ZAIB, G., MUMTAZ, A., IHTESHAM, Y., & NAPAR, A. Comparative antimicrobial activity of *Acacia nilotica* L.leaves extracts against pathogenic bacteria and fungi. **Jornal of Medicinal Plant Research**, vol 8 (29), p.975-982. 2014.

RUNTI, G., PACOR, S., COLOMBAN, S., GENNARO, R., NAVARINI, L., & SCOCCHI, M.. Arabica coffee extracts shows antibacterial activity against *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecalis* a low toxicity towards a human cell line. **LWT - Food Science and Tecnology**, Vol.62, p.108-114. 2015.

SARKER, S. N. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the vitro antibacterial screening os phytochemicals. **Methods**, vol. 42, p.321-324. 2007.

SERRA, C., & PINTO, S. *Erwinia amylovora*: Ponto de Situação. **Voz do Campo; N.º 184**. 2015.

SHERRAL, E., & WARNKE, P. Successful use of an inhalation phytochemical to treat pulmonary tuberculosis. **Phytomedicine**. p.95-97. 2004.

SMITH, B., SEAWRIGHT, A., NG, J., HERTLE, A., THOMSON, J., & PD., B. **Concentration of ptaquiloside, a major carcinogen in braken fern (*Pteridium* spp.), from eastern Australia and from a cultivated worldwide collection held in Sydney, Australia**. [Consultado em 07 de 12 de 2015] Disponível em NCIM PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7704447>

SOUSA, L. S., SILVA, Í. R., ASSIS, D. D., & CUNHA, D. R.. Estudo Prospectivo sobre as Propriedades Terapêuticas do *Zingiber officinale* (Gengibre) com ênfase na ação antimicrobiana. **Revista GEINTEC vol. 3**, p.427-436. 2013.

STEFANAIS, K. M., TOULOUPAKIS, E., ANASTASOPOULOS, E., GHANOTAKIS, D., KATERINOPOULOS, H., & MAKRIDIS, P.. Antibacterial activity of essential oils from plants of the genus *Origanum*. **Food Control**, p.539-546. 2013.

Vancheva, T; Encheva-Malinova M., Tatyozova; M., Gochev; V., Stoyanova; M., Moncheva; P., Bogatzevska N. Antimicrobial activity of essential oils against pepper bacterial spots agents. **Annuaire de l'Université de Sofia "St. Kliment Ohridski", Faculte de Biologie, vol. 100**, p.200-207. .2015.

TAYLOR, R., HALE, C., GUNSON, F., & MARSHALL, J.. Survival of the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*, in calyxes of apple fruit discarded in an orchard. **Crop Protection vol. 22**, p.603-608. 2003.

THOMSON, S. **Epidemiology of fire blight. In: Fire Blight: The Disease and its Causative Agent, *Erwinia amylovora***. Wallingford, UK: JL. Vanneste, ed. 2000. p. 9-36.

UC IPM, Statewide Integrated Pest Management Program, University of California Agriculture & Natural Resources [Consultado em 22/7/2015] Disponível em <http://ipm.ucanr.edu/PMG/PESTNOTES/pn7414.html>

VAN DER ZWET, T., OROLAZA-HALBRENDT, N., & ZELLER, W. **Fire Blight: History, Biology and Management**. USA: The American Phytopathological Society. 2012.

VARMA, J., & DUBEY, N. (08 de 10 de 1998). **Indian Academy of Science**. Obtido em 06 de 05 de 2008, de Indian Academy of Science: <http://www.ias.ac.in/currsci/jan25/articles22.htm>.

WILCOX, W. F. **Fire Blight . Disease Identification Sheet No. D3**. 1994.

Anexo 1 - Estatística

Teste-T

Estatísticas de amostras emparelhadas

		Média	N	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média
Par 1	Cinnamomum camphora	,9167	6	,36009	,14701
	estreptomomicina	1,5500	6	,74498	,30414

Correlações de amostras emparelhadas

		N	Correlação	Sig.
Par 1	Cinnamomum camphora & estreptomomicina	6	,772	,072

Teste de amostras emparelhadas

		Diferenças emparelhadas				t	gl	Sig. (bilateral)	
		Média	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média	95% Intervalo de Confiança da Diferença				
					Inferior				Superior
Par 1	Cinnamomum camphora - estreptomomicina	-,63333	,52026	,21239	-1,17931	-,08736	-2,982	5	,031

Estatísticas de amostras emparelhadas

		Média	N	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média
Par 1	Eucaliptus globulus	1,0667	6	,26583	,10853
	estreptomomicina	1,4167	6	,27869	,11377

Correlações de amostras emparelhadas

		N	Correlação	Sig.
Par 1	Eucaliptus globulus & estreptomomicina	6	-,585	,223

Teste de amostras emparelhadas

		Diferenças emparelhadas				t	gl	Sig. (bilateral)	
		Média	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média	95% Intervalo de Confiança da Diferença				
					Inferior				Superior
Par 1	Eucaliptus globulus - estreptomomicina	-,35000	,48477	,19791	-,85873	,15873	-1,769	5	,137

Estadísticas de amostras emparelhadas

		Média	N	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média
Par 1	Origanum vulgare	3,3333	6	1,63299	,66667
	estreptomicina	1,7667	6	1,29409	,52831

Correlações de amostras emparelhadas

		N	Correlação	Sig.
Par 1	Origanum vulgare & estreptomicina	6	,669	,146

Teste de amostras emparelhadas

		Diferenças emparelhadas				t	gl	Sig. (bilateral)	
		Média	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média	95% Intervalo de Confiança da Diferença				
					Inferior				Superior
Par 1	Origanum vulgare - estreptomicina	1,56667	1,23072	,50244	,27511	2,85823	3,118	5	,026

Estadísticas de amostras emparelhadas

		Média	N	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média
Par 1	Rosmarinus officinalis	2,3667	6	1,22746	,50111
	estreptomicina	1,4000	6	,51769	,21134

Correlações de amostras emparelhadas

		N	Correlação	Sig.
Par 1	Rosmarinus officinalis & estreptomicina	6	,227	,666

Teste de amostras emparelhadas

		Diferenças emparelhadas				t	gl	Sig. (bilateral)	
		Média	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média	95% Intervalo de Confiança da Diferença				
					Inferior				Superior
Par 1	Rosmarinus officinalis - estreptomicina	,96667	1,21929	,49777	-,31290	2,24623	1,942	5	,110

Estatísticas de amostras emparelhadas

	Média	N	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média
Par 1 Thymus mastichina	2,5833	6	,73598	,30046
estreptomicina	2,1833	6	,20412	,08333

Correlações de amostras emparelhadas

	N	Correlação	Sig.
Par 1 Thymus mastichina & estreptomicina	6	,277	,595

Teste de amostras emparelhadas

	Diferenças emparelhadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média	95% Intervalo de Confiança da Diferença				
				Inferior	Superior			
Par 1 Thymus mastichina - estreptomicina	,40000	,70711	,28868	-,34206	1,14206	1,386	5	,224

Estatísticas de amostras emparelhadas

	Média	N	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média
Par 1 Thymus vulgaris	3,1667	6	2,56255	1,04616
estreptomicina	1,1333	6	,92014	,37565

Correlações de amostras emparelhadas

	N	Correlação	Sig.
Par 1 Thymus vulgaris & estreptomicina	6	,871	,024

Teste de amostras emparelhadas

	Diferenças emparelhadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média	95% Intervalo de Confiança da Diferença				
				Inferior	Superior			
Par 1 Thymus vulgaris - estreptomicina	2,03333	1,81842	,74237	-,12501	3,94165	2,739	5	,041