



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas

PAULA FERNANDA FIGUEIREDO DAS MERCÊS

**VARIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DA ATIVIDADE
ANTIFITOPATOGÊNICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS E FRUTOS DE
Hymenaea courbaril L. var. *courbaril* (FABACEAE) COLETADAS EM ÁREA DE
EXTREMA IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA PARA A CONSERVAÇÃO.**

Recife, 2015

PAULA FERNANDA FIGUEIREDO DAS MERCÊS

**VARIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DA ATIVIDADE
ANTIFITOPATOGÊNICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS E FRUTOS DE
Hymenaea courbaril L. var. *courbaril* (FABACEAE) COLETADAS EM ÁREA DE
EXTREMA IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA PARA A CONSERVAÇÃO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Profa Dra Maria Luiza Vilela Oliva
Orientadora

Profª Drª Maria Tereza dos Santos Correia
Co-orientadora

Recife, 2015

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Mercês, Paula Fernanda Figueiredo das

Varição da composição química e da atividade antifitopatogênica dos óleos essenciais das folhas e frutos de *Hymenaea courbaril* L. var. *courbaril* (Fabaceae) coletadas em área de extrema importância biológica para a conservação / Paula Fernanda Figueiredo das Mercês. – Recife: O Autor, 2015.

101 f.: il.

Orientadores: Maria Luiza Vilela Oliva, Maria Tereza dos Santos Correia
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2015.
Inclui referências e anexos

1. Plantas medicinais 2. Biodiversidade - Conservação I. Oliva, Maria Luiza Vilela (orient.) II. Correia, Maria Tereza do Santos (coorient.) III. Título.

581.634

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-254

PAULA FERNANDA FIGUEIREDO DAS MERCÊS

**VARIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DA ATIVIDADE
ANTIFITOPATOGÊNICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS E FRUTOS DE
Hymenaea courbaril L. var. *courbaril* (FABACEAE) COLETADAS EM ÁREA DE
EXTREMA IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA PARA A CONSERVAÇÃO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Data da aprovação 28/07/2015

Banca examinadora:

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia
Departamento de Bioquímica – UFPE

Profa. Dra. Mônica Cristina Barroso Martins
Departamento de Bioquímica – UFPE

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão
Departamento de Bioquímica – UFPE

Recife, 2015

Dedico,

A todas as pessoas que me abençoaram. A minha família pelo amor e dedicação que constituem a base das minhas realizações pessoais e profissionais.

AGRADECIMENTOS

Ao amado e maravilhoso Deus pelo dom da vida, pela sua providência durante todos os momentos desta pesquisa, por todas as bênçãos e graças derramadas a cada dia, por me fazer entender que ele é o caminho pra tudo.

Desejo dedicar meus sinceros agradecimentos àqueles que, de alguma forma, participaram e colaboraram para a realização deste trabalho. A todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para a concretização deste projeto, em especial:

Às pessoas mais importantes da minha vida, meus pais Marcos e Fernanda, pelo “porto seguro” que sempre representaram na minha vida, por todo o apoio, força, amor e confiança que sempre me dedicaram e que jamais conseguirei retribuir. Agradeço por me ensinarem a amar os estudos e por me proporcionarem, com muita luta e esforço, todo o alicerce para que a conquista deste sonho fosse possível;

Ao meu irmão Bruno, minha cunhada Fabiana por estarem sempre ao meu lado, compartilhando cada momento, me apoiado, confiado e acreditado no meu sucesso mais do que eu mesma;

Ao meu companheiro João Victor, obrigada pelo seu amor, seu carinho, seu cuidado, esteve comigo nas etapas mais difíceis do trabalho, sempre compreendendo, ouvindo e ajudando, com muita paciência e dedicação, proporcionando momentos que me trouxeram muitas alegrias;

A minha orientadora professora Maria Luiza Vilela Oliva, pela oportunidade, incentivo, dedicação e auxílio em todas as etapas deste trabalho. Pela confiança e liberdade concedida e pelo investimento na minha formação;

A minha co-orientadora professora Maria Tereza dos Santos Correia pelo exemplo profissional, pelos conhecimentos e experiência transmitida, pela atenção, compreensão e amizade dispensadas;

A professora Márcia Vanusa da Silva, por sua amizade, dedicação, apoio, pelos seus conselhos e sugestões, além das palavras de ânimo que sempre me incentivaram, além disso, pelas valiosas discussões, sugestões e participação nas determinações estruturais do meu projeto;

Ao prof. Nicácio Henrique pelo exemplo de amor ao que faz, um sentimento que nos contagia, pelo incentivo e dedicação sempre demonstrado;

A profa. Mônica Martins, pelo exemplo de cidadã, sempre solicita em todos os momentos enriquecendo meu aprendizado, minha formação e minha evolução espiritual.

Áo grupo do prof. Cláudio Câmara, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, principalmente a Milena pela parceria e fundamental participação nos experimentos.

À Prof. Daniela Navarro, pela disponibilização do equipamento de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas e a aluna de doutorado Priscila pela paciência e valioso auxílio na realização das análises;

Agradeço principalmente a Seu João, que me ensinou muito além das práticas do laboratório, um verdadeiro professor, sempre disposto a orientar e ajudar;

À Renata Carla Corre Alves, minha “prima amada”, sempre disposta a me ajudar e a me ensinar. Mesmo distante sempre me apoia e torce pelo meu sucesso.

À querida Cibele Maria Alves da Silva Bessa que tanto aprendi e aprendo! Pelo apoio e participação fundamental do andamento da pesquisa e pela verdadeira amizade que construímos;

À minha irmã (espiritual) Ana Paula Sant’Anna da Silva, companheira de ensinamentos diários, sempre com a palavra certa e o apoio fundamental para minha trajetória e evolução;

A Alexandre Gomes, por sua orientação fundamental, pelo apoio, incentivo, amizade e confiança que sempre demonstrou em mim.

A Carolina Malafaia, pelo auxílio no decorrer do trabalho e no dia-dia.

Aos amigos do IPA prof. Felix, Ana Cláudia, Manuela pela ajuda, incentivo e disponibilidade em ajudar nos momentos necessários;

A todos do Laboratório de Produtos Naturais Alessandra, Amanda, Bruna, Francinetti, Ingrid, Juciara, Rosy, Tiago, que fizeram os momentos na universidade únicos, pelas gargalhadas, por toda a ajuda e incentivo, por compartilharem comigo momentos tristes e felizes ao longo de todo o percurso;

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular, Clóvis, Bruno, Daniel, Bárbara, Túlio e Priscila, a quem compartilho os conhecimentos, dificuldades e os ocasiões de descontração;

Amigas companheiras, Edla Rafaely e Leice Germana que sempre proporcionaram momentos de amizade e aprendizagem e muita cumplicidade durante esse período.

Ao apoio financeiro e NANOBIOTEC-Brasil da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro, FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) e Chico Mendes de Instituto Conservação da Biodiversidade (ICMBio) para autorizar coleções no Parque Nacional do Catimbau.

À todos muito obrigada!

Deus:

Eu pedi Força.

E Deus me deu Dificuldades para me fazer forte...

Eu pedi Sabedoria.

E Deus me deu Problemas para resolver...

Eu pedi Prosperidade.

E Deus me deu Cérebro e Músculos para trabalhar...

Eu pedi Coragem.

E Deus me deu Perigo para eu superar...

Eu pedi Amor.

E Deus me deu pessoas com Problemas para eu ajudar...

Eu pedi favores.

E Deus me deu Oportunidades...

Eu não recebi nada do que pedi.

Mas eu recebi tudo que precisava...

Obrigada meu **Deus.**

Joanna de Ângêlis

RESUMO

A formação de uma consciência ecológica a fim de preservar o meio ambiente tem gerado a necessidade de testar produtos naturais, visando um controle alternativo de pragas e fitopatógenos. *Hymenaea courbaril* L. var. *courbaril*, conhecida popularmente como Jatobá é uma planta de grande ocorrência na região semiárida brasileira e bastante utilizada pelas populações locais para fins medicinais. Levando isso em consideração, o objetivo desse trabalho foi comparar a caracterização química, verificar o potencial antimicrobiano e inseticida dos óleos essenciais das folhas do jatobá, coletados em quatro distintas fitofisionomias do Parque Nacional Vale do Catimbau (PARNA do Catimbau), reserva da Caatinga localizada no município de Buíque, Pernambuco. As amostras (I, II, III e IV) foram submetidas ao processo de hidrodestilação, e a caracterização química foi analisada por (CG/MS). A atividade biológica, foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, para o ensaio bacteriana foram utilizadas seis fitopatógenos *Acidovorax citrulli* (DEPA 1.12), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (DEPA 31), *Ralstonia solanacearum* (DEPA CRM 10), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (DEPA 53), *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (DEPA 11.2.1), *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (DEPA 137). Cinco fungos fitopatogênicos foram testados: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani*, *Verticillium lecanii*, *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus flavus*. Análises do solo e fatores abióticos dos locais de coleta também foram averiguados, afim de avaliar a influencia dos mesmos sobre os resultado das amostras coletadas. Os bioensaios inseticidas com as duas pragas de interesse agrícola o *Sitophilus zeamais* (gorgulho-do-milho) e *Tetranychus urticae* (ácaro-rajado), foram realizados com uma amostra do óleo. Para avaliar a interferência do óleo essencial na fisiologia nutricional do gorgulho do milho, foram testadas quatro concentrações de 10, 30, 40 e 50 µl/g. Nos testes de fumigação para com o ácaro-rajado, a CL₅₀ foi de 35,57 µL L⁻¹ de ar, foram testadas concentrações 2,0 á 100,0 µL. Os óleos essenciais obtidos, apresentaram rendimento de 0,86%, 0,87%, 1,32% e 1,45% para as quatro amostras coletados, respectivamente, registrando a presença de monoterpenos e sesquiterpenos obtendo-se 96,68% da identificação da composição química dos óleos. m todas as amostras, os principais compostos identificados foram Óxido de cariofileno (I: 20,55%; II: 20,50%; III: 20,83%; IV: 21,77%), beta-cariofileno (I: 16,97%; II: 17,20%; III: 16,18%; IV: 17,32%) e Junipene (I: 13,58%; II: 13,07%; III: 13,72%; IV: 14,26%). Todos os óleos apresentaram atividade antimicrobiana frente a bactérias e fungos, a concentração inibitória mínima (CMI) e concentração bactericida/fungicida mínima (CMB/CFM). O óleo causou mortalidade significativa (p<0.05), promovendo dano fisiológico aos insetos, em todas as concentrações testadas. Ainda no mesmo teste, pode-se observar que a oviposição também foi suscetível ao óleo essencial. A comparação do perfil químico dos óleos de *H. courbaril* L. var. *courbaril* evidenciou que as quatro amostras pertencem à mesma via biosintética, o cariofileno. A variação geográfica teve efeito significativo sobre as características do óleo do jatobá coletado em diferentes fitofisionomias da região. Para os testes *in vitro* os óleos apresentaram atividade antimicrobiana positiva frente a bactérias e fungos. O óleo também foi tóxicos ao *T. Urticae* e a *S. zeamais*, à medida que a concentração e o período de exposição era aumentada.

Palavras-chaves: Biodiversidade. compostos bioativos. controle alternativo.

ABSTRACT

The formation of ecological awareness in order to preserve the environment has generated the need to test natural products, seeking an alternative pest control and plant pathogens. *Hymenaea L. var. courbaril*, popularly known as Jatoba is a high occurrence of plant in the Brazilian semiarid region and widely used by local people for medicinal purposes. Taking this into consideration, the aim of this study was to compare the chemical, check the antimicrobial potential and insecticide essential oils of locust tree leaves, collected in four distinct faces of Catimbau Valley National Park (PARNA the Catimbau), reserve located Caatinga in the municipality of Buíque, Pernambuco. The samples (I, II, III and IV) were subjected to hydrodistillation process and chemical characterization was analyzed (GC / MS). The biological activity was determined by the microdilution broth method for the assay were used six bacterial pathogens *Acidovorax citrulli* (DEPA 1.12), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (31 DEPA), *Ralstonia solanacearum* (DEPA CRM 10), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (53 DEPA), *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (DEPA 11.2.1), *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (DEPA 137). Five pathogenic fungi were tested: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani*, *Verticillium lecanii*, *stolonifer Rhizopus* and *Aspergillus flavus*. Soil analyzes and abiotic factors of the collection sites were also investigated in order to assess the influence of these on the results of samples collected. Bioassays with two insecticides pest *Sitophilus zeamais* the agricultural interest (maize weevil) and *Tetranychus urticae* (spider mite Brindley), were performed with a sample of the oil. To evaluate the effect of the essential oil in nutritional physiology maize weevil, four concentrations were tested 10, 30, 40 and 50 l / g. In tests for fumigation with striped mite, LC50 was 35.57 U-1 μ L of air concentrations tested were 2.0 100.0 μ L. Essential oils obtained showed yield of 0.86%, 0.87%, 1.32% and 1.45% for the four collected samples, respectively, registering the presence of monoterpenes and sesquiterpenes obtaining 96.68% of the identification of the chemical composition of the oils. In all the samples, the major compounds identified were caryophyllene oxide (I: 20.55%, II: 20.50%; III: 20.83%; IR: 21.77%), beta-caryophyllene (I: 16.97%; II: 17.20%; III: 16.18%; IR: 17.32%) and Junipene (I: 13.58%; II: 13.07%; III: 13.72%; IR: 14.26%) All oils presented antimicrobial activity against bacteria and fungi, the minimum inhibitory concentration (MIC) and bactericidal / minimum fungicidal concentration (CMB / CFM). The oil caused significant mortality ($p < 0.05$), promoting physiological damage to insects, in all tested concentrations. In the same test, it can be seen that the eggs were also susceptible to the essential oil. The comparison of the chemical profile of the oils of *H. courbaril L. var. courbaril* showed that four samples belong to the same biosynthetic pathway, caryophyllene. Geographic variation had a significant effect on jatobá oil characteristics collected in different faces of the region. For the in vitro tests positive oils exhibited antimicrobial activity against bacteria and fungi. The oil was also toxic to *T. urticae* and *S. zeamais*, as the concentration and the exposure time was increased.

Key-words: biodiversity, bioactive compounds, alternative control.

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1: Localização da área de estudo, Parque Nacional do Catimbau (PNC), Pernambuco.	21
Figura 2: Ilustração das belezas naturais do Parque Nacional do Catimbau.	21
Figura 3: Esquema simplificado da principal rota de biossíntese de metabólitos-secundários e suas interações com o metabolismo primário.	27
Figura 4: Fotografias da glândula capilar da folha jovem do girassol (<i>Balsamorhiza sagittata</i> (Pursh) Nutt.) (x1105) e do corte histológico demonstrando o tricoma e glândula capilar	29
Figura 5: Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários nas plantas.	30
Figura 6: Esquema do mecanismos propostos para a ação antimicrobiana dos óleos essenciais na célula bacteriana.	40
Figura 7: <i>Hymenaea courbaril</i> L. var. <i>courbaril</i> ; (A) Hábito da planta (árvore), (B) Indivíduo em floração, (C) detalhe da folha, (D) frutos, (E) Excicata N° 84893 tombada no Herbário IPA.	45

ARTIGO I

	Pág
Figura 1: Localização dos pontos de coleta sendo, indivíduo I (P1), indivíduo II (P2), indivíduo III (P3) e indivíduo IV (P4).	78
Figura 2: Cromatograma dos óleos obtido por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas (CG-MS).	78

ARTIGO II

	Pág
Figura 1: Mortalidade e oviposição de <i>T. urticae</i> em discos de folhas pulverizados com diferentes concentrações do óleo das folhas de <i>H. courbari</i> L. var. <i>courbaril</i> .	97
Figura 2: Parâmetros nutricionais de adultos de <i>S. zeamais</i> criadas em dietas artificiais. (A) O ganho de biomassa em relação taxa indica a quantidade de biomassa obtida em todos os dias por µl/g de corpo inicial peso. (B) A taxa de consumo relativo indica a quantidade de alimentos consumido em µl/g por mg de peso corporal por dia de insetos. (C) A eficiência de conversão do alimento ingerido (%) indica a quantidade de alimentos ingeridos pelos insetos incorporada como biomassa. Letras diferentes indicam (P <0,05) diferenças significativas entre os tratamentos.	98

LISTA DE TABELAS

	Pág
Tabela 1: Doenças e sintomas causados por fungos fitopatógenos	38
Tabela 2: Doenças e Sintomas causados por bactérias fitopatógenas.	39
Tabela 3: Estudos biológicos realizados com <i>Hymenaea courbaril</i> L. var. <i>courbaril</i> .	47

ARTIGO I

Tabela 1: Rendimento dos óleos essenciais dos quatro indivíduos de <i>Hymenaea courbaril</i> L. var. <i>courbaril</i> .	79
Tabela 2: Localização dos pontos de coleta, destacando-se as coordenadas geográficas, as características do solo e os números de registro de tombamento das espécies.	79
Tabela 3: Resultados da análise dos solos, quanto aos macro nutrientes e pH	79
Tabela 4: Identificação dos constituintes dos óleos essenciais dos quatro indivíduos de <i>Hymenaea courbaril</i> L. var. <i>courbaril</i>	80
Tabela 5: Atividade antifúngica, determinação da concentrações inibitórias mínimas (MIC) e concentração mínima fungicida (MFC) das quatro amostras dos óleos essenciais de <i>Hymenaea courbaril</i> L. var. <i>courbaril</i> contra fungos fitopatógenos.	81
Tabela 6: Atividade antibacteriana, determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) das quatro amostras dos óleos essenciais de <i>Hymenaea courbaril</i> L. var. <i>courbaril</i> frente á bactérias fitopatógenas.	82

ARTIGO II

Tabela 1: Percentual dos Constituintes voláteis de Folhas de <i>Hymenaea courbaril</i> L. var. <i>courbaril</i> . Os componentes são listados de acordo com a ordem de eluição. RI: retenção índices calculados em relação a padrões de mistura de hidrocarbonetos.	94
Tabela 2: Toxicidade por contato residual (CL ₅₀ em µL/mL) do óleo essencial de <i>H. courbari</i> L. var. <i>courbaril</i> e eugenol sobre <i>T. urticae</i> .	95

SUMÁRIO

	pág
AGRADECIMENTOS	
RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
1. Introdução	13
2. Fundamentação Teórica	15
2.1 A Caatinga e suas características: formação vegetacional única	15
2.2 Biodiversidade, Conservação e Preservação	17
2.3 Histórico das Antigas Civilizações e o uso das Plantas	22
2.4 Óleos Essenciais – Descoberta, Importância e Função	24
2.5 Fatores de Influência no conteúdo e Composição Química dos OEs	31
2.6 Fatores - Sazonalidade, Ritmo Circadiano e Desenvolvimento, Temperatura, Radiação Ultravioleta, Altitude e Poluição Atmosférica.	32
2.7 Influência do Solo e Seus Nutrientes Na Constituição dos OEs	34
2.8 Correlação – Planta/Patógeno	35
2.9 Indução por Estímulos Mecânicos ou Ataque de Patógenos	36
2.10 Micro-organismos Fitopatógenos	37
2.11 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais	39
2.12 Óleos Essenciais com Potencial de uso no Controle de Pragas	41
2.13 Família Fabaceae, o Gênero <i>Hymenaea</i> e a espécie <i>Hymenaea courbaril</i> L.	42
3. Objetivos	49
Referências Bibliográficas	50
Conclusão	65
Capítulo 1:	
Variabilidade química e atividade antimicrobiana contra fitopatógenos dos óleos essenciais das folhas de <i>Hymenaea courbaril</i> L. var. <i>courbaril</i> (Fabaceae: Caesalpinioideae).	67
Capítulo 2:	
Avaliação do Potencial Inseticida do Óleo Essencial de <i>Hymenaea Courbaril</i> L. var. <i>Courbaril</i> sobre o ácaro-rajado <i>Tetranychus Urticae</i> Koch (Acari: Tetranychidae) e o gorgulho do milho <i>Sitophilus Zeamais</i> Mots. (Coleoptera: Curculionidae).	84
Anexos	97

Introdução e Fundamentação Teórica

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país detentor de uma grande diversidade biológica, encontrada nos diversos ecossistemas existentes, logo, o conhecimento sobre essa dinâmica é de grande importância para a manutenção da biodiversidade (LORENZI et al., 2002). A Caatinga, se destaca por apresentar grande importância ecológica, devido a sua formação vegetacional única (PRADO, 2003). Possui ampla variedade de espécies vegetais, adaptadas às condições de estresse ambiental característicos das regiões semiáridas, como baixa pluviosidade, temperaturas elevadas e altas taxas de evapotranspiração tornando-a muito promissora para o estudo de novas fontes de biomoléculas que apresentem importantes atividades biológicas, dentre elas a antimicrobiana e inseticida, podendo atuar como alternativa econômica e ecológica (ARCOVERDE et al., 2014; DE BM TROVÃO et al., 2007; FÉLIX-SILVA et al., 2014).

O controle químico de microrganismos e pragas agrícolas, feito muitas vezes de maneira não recomendada ao longo dos anos, traz graves problemas para a saúde humana, animal, e graves consequências para o meio ambiente, como a contaminação da água e do solo (GHINI KIMATI, 2000). Nesse contexto, as espécies da Caatinga recebem atenção especial pelas diferentes atividades que apresentam, sendo alternativas potenciais de uso como fungicidas, herbicidas, inseticidas, e nematicidas (SODAEIZADEH et al., 2010). Afim de se reduzir o uso de agentes clássicos no controle biológico de pragas, o uso de substâncias advindas do metabolismo secundário de plantas, como os óleos essenciais atuando como controladores de doenças, são necessários como novas alternativas para o controle fitossanitário na agricultura (CASTRO, 2010). Óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, com baixo peso molecular, geralmente odoríferas e líquidas, constituídos, na maioria das vezes, por moléculas de natureza terpênica (AQUINO, 2014), exercem efeito antimicrobiano afetando a estrutura da parede celular do microrganismo desnaturando e coagulando proteínas. Podem também alterar a permeabilidade da membrana plasmática causando a interrupção de processos vitais, como transporte de elétrons, fosforilação e outras reações resultando em perda do controle quimiosmótico, levando á

morte celular (LORENZETTI, 2011). A utilização de óleos essenciais, isolados ou em combinação com outros métodos, poderá ter um importante papel no controle de fitopatógenos, contribuindo para a redução do uso de agrotóxicos e, conseqüentemente, um menor impacto ao ambiente (PERREIRA, 2014).

Desta forma, contribuindo com os estudos de plantas do Nordeste brasileiro para a descoberta de novos compostos bioativos, este trabalho propôs avaliar o potencial antibacteriano, antifúngico e inseticida dos óleos essenciais das folhas de diferentes indivíduos de *Hymenaea courbaril* L. var. *courbaril* obtidas em diferentes localidades do Parque Nacional da Serra do Catimbau, reserva da Caatinga localizada no município de Buíque, Pernambuco.

Embora esta espécie já tenha sido submetida a estudos, sua grande utilização pela população, principalmente no Nordeste, justifica a importância de novos estudos, dentre esses se enquadram trabalhos envolvendo conhecer detalhadamente sua composição química e sua participação em novas formulações, como de bactericidas, fungicidas e inseticidas, passíveis de serem empregados no sistema orgânico e agrícola possibilitando seu uso no combate de microrganismos fitopatógenos e a insetos predadores de grãos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 A Caatinga e suas características: formação vegetacional única

Ao longo do século XIX, houve cada vez mais interesse científico por regiões do Brasil cuja flora era pouco conhecida, como a Caatinga, o Cerrado e até mesmo a Floresta Amazônica. Os botânicos, do ponto de vista teórico, sabiam que podiam esperar grande diversidade de plantas no Brasil e também da imensa adaptabilidade dos vegetais às mais extremas situações (CARRARA, 1996). Quando porém, efetivamente se depararam com o ritmo da vegetação do semiárido brasileiro e com as longas extensões secas, precisaram de algum tempo para perceber a beleza subjacente a esse tipo de vegetação. Foi quando a Caatinga recebeu importantes botânicos, como Martius, Gardner e Saint-Hilare. Dentre os nascidos no Brasil, exploraram os sertões do Nordeste homens da ciência como Manuel Arruda da Câmara, Francisco Freire Allemão, possivelmente o maior botânico do século XIX, e Theodoro Sampaio, (FREIRE, 1998).

No livro a Flora Brasilienses, Martius descreveu o que observou sobre a rapidez da transformação das plantas, após seu contato com a umidade:

“Eu vi as catingas perto da margem do Rio Verde e de outros rios que se espalham pelo verde do Rio São Francisco, na província de Minas Gerais, onde sempre produzem folhagens. Quando, na verdade, se apoiam num solo árido, o que já foi lembrado, podem atrasar o desenvolvimento do ornamento durante um ou mais anos. Na verdade, é sempre muito semelhante, a chuva cai ou o orvalho é frequente, e folhas maravilhosas brotam rapidamente. Daí facilmente pode acontecer que numa tarde quente tu te depare com uma árvore sem folhas e, se tiver chovido durante a noite, no dia seguinte encontres a árvore mudada” (MARTIUS, 1896, p.51).

O Brasil, nos limites de seu vasto território, abriga uma admirável diversidade florística e faunística, que em muito se deve a sua igualmente

admirável variedade geomorfológica. Na interação desses fatores, encontramos paisagens e processos ecológicos que se desenvolvem ao longo de alguns milhões de anos e que constituíram as feições naturais do nosso país (SIQUEIRA-FILHO, 2012). Além disso, abriga a flora mais megabiodiversa do mundo (FORZZA et al., 2012), sendo a Caatinga um dos últimos ecossistemas do país insuficientemente conhecidos em termos botânicos, que por contradição reúne uma ampla variedade de formações vegetacionais e abriga um número expressivo de táxons raros e endêmicos (GIULIETTI et al., 2005).

A Caatinga é um bioma rico em recursos genéticos e alta biodiversidade, quando comparada a outras regiões semiáridas no mundo, variada cobertura vegetal, em grande parte determinada pelo clima, relevo e embasamento geológico, que em suas múltiplas inter-relações, caracteriza-se por apresentar sistemas ecológicos bastante variados (QUEIROZ et al., 2006).

A Caatinga no Nordeste do Brasil está localizada entre os paralelos de 2°54'S e 17°21'W (PRADO, 2003). Ocupa uma área de cerca de 844.453 km² o equivalente a 11% do território nacional (MMA, 2015) e destaca-se por sua grande riqueza de ambientes e espécies, sendo que muitas delas espécies ocorrem somente neste bioma, tratando-se de uma área mais biodiversa do mundo. Ainda de acordo com o Ministério do Meio Ambiente (2003), a Caatinga apresenta elevada heterogeneidade vegetal caracterizada por distintas fisionomias e elevado endemismo, fazendo deste um ambiente de extrema importância biológica.

Sua área corresponde a 54% da região Nordeste e constitui o chamado Polígono das Secas, incluindo os estados que abrangem o Rio São Francisco. A precipitação varia majoritariamente de 240 a 900 mm.ano⁻¹ e os solos variam de moderadamente fértil, salino e raso arenoso, pobres e profundos, tanto em escala de paisagem quanto regional (SAMPAIO, 1995).

Grande parte do patrimônio biológico dessa região não é encontrada em nenhum outro lugar do mundo além do Nordeste do Brasil. Essa posição única entre os biomas brasileiros não foi suficiente para garantir à Caatinga o destaque que merece. Ao contrário, a mesma tem sido sempre colocada em segundo plano quando se discutem políticas para o estudo e a conservação da biodiversidade do país (TABARELLI, 2003).

A variação da estrutura vegetacional é condicionada pela topografia, perturbação humana e, sobretudo, por uma combinação da precipitação média anual e atributos do solo (PRADO, 2003). São descritos 12 diferentes tipos vegetacionais (ANDRADE-LIMA, 1981), constituída por manchas de floresta sazonalmente seca e vegetação esclerófila (MOONEY et al., 1995), predominantemente formadas por espécies lenhosas de pequeno porte, herbáceas decíduas, plantas caducifólias e espécies espinhosas, como as representantes da família Cactaceae (TAYLOR, 2004).

Nas classificações, tem sido descrita como uma vegetação aberta, formando parques e facultando o trânsito por toda a parte, com o solo coberto de relva áspera (LUETZELBURG, 1922) e com plantas arbustivas e arbóreas atrofiadas e esparsas (ANDRADE- LIMA 1981). O porte reduzido e a fisionomia aberta da vegetação tem sido um dos critérios para classificar várias regiões da Caatinga como núcleos de desertificação. (SAMPAIO et al., 2009).

Devido às elevadas taxas de diversidade taxonômica e de endemismo, faz-se necessário um melhor conhecimento de sua flora para possíveis medidas de conservação de suas áreas. Além disso, tem um imenso potencial para a conservação de serviços ambientais, uso sustentável e bioprospecção que, se bem explorado, será decisivo para o desenvolvimento da região e do país. A biodiversidade da Caatinga ampara diversas atividades econômicas voltadas para fins agrosilvopastoris e industriais, especialmente nos ramos farmacêutico, de cosméticos, químico e de alimentos (PRADO, 2003).

2.2 Biodiversidade, Conservação e Preservação

O termo diversidade corresponde a um dos aspectos do conceito mais amplo de biodiversidade ou diversidade biológica (RICKLEFS, 2003), significando o número e a variedade de espécies presentes em uma determinada zona, sendo resultado de longo processo de evolução na biosfera, na qual mudanças, particularmente as climáticas, foram constantemente acompanhadas de catástrofes consideráveis, que moldaram o curso da evolução (TABARELLI, 2005).

A diversidade tem componentes regionais e locais e pode ser medida em níveis espaciais. A diversidade local, também chamada de diversidade alfa,

corresponde ao número de espécies em uma pequena área de habitat homogêneo. A diversidade regional, conhecida como diversidade gama é o número total de espécies observado em todos os habitats em uma área geográfica, que não inclui fronteiras significativas para a dispersão de organismos. A diferença ou substituição nas espécies de um habitat para outro é a diversidade beta (RICKLEFS, 2010).

Todos os níveis de diversidade biológica são necessários para a sobrevivência da espécie humana, bem como para a manutenção dos processos naturais ocorrentes em todas as comunidades, visto que são as espécies que fornecem as matérias-primas demandadas para alimentação, abrigo e medicamentos aos seres humanos (ODUM, 1988).

No semiárido brasileiro, região que abrange áreas com precipitações médias anuais inferiores a 800 mm e onde a Caatinga é o principal tipo vegetacional, a biota é rica e diversificada, formada por um mosaico de arbustos espinhosos e de florestas sazonalmente secas, com mais de 2.000 espécies de plantas vasculares, peixes, répteis, anfíbios, aves e mamíferos (LEAL et al., 2003). O endemismo nesse grupo varia entre 7 a 57% na Caatinga. Velloso et al. (2002) propuseram oito ecorregiões para esse ecossistema: Complexo de Campo Maior, Complexo Ibiapaba-Araripe, Depressão Sertaneja Setentrional, Planalto da Borborema, Depressão Sertaneja Meridional, Dunas do São Francisco, Complexo da Chapada Diamantina e Raso da Catarina. Logo, a Caatinga apresenta características particulares que exigem um tratamento diferenciado diante de outros biomas brasileiros (GUSMÃO, 2006). É ainda considerada uma das últimas áreas selvagens do planeta, no mesmo patamar de importância do Planalto e da Amazônia (MITTERMEIER et al., 2002), com considerável número de espécies endêmicas (CASTELLETTI et al., 2004)

São reconhecidos pelo menos três tipos estruturais de vegetação: a Savana-Estépica Arborizada, composta de vegetação com indivíduos arbustivos-arbóreos baixos e com clareiras entre eles; a Savana-Estépica Parque, que apresenta características fisionômicas mais típicas, com vegetais de um mesmo ecótipo bastante espaçados e plantas lenhosas pouco desenvolvidas sobre denso tapete gramíneo lenhoso; e a Savana-Estépica

Florestada com vegetação variando de 5 a 7m de altura, mais ou menos densa, com decidualidade na época seca (SENSO IBGE, 2010).

Queiroz et al. (2013) citaram a ocorrência de 5.344 espécies de angiospermas na região semiárida, distribuídas em diferentes tipos de vegetação, sob diversas influências edáficas, climáticas e topográficas, o que resulta em um elevado número de espécies, que podem ocorrer em mais de um ambiente, sendo que 1.834 espécies (34,3%) ocorrem nos Campos Rupestres; 1.512 (28,3%) na Caatinga típica; 1.362 (25,5%) nas florestas; 1.193 (22,3%) no Cerrado; 483 (9,0%).

O Brasil, apesar de ter um patrimônio florístico reconhecido no âmbito mundial, ainda não dispõe de um inventário florestal nacional para subsidiar a formação de políticas públicas que estimulem a conservação e o uso sustentável dos recursos florestais (SILVA, 2014). Entretanto, a manutenção da sustentabilidade global e a conservação da diversidade têm se tornado, nos últimos tempos, uma das principais preocupações da humanidade.

Face ao alto grau de degradação das áreas da Caatinga e a manifesta preocupação de especialistas para com o crescente processo de desertificação que está se instalando na região, que dificilmente será revertido, há necessidade urgente de coibição de desmatamentos predatórios e de disciplinamento da ocupação territorial do semiárido brasileiro, visto que essa região sofre, historicamente, pela falta de políticas públicas adequadas à proteção de seus recursos naturais, em especial, a preservação da vegetação nativa (ARAÚJO FILHO, 2010).

A Caatinga cobria originalmente quase um milhão de hectares, sob clima predominantemente semiárido, mas com grande variação de situações ambientais. A disponibilidade hídrica varia dos poucos dias de reserva nos solos rasos, após as chuvas erráticas, até as águas permanentes das lagoas, e a disponibilidade de nutrientes varia dos solos férteis e profundos aos pouco férteis e rasos (GRIZ, 2009). Essa variabilidade permite o surgimento de uma flora muito diversificada, com pelo menos 5.000 espécies de fanerógamas, e fisionomias que vão dos lajedos descobertos, passando pelos campos de herbáceas até as matas densas. Predominam as Caatingas arbustivas e relativamente abertas. Cerca de 40% da área original ainda estão cobertos de vegetação nativa, mas quase toda ela é usada para a extração de lenha, como

pastagem nativa para criação dos rebanhos de bovinos, caprinos e ovinos, ou como parte do sistema de agricultura itinerante, formando um imenso mosaico de áreas em distintos estádios de regeneração. De acordo com Leal, 2003, as áreas de vegetação mais preservada são poucas, a maioria está fragmentada e geralmente localizadas nos pontos mais inacessíveis.

Apesar de tanta riqueza, a Caatinga tem sido profundamente modificada pelo homem. Estudos indicam que os solos nordestinos estão sofrendo um processo intenso de desertificação (SÁ et al., 2010) devido á substituição da vegetação natural por culturas estabelecidas principalmente por meio de queimadas (CASTELLETTI et al., 2004).

É sabido que a continuidade desse desmatamento tornará impossível a permanência da vida humana e da vida animal na região, em razão do agravamento da problemática natural, com a escassez de água e o conseqüente surgimento de outro problema de difícil reparação, que é a perda da qualidade dos solos, causado pelo surgimento do processo de desertificação na região (SANTANA, 2006). Diante desses problemas, é crescente a preocupação da comunidade científica com políticas ambientais, especialmente, com a proteção dos recursos florestais e hídricos do planeta, visto que a legislação ambiental brasileira, apesar de sua reconhecida vanguardia, não está sendo - na mesma proporção trazida por essa modernidade - cumprida pela sociedade e aplicada efetivamente pelos órgãos responsáveis (SANTANA, 2014).

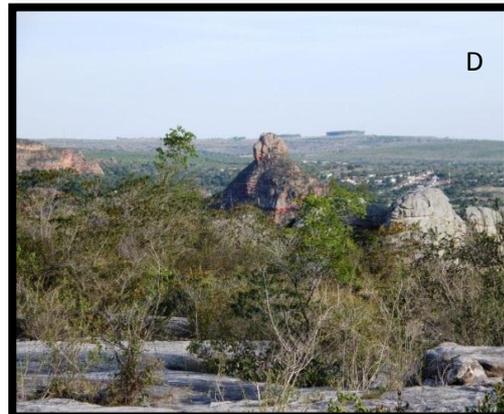
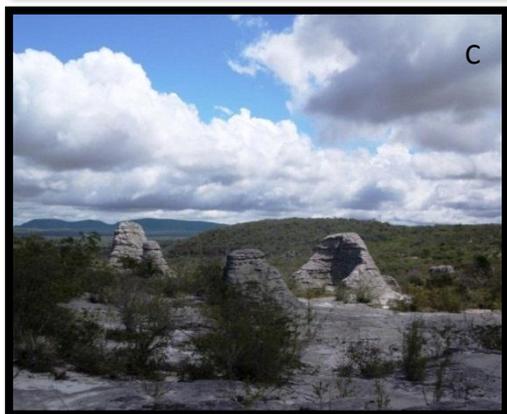
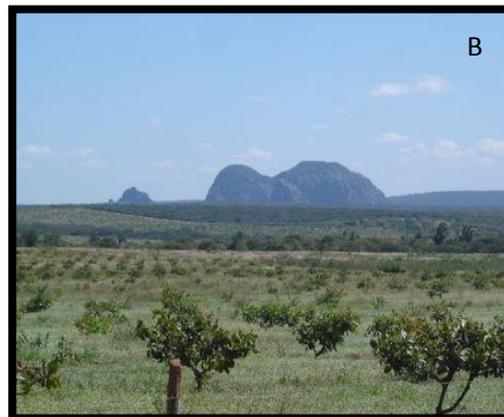
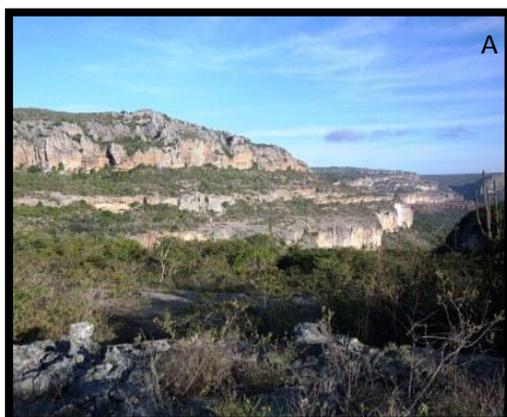
Dentre essas unidades encontramos o Parque Nacional do Catimbau (PARNA Catimbau), criado em 13 de dezembro de 2002 (Figura 1), o qual está inserido em uma região definida como área prioritária para pesquisa científica (BRASIL, 2002). Localizado entre as coordenadas geográficas: 8°24'00" e 8°36'35" S e 37°09'30" e 37°14'40" W, abrangendo total de 62.300km² incluindo parte dos municípios de Buíque (12.438 ha.); Tupanatinga (23.540 ha) na microrregião do Vale do Ipanema, e Ibimirim (24.809 ha) na, microrregião do Moxotó, semi-árido Pernambucano (Figura 2) (RODRIGUES, 2006). A topografia é caracterizada por elevações tabulares em forma de mesetas, que podem variar de 600 a 1000m de altitude, possuindo vales abertos com encostas íngremes e topos aplainados, muito recortados e erodidos (RODAL et al., 1998).

Figura 1. Localização da área de estudo, Parque Nacional do Catimbau (PARNA) município de Buíque, Pernambuco.



Fonte: MELO, 2012

Figura 2. Ilustrações das belezas naturais do Parque Nacional do Catimbau. (A) cânion do Catimbau; (B) morro da pedra do elefante; (C) formações rochosas, (D) pedra do cachorro.



Fonte: Próprio autor, 2015.

Lamentavelmente, assiste-se, à destruição dos recursos naturais do País, em parte por falta de políticas públicas adequadas que garantam o cumprimento e a aplicação dessa legislação seguidos de medidas de punição. Unidades de Conservação são relativamente raras e pequenas, sendo que as de uso indireto cobrem uma pequena fração da área original e estão concentradas em algumas das ecorregiões. As áreas de cristalino da depressão sertaneja são especialmente mal cobertas por Unidades de Conservação (PEREIRA, 2001). Estima-se que cerca de 70% da Caatinga já se encontra alterada pelo homem, e somente 0,28% de sua área se encontra protegida, na forma unidades e parques de conservação (KIILL, 2005). O crescente consumo de energia e de recursos naturais e a produção de rejeitos devido ao aumento da população humana provocam problemas de dimensões globais: o impacto da atividade humana nos sistemas naturais, em muito superior á capacidade de carga desses sistemas, vem causando a interrupção de processos ecológicos e a extinção de espécies, com crescente deterioração do próprio ambiente da espécie humana (RICKLEFS, 2003). A perda de espécies, além de comprometer o funcionamento dos ecossistemas naturais, reduzindo sua capacidade de resistência e regeneração depois de perturbações causadas por ações humanas, constitui verdadeira ameaça aos mais preciosos serviços ambientais prestados pelos ecossistemas, como a manutenção da qualidade da atmosfera, a regulação do clima pela fixação do carbono e do ciclo hidrológico e a qualidade da água (TABARELLI; SILVA, 2002).

2.3 Histórico das Antigas Civilizações e o uso das Plantas

O emprego de essências começou nas antigas civilizações, quando o homem descobriu o fogo e percebeu que ao queimar determinados arbustos e resinas, estas exalavam um aroma intenso (JAKIEMIU, 2008). Durante séculos, centenas de culturas desenvolveram atos simbólicos e religiosos onde plantas aromáticas eram queimadas nos altares dos templos, oferecidas como sacrifícios, em busca de favores dos deuses. Com o passar dos anos as plantas passaram a fazer parte de técnicas de prevenção e de tratamento das

doenças, principalmente de feridas e contusões, como mostram documentos chineses e indianos com mais de 5000 anos (PALHINHA, 2013).

Os alquimistas perceberam que podiam sentir a presença das plantas aromáticas mesmo quando estas já haviam sido retiradas do recinto, devido ao aroma liberado. Isso os levou a buscar a quinta essência da matéria. Paracelsus, alquimista do século XVI, usou vapor para conseguir isolar o que ele chamou de “a alma da planta” ou a quinta essência daquele ser. Portanto, ele conseguiu isolar substâncias que continham o aroma. Essas substâncias, tal qual o óleo, não se misturavam com a água (BLANCO et al., 2015).

Os egípcios deram uma atenção especial aos óleos essenciais, utilizando-os na sua vida diária com fins curativos, em cosméticos e também em outros produtos aromáticos. Normalmente centenas de toneladas de plantas aromáticas eram transformadas em perfumes, principalmente óleos perfumados que eram queimados nos templos. Os gregos foram os maiores consumidores de produtos odoríferos naturais, além disso, se destacavam no uso de óleos aromatizados que eram aplicados em massagens com ação estimulante, sedativa, etc. (HERTWIG, 2012).

Mas foram os persas que inventaram o aparelho de destilação, sendo esse o primeiro equipamento a obter um óleo essencial puro. Os romanos se beneficiaram muito dos conhecimentos gregos quanto à aplicação dos perfumes e dos óleos aromatizados que normalmente eram aplicados após o banho. Acreditavam nas virtudes dos banhos aromatizados com plantas, que usavam para restaurar o vigor sexual e diminuir os efeitos do vinho tomado em excesso (COSTA, 2010).

A evolução da utilização, com base científica, dos produtos naturais tem caminhado junto com a própria evolução da humanidade. Atualmente as pesquisas indicam um forte crescimento do mercado de produtos naturais, apresentando média de crescimento acima de 20% ao ano. Os óleos obtidos diretamente das plantas concorrem diretamente com produtos sintéticos, tendo como principal diferencial o custo. A indústria alimentícia tem se voltado para a utilização de produtos cada vez mais naturais e está preferindo utilizar aromatizantes extraídos de plantas, porém a falta de pesquisa das composições, princípios ativos e toxicidade dos componentes ainda impede que estes sejam utilizados em escala industrial (RIZZINI, 1976).

Farias (2009) relata que as relações que a humanidade mantém com os elementos naturais se desenvolveram no decorrer da história, onde a partir dos progressos alcançados nos métodos de extração e uso, os conhecimentos sobre as plantas foram consideravelmente aumentados. É um fato indiscutível o interesse pelo uso das plantas, dos respectivos extratos, dos óleos essenciais, constituindo, em certas circunstâncias, uma ajuda nos cuidados primários de saúde e um excelente complemento terapêutico, compatível com a medicina clássica.

Na publicação de Barroso et al. (1999) afirma-se que flores, folhas, cascas, rizomas e frutos são matérias-primas para sua produção dos óleos essenciais, a exemplo dos óleos essenciais de rosas, eucalipto, canela, gengibre e laranja, respectivamente. Possuem grande aplicação na perfumaria, cosmética, alimentos e como coadjuvantes em medicamentos. São empregados principalmente como aromas, fragrâncias, fixadores de fragrâncias em composições farmacêuticas e orais, além disso, são comercializada na sua forma bruta ou beneficiada, fornecendo também substâncias purificadas.

De acordo com Faria (2009), os óleos essenciais têm importância comercial no mundo. O Brasil tem lugar de destaque na produção deles, ao lado da Índia, China e Indonésia, que são considerados os 4 grandes produtores mundiais (FURLAN, 2013). No passado, o país teve destaque como exportador de óleos essenciais de pau-rosa, sassafrás e menta. Nos dois últimos casos, passou à condição de importador.

Fernandes (2005) acredita que é importante ressaltar que, além dos incentivos governamentais necessários, mas não suficientes, a formalização de parcerias de Centros de Pesquisa e Universidades com a Iniciativa Privada é fundamental para que técnicas modernas de cultivo, seleção e melhoramento de plantas sejam desenvolvidas e aplicadas, de modo a se obter produtos com qualidade e preço para disputar o mercado internacional. O Brasil destaca-se na produção mundial de óleos essenciais, mas sofre de problemas crônicos como falta de manutenção do padrão de qualidade dos óleos, e baixos investimentos governamentais no setor, que levam ao quadro estacionário atual.

2.4 Óleos Essenciais – Descoberta, Importância e Função

O termo óleo essencial foi definido no século XVI por Paracelso, médico e alquimista suíço, e também podem ser chamados de óleos voláteis, essências, azeites etéreos ou azeites voláteis, caracterizados quimicamente como misturas complexas de compostos de baixo peso molecular, alguns altamente voláteis, capazes de gerar sabores e aromas. Grande parte das propriedades farmacêuticas descritas para plantas medicinais são creditadas aos óleos essenciais (MATOS; MATOS, 1989; TROMBETTA et al., 2005; EDRIS, 2007), que em geral, apresentam baixa estabilidade, principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade e metais.

Segundo a Resolução - RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007, óleos essenciais são produtos voláteis de origem vegetal obtido por processos físicos (destilação por arraste com vapor de água, destilação a pressão reduzida ou outro método adequado). Podem se apresentar isoladamente ou misturados entre si, retificados, desterpenados ou concentrados. Entende-se por retificados, os produtos que tenham sido submetidos a um processo de destilação fracionada para concentrar determinados componentes; por concentrados, os que tenham sido parcialmente desterpenados; por desterpenados, aqueles dos quais tenha sido retirada a quase totalidade dos terpenos (BRASIL, 2007).

São raramente encontrados em gimnospermas, no entanto, são abundantes em angiospermas dicotiledôneas (SIMÕES et al., 2004). Seu armazenamento e secreção dependem da família de plantas, e para tal fim existem estruturas especializadas, tais como pelos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas, canais oleíferos, bolsas lisígenas e esquizolisígenas (MARQUES et al., 2008).

Os OEs se originam do metabolismo secundário das plantas e possuem composição química de enorme complexidade, destacando-se principalmente a presença de terpenos e fenilpropanoides. Sua produção está integrada a fisiologia de todo o vegetal, por isso sua composição fitoquímica e quantidade dependem de enzimas específicas que catalisam a produção de compostos voláteis em um órgão, do estágio de desenvolvimento e de estresses abióticos como a salinidade do solo, umidade e temperatura (GONÇALVES et al., 2003; SILVA et al., 2003).

O metabolismo vegetal classifica-se como um conjunto de reações químicas que estão ocorrendo constantemente em cada célula. A presença de enzimas específicas garante certa direção a essas reações, o que se denomina rota metabólica. Essas reações visam primeiramente o aproveitamento de nutrientes para satisfazer as exigências fundamentais das células, metabolismo primário. A produção, transformação e acumulação de outras inúmeras substâncias que não necessariamente estão relacionadas de forma direta à manutenção da vida do organismo que as produz, muito embora garantam vantagens para sua sobrevivência e perpetuação de sua espécie em seu ecossistema, são chamadas de metabolismo secundário (SIMÕES et al., 1999).

Estudos realizados comprovam que o meio ambiente no qual a espécie vegetal se desenvolve e o tipo de cultivo, influenciam diretamente a composição química dos OEs. Outros fatores como temperatura, a umidade relativa, a exposição ao sol e o regime de ventos também exercem influência na composição, principalmente em espécies que possuem estruturas de estocagem superficiais (DE MORAIS et al., 2006).

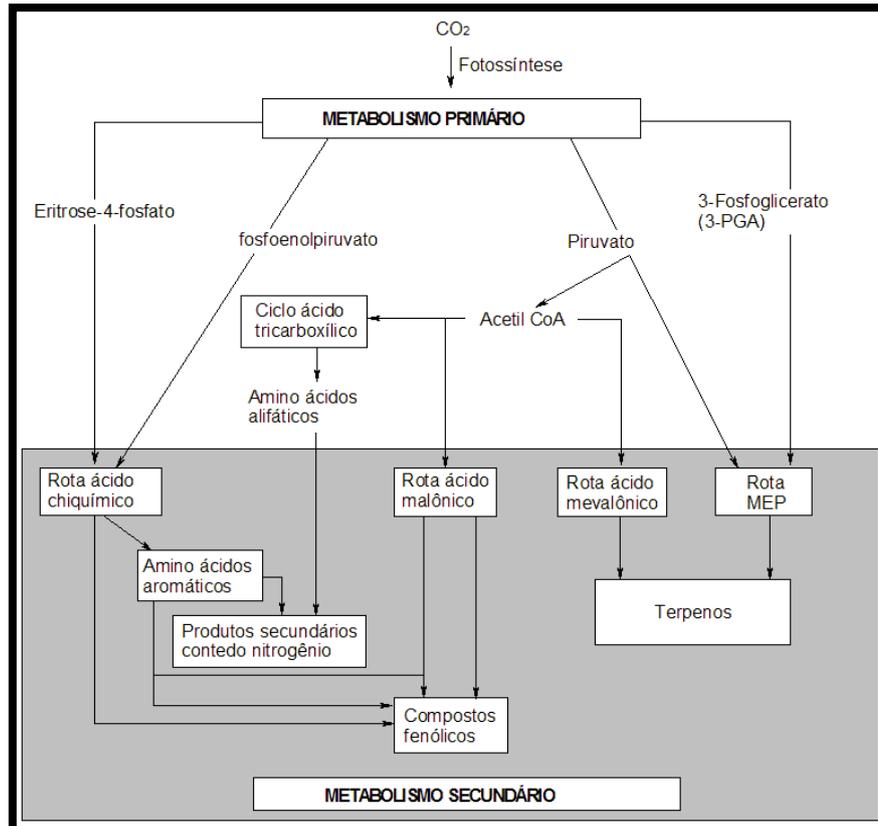
De acordo com, SIMÕES et al. (2003), os OEs são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. A designação de “óleo” é devida a algumas características físico-químicas como a de serem geralmente líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente. Outra característica importante é possuir aroma agradável e intenso, sabor geralmente picante, pode apresentar-se incolores, levemente amarelados ou esverdeados, além disso, são instáveis principalmente na presença do ar, luz, calor, umidade e metais em solventes orgânicos e solubilidade limitada em água, além disso, formam soluções aquosas denominadas hidrolatos (SIMÕES, 2007).

Diferentemente dos metabolitos primários, tais como clorofila, amino ácidos, nucleotídeos, carboidratos simples e lípidos de membrana, os metabolitos secundários, entre eles os OEs geralmente não tem papel reconhecido nos processos de fotossíntese, respiração, transporte, assimilação de nutrientes e diferenciação. Os metabolitos secundários específicos são encontrados em apenas uma espécie de planta ou um grupo de espécies

taxonomicamente relacionadas, ao passo que os metabolitos primários básicos são encontrados por todo o reino vegetal (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Metabólitos secundários de plantas podem ser divididos em três grupos quimicamente distintos: terpenos, compostos fenólicos e compostos contendo nitrogênio. Terpenos, os quais são os principais constituintes dos óleos essenciais, são sintetizados a partir da rota do ácido mevalônico ou de intermediários básicos da glicólise (Rota MEP), conforme esquematizado na Figura 3. De acordo com a biologia da evolução, as defesas das plantas devem ter surgido do fenômeno de mutação hereditária, da seleção natural e das mudanças evolucionárias. Essas mutações possibilitaram novos compostos tóxicos aos herbívoros e micro-organismo patogênicos. Uma vez que o custo energético da produção destes compostos foi sustentável, eles deram as plantas maior aptidão. Assim, estas plantas deixaram mais descendentes que outras e transmitiram suas características defensivas às próximas gerações (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Figura 3. Esquema simplificado da principal rota de biossíntese de metabolitos-secundários e suas interações com o metabolismo primário.



Fonte: TAIZ; ZEIGER (2002)

Os óleos essenciais das plantas foram considerados por muito tempo como “desperdício fisiológico” (KNOBLOCH et al., 1986), ou mesmo produtos de desintoxicação, como eram vistos os produtos do metabolismo secundário (MOTHES, 1980). Atualmente, é atribuída aos OEs a existência de funções ecológicas assim como fisiológicas, tais como inibir o crescimento de plantas competitivas (alelopatia), proteger as plantas para evitar o ataque dos herbívoros, proteger a planta contra a perda de água e controle da temperatura. Os OEs também têm se mostrado eficientes na atração de insetos polinizadores (CRAVEIRO; MACHADO, 1986; HARBORNE, 1993).

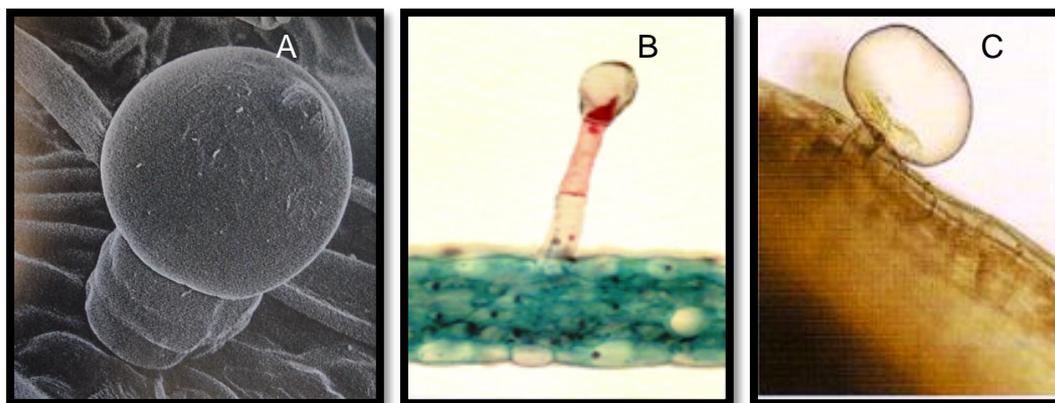
Os óleos voláteis ocorrem em diferentes órgãos das plantas, tais como tricomas glandulares, dutos e cavidades secretoras ou células oleosas encontradas no tecido da planta (SILVA, 2011). As estruturas onde se encontram podem estar localizadas em algumas partes específicas da planta ou em toda ela. Assim, localizam-se em diversas partes, tais como: na parte aérea, nas flores, nas folhas, nos frutos, na madeira, nas raízes e nos rizomas (HOSTETTMANN, 2003). Segundo Melo (2015) os óleos normalmente elaborados nas folhas, armazenados em espaços extracelulares, entre a cutícula e a parede celular.

A Figura 4 ilustra cortes histológicos capazes de visualizar tricomas e glândulas secretoras. Pode-se visualizar também, a fotografia da glândula capilar de uma folha jovem de um girassol (*Balsamorhiza sagittata* (Pursh) Nutt). obtida com microscópio eletrônico, supõe-se que os terpenos sejam sintetizados nas células capilares e armazenados na parte arredondada do topo. Esta “porção arredondada” é um espaço extracelular que se forma quando a cutícula e uma porção da parede celular se projetam para fora do restante da célula. Pode-se afirmar que a biossíntese de óleos essenciais ocorre normalmente nos tricomas glandulares que estão distribuídos em quantidades diferentes por toda a planta, mas que na maioria das plantas ocorrem principalmente nas folhas e cálices (TAIZ, 2004).

De acordo com COSTA, (2005) nos últimos anos a extração de OEs tem merecido destaque na pesquisa científica, com o intuito de se descobrir novas substâncias, assim como na indústria, para se obter produtos de interesse já consagrados. Óleos essenciais extraídos de diferentes partes de uma mesma planta, apesar de apresentarem cor e aspecto semelhantes, podem apresentar

composição química, características físico-químicas e odores diferentes (ROBBERS et al., 2013).

Figura 4. Fotografias da glândula capilar da folha jovem do girassol (*Balsamorhiza sagittata* (Pursh) Nutt.) x1105 (A), e do corte histológico demonstrando o tricoma (B) e glândula capilar (C).



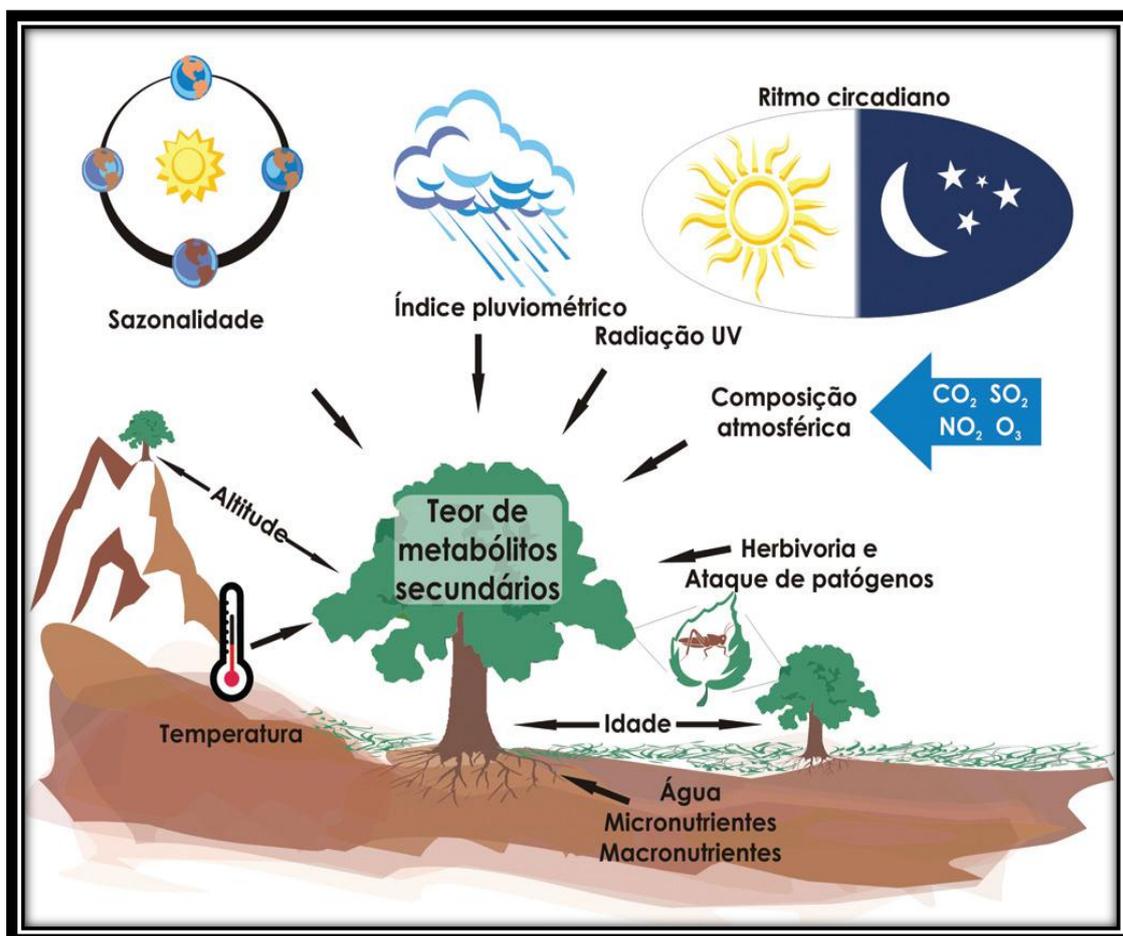
Fonte: J.N.A. Lott/Biological Photo Service (2004); SVOBODA (2013).

Embora extraído do mesmo órgão de uma mesma espécie vegetal, a composição química de um óleo essencial pode variar significativamente, dependendo ainda de fatores como a época de coleta. As espécies apresentam épocas específicas em que contêm maior quantidade de óleos voláteis no seu tecido, podendo esta variação ocorrer tanto no período de um dia como em épocas do ano (MATUDA, 2005) e de acordo com o estágio de desenvolvimento e condições climáticas e de solo (Figura 5). O aroma agradável e intenso presente na maioria dos óleos voláteis faz com que estes sejam chamados de essências. Eles também são solúveis em solventes orgânicos pouco polares, como éter, recebendo, por isso, a denominação de óleos etéreos.

As condições climáticas regionais, tais como temperatura, luminosidade e altitude, aliadas às condições encontradas no solo, como pH, disponibilidade de nutrientes e umidade, as chamadas condições edáficas, influenciam no rendimento e na qualidade do óleo. Condições edafoclimáticas adequadas a cada espécie vegetal são importantes para promover o máximo rendimento de óleo essencial, bem como influenciam na relação percentual entre seus

compostos (LIMA, 2014). De acordo com Lima (2003) e Araújo (2005), assim como, todos os produtos naturais, óleos essenciais apresentam uma enorme diversidade estrutural que resulta num grande variedade de compostos semelhantes aos terpenos (terpenóides).

Figura 5. Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários nas plantas.



Fonte: GOBBO-NETO, L. et al., (2007)

Na química dos óleos essenciais, o grande desafio é elucidar as estruturas dos seus constituintes de interesse (CSEKE et al., 2006). Segundo, Silva (2014), em média, o óleo conter aproximadamente cem componentes. Os principais são hidrocarbonetos, álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas e fenóis. Embora a tecnologia tenha permitido identificar mais compostos, ainda existem muitos para serem elucidados (DODT, 1996).

2.5 Fatores de Influência no conteúdo e Composição Química dos OEs.

Desde o quarto século a.C. existem relatos de normas para a coleta de plantas medicinais. Os carrascos gregos, por exemplo, coletavam suas amostras do veneno cicuta (*Conium maculatum*) pela manhã, quando os níveis de coniina são maiores (ROBINSON, 1974). Variações temporais e espaciais no conteúdo total, bem como as proporções relativas de metabólitos secundários em plantas ocorrem em diferentes níveis (sazonais e diários; intraplanta, inter- e intraespecífica) e, apesar da existência de um controle genético, a expressão pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos (HARTMANN, 1996).

Os óleos essenciais representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto, sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais (KUTCHAN, 2001). Deve ser enfatizado, porém, que os estudos sobre influência destes fatores na produção de metabólitos secundários geralmente têm se limitado a um grupo restrito de espécies, predominantemente ocorrentes em regiões semiáridas, muitas das quais são comercialmente importantes e podem ter sofrido fortes pressões seletivas antrópicas visando certas características desejadas, como no caso das espécies encontradas no Bioma Caatinga. Seu comportamento, portanto, nem sempre é representativo de plantas selvagens ou de outros tipos de habitat. Também deve ser ressaltado que, muitas vezes, as variações podem ser decorrentes do desenvolvimento foliar e/ou surgimento de novos órgãos concomitante a uma constância no conteúdo total de metabólitos secundários. Isto pode levar à menor concentração destes metabólitos por diluição, podendo, no entanto, resultar em maior quantidade total, devido ao aumento de biomassa (HORNER, 1997).

Além disso, alguns dos fatores apresentam correlações entre si e não atuam isoladamente, podendo influenciar em conjunto no metabolismo secundário, como por ex.: desenvolvimento e sazonalidade; índice pluviométrico e sazonalidade; temperatura e altitude, entre outros.

2.6 Fatores - Sazonalidade, Ritmo Circadiano e Desenvolvimento, Temperatura, Radiação Ultravioleta, Altitude e Poluição Atmosférica.

A época em que uma amostra biológica é coletada é um dos fatores de maior importância, visto que a quantidade e, às vezes, até mesmo a natureza dos constituintes ativos não é constante durante o ano. Existem, também, cada vez mais estudos mostrando que a composição de metabólitos secundários de uma planta pode variar consideravelmente durante o ciclo dia/noite, tendo sido descritas, por exemplo, variações circadianas nas concentrações de óleos voláteis (LOUGHRIN, 1990).

Segundo Hall (2007), os efeitos da sazonalidade podem ser confundidos com alterações metabólicas sob controle hormonal do processo de desenvolvimento da planta. Sabe-se que tecidos mais novos geralmente possuem maior taxa biossintética de metabólitos, tais como óleos essenciais, lactonas sesquiterpênicas, ácidos fenólicos, alcaloides e flavonoides. Segundo Gershenzon (2010) frequentemente há uma correlação inversa entre alta atividade metabólica e produção de aleloquímicos, isto é, um decréscimo na produção de metabólitos secundários (derivados fenólicos) em períodos de crescimento tecidual rápido.

Quanto à temperatura, apesar de cada espécie ter se adaptado ao seu habitat, as plantas frequentemente são capazes de existir em uma considerável faixa de temperatura (HÖFT, 2009). A faixa em que ocorrem as variações anuais, mensais e diárias de temperatura é um dos fatores que exerce maior influência em seu desenvolvimento, afetando, portanto, a produção de óleos essenciais. No entanto, talvez pelo fato da temperatura ser, de modo geral, uma consequência de outros fatores, como altitude e sazonalidade, não existem muitos estudos sobre sua influência isoladamente na produção de metabólitos secundários (SLIMESTAD, 2011) .

A formação de óleos voláteis, em geral, parece aumentar em temperaturas mais elevadas, apesar de dias muito quentes levarem a uma perda excessiva destes metabólitos (GERSHENZON, 2010). De acordo com KOEPPE (2013) o efeito da seca na concentração de metabólitos é, às vezes, dependente do grau de estresse e do período em que ocorre, como no caso de

climas semiáridos, onde, de acordo com estudos, os efeitos a curto prazo parecem levar a uma produção aumentada, enquanto a longo prazo é observado um efeito oposto (PERRY, 2008). Outro fator é que a chuva contínua pode resultar na perda de substâncias hidrossolúveis das folhas e raízes por lixiviação; sabe-se que isto se aplica a algumas plantas produtoras de alcalóides, glicosídeos e até mesmo óleos voláteis.

Fatores fisiológicos críticos, tais como fotossíntese, comportamento estomatal, mobilização de reservas, expansão foliar e crescimento, podem ser alterados por estresse hídrico e, conseqüentemente, levar a alterações no metabolismo secundário (SALISBURY, 1991). Os efeitos da chuva na vegetação devem ser considerados em relação ao índice anual, sua distribuição pelo ano, seu efeito na umidade e seu efeito conjunto com a capacidade de absorção de água do solo (EVANS, 2010).

Gershenson (2010) afirma que conforme mencionado, o estresse hídrico frequentemente tem conseqüências significantes nas concentrações de metabólitos secundários em plantas, e há vários relatos de que estas condições geralmente levam a um aumento na produção de vários tipos de metabólitos secundários.

A Radiação UV é um importante fator, já que as diferentes espécies de plantas estão adaptadas a uma enorme variação na intensidade e quantidade de incidência luminosa (SALISBURY, 2007). Além disso, existe uma crescente preocupação com os efeitos do aumento de radiação UV-B (280–320 nm), decorrente da depleção da camada de ozônio. Existe uma correlação positiva bem estabelecida entre intensidade de radiação solar e produção de compostos fenólicos, tais como flavonoides, tanino, e antocianinas (MEDINA, 2012) Estudos mostram que a intensidade de luz é um fator que também influencia a concentração e/ou composição de outras classes de metabólitos secundários, como terpenóides, glicosídeos cianogênicos e alcalóides (HIRATA, 2013).

A altitude também exerce efeitos sobre o desenvolvimento e a produção de óleos voláteis em plantas, apesar de existirem relativamente poucos estudos neste sentido, o que se sabe, é que há uma correlação positiva entre o conteúdo total de flavonóides e a altitude. Esta correlação pode ser explicada pela maior susceptibilidade à radiação UV em altitudes maiores, uma vez que,

conforme comentado anteriormente, os flavonóides são reconhecidos por propiciarem proteção à radiação e seus efeitos. Porém, metabólitos não fenólicos também podem ser influenciados pela altitude (YAMAURA, 2012).

Quanto a poluição atmosférica, Lokar (2009), assegura que, as possíveis alterações estão relacionadas aos níveis elevados de O₃ ou de CO₂ e essas condições podem interferir no metabolismo secundário dos vegetais, principalmente nos derivados fenólicos.

2.7 Influência do Solo e Seus Nutrientes Na Constituição Dos OEs.

A grande maioria dos estudos sobre influência de nutrientes no solo está correlacionada com intensidade de luz incidente e voltada para discussões sobre alocação de recursos (hipóteses de balanço carbono/nutrientes), as quais visam estabelecer uma relação entre as disponibilidades de nitrogênio, carbono e luz (KORICHEV, 2000). Nestes estudos, de modo geral, a produção de metabólitos secundários (exceto os nitrogenados) mostra uma correlação positiva com a proporção carbono/nutrientes (C/N) no solo, isto é, em solos pobres em nutrientes, paralelamente à menor taxa de crescimento, geralmente se verifica maior produção de metabólitos secundários, particularmente derivados fenólicos (LOPES, 2008). Contudo, estas hipóteses não foram totalmente comprovadas, existindo resultados controversos e tentativas de refinamento das hipóteses de balanço C/N.

Observa-se que estresse nutricional usualmente resulta em aumento nas concentrações de metabólitos secundários, exceto no caso da deficiência de nitrogênio e enxofre, em que a produção de metabólitos secundários contendo estes elementos é diminuída (DUSTIN, 2011). A produção global de metabólitos nitrogenados por uma planta (alcalóides, glicosídeos cianogênicos e glucosinolatos) geralmente é aumentada com a maior disponibilidade de nitrogênio no solo (DEMENT, 2009). Entretanto, como consequência do aumento da biomassa da planta, a concentração destes nos tecidos pode diminuir. Além disso, existem evidências de que não é somente a disponibilidade ambiental de nitrogênio em si que influencia o metabolismo secundário, mas sim a quantidade deste que é incorporada aos tecidos da planta (PITAROKILI, 2004).

Cuandra et al. (2012) afirmam que em solos ácidos, devido a uma redução na taxa de conversão de amônio a nitrato, a incorporação de nitrogênio pode ser inibida, o que tem sido utilizado para explicar estudos que constataram altos níveis de produção de metabólitos secundários (especialmente compostos fenólicos) associados a plantas crescendo nesse tipo de solo. Os níveis de fósforo e potássio, apesar de relativamente pouco estudados, também podem ter efeitos na produção de metabólitos nitrogenados.

Uma correlação bem estabelecida, é que menores quantidades de metabólitos fenólicos são produzidas em condições de fornecimento abundante de nitrogênio (NEUVONEN, 2012). Os derivados da via biossintética do ácido chiquímico são mais sensíveis a deficiência dos nutrientes (nitrogênio, fósforo, enxofre e potássio) geralmente resultando em menores concentrações dos metabólitos. Por outro lado, os níveis de metabólitos derivados do mevalonato parecem não mostrar correlações consistentes com mudanças na disponibilidade de nitrogênio, fósforo ou potássio (DUDT, 2011).

Estes efeitos, de certo modo, não são totalmente previsíveis; tendências podem ser reconhecidas, mas não é possível estabelecer regras sólidas e estáveis. Por outro lado, apesar da reconhecida influência no desenvolvimento vegetal, poucos estudos mostram relações entre pH ou micro-organismo do solo e metabolismo secundário.

2.8 Correlação – Planta/Patógeno

Na natureza os vegetais estão sujeitos ao ataque de um grande número de inimigos potenciais, devido à grande variedade de vírus, bactérias, fungos, nematoides, insetos, mamíferos e outros herbívoros e patógenos presentes nos ecossistemas e não podem se defender destes simplesmente deslocando-se ou convocando anticorpos para a região do ataque de patógenos, como nos sistemas animais, por isso as plantas dispõem de outras formas de proteção (TAIZ; ZEIGER, 2004).

As plantas além de apresentarem adaptações morfológicas, como a presença de espinhos, depósitos cuticulares, epiderme espessada, abundância de cristais, tricomas e fibras na folha, sintetizam metabólitos secundários que

as defendem contra vários herbívoros e micro-organismo patogênicos (LAM; NG, 2001). Ao longo da evolução as plantas desenvolveram mecanismos sofisticados de respostas a danos e doenças que podem ser induzidos a partir do reconhecimento das agressões, pois demandam um investimento de recursos menor por parte da planta, ou podem já estar presentes constitutivamente, porém, precisam ser ativadas para serem efetivas (TAIZ; ZEIGER, 2004).

As alterações que constituem a resposta de defesa das plantas, devido ao estresse causado por patógenos, têm sido intensamente estudadas com o objetivo de compreender a interação planta – patógeno, contribuindo assim para o melhoramento genético de plantas cultivadas de grande importância econômica (PRITSCH et al., 2000; FLUHR, 2001; DAVIS et al., 2002).

2.9 Indução por Estímulos Mecânicos ou Ataque de Patógenos

Fatores mecânicos aos quais as plantas estão susceptíveis, tais como ferimentos, ou mesmo meros estímulos, causados por chuva, granizo, vento, areia, invasão por patógenos e pastagem de herbívoros, também podem influenciar a expressão do metabolismo secundário (JEONG, 2004).

Danos causados a plantas por ferimentos ou ataque de herbívoros ou patógenos frequentemente levam a uma resposta bioquímica, que reduz a aceitabilidade do órgão ou de todo o organismo a ataques futuros (PICHESKY, 2008). O mais claro exemplo disto, segundo Burns (2002), é a produção de novo de fitoalexinas (compostos geralmente derivados de fenilpropanóides, mas também de terpenóides ou poliacetilenos) em resposta à invasão de patógenos.

Algumas plantas, como tomate e batata, em resposta ao ataque de insetos produzem rapidamente peptídeos inibidores de proteinase, o que pode diminuir significativamente a palatabilidade da planta ou parte dela (HIARATA, 2013). Uma outra forma de defesa induzida, aparentemente bem distinta da anterior, é a resposta a curto ou longo prazo à danificação de tecidos vegetais aumentando a produção e o acúmulo de metabólitos secundários já existentes na planta, levando à fuga dos animais (KORICHEVA, 2000). Este acréscimo é,

às vezes, uma resposta restrita ao órgão danificado, e outras vezes uma resposta mais geral, podendo afetar a bioquímica vegetal como um todo.

Portanto, um distúrbio físico em um local específico pode proporcionar um sinal suficiente para induzir respostas em locais distantes e não estimulados (HERMS, 1992). Schwob et al. (2004) relatam que ocorrem consideráveis aumentos no conteúdo de taninos e iridóides em resposta à danificação de folhas por lagartas. Sabe-se também que o nível de indução pode variar de acordo com o agente causador. De fato, algumas observações têm revelado que injúrias causada por alimentação de insetos podem resultar em uma resposta fisiológica diferenciada, na qual a expressão gênica e/ou formação de metabólitos secundários é induzida especificamente ou mais rapidamente, devido a eliciadores presentes na saliva do inseto (SILVA, 2004).

2.10 Micro-organismos Fitopatógenos

Os micro-organismos causadores de doenças de plantas geralmente interagem com o hospedeiro, invadem seus tecidos, gerando o processo infeccioso, e ao colonizar a planta, retiram desta todos os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento (BATISTA et al., 2007). Os organismos fitopatogênicos, tais como fungos, nematoides, bactérias e vírus causam uma quantidade significativa de doenças em plantas (MONTESINOS, 2003; HORST, 2008).

Os fungos fitopatogênicos, em especial, são responsáveis por perdas consideráveis em culturas economicamente importantes (FLETCHER et al., 2006), além de estarem associados à indução do apodrecimento de frutas e verduras pós-colheita, diminuindo o conteúdo nutricional e aproveitamento destes alimentos (RAY; RAVI, 2005). Os fitopatógenos podem utilizar diversas formas para infectar o hospedeiro, as quais incluem sítios lesionados e aberturas naturais das plantas, tais como os estômatos. Enzimas que hidrolizam matéria orgânica em decomposição também podem ser utilizadas pelos patógenos para invadir os tecidos das plantas por meio da degradação de macromoléculas da parede celular (SLATER et al., 2003). Esses fungos são identificados, em sua maioria, pelos sintomas que provocam e pelos sinais presentes no hospedeiro, que são facilmente observados em campo, tais como

manchas foliares, podridões, ramos secos, exsudações, entre outros (BATISTA et al., 2007). Em geral, os fungos fitopatogênicos causam necrose de tecidos da planta e frequentemente causam a redução do crescimento (nanismo) de órgãos ou da planta inteira (AGRIOS, 2005). Alguns exemplos de sintomas causados por esses fungos estão descritos na (Tabela 1).

Tabela 1. Doenças e sintomas causados por fungos fitopatogênicos.

Patógenos	Sintomas
<i>Aspergillus flavus</i>	Deterioração das sementes (AGROFIT, 2015)
<i>Fusarium moniliforme</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Fusarium solani</i>	Tombamento em plântulas e podridão de espigas de milho; Murcha em diversas plantas; Podridões de raízes em diversas culturas (MICHEREFF, 2001)
<i>Rhizopus stolonifer</i>	Podridão de frutos e sementes (MICHEREFF, 2001)
<i>Verticillium lecanii</i>	Murcha e deterioração em plantas (MICHEREFF, 2001)

Em relação às bactérias fitopatogênicas, elas são importantes patógenos de plantas, não somente pela alta incidência e severidade em culturas de valor econômico, mas também pela facilidade com que se disseminam. Elas penetram nas plantas através de aberturas naturais como estômatos, lenticelas, hidatódios, aberturas florais etc., e também através de ferimentos. Uma vez no interior das plantas, elas podem se multiplicar nos espaços intercelulares ou no tecido vascular. Os principais sintomas causados por bactérias fitopatogênicas são: anasarca ou encharcamento, mancha, podridão mole, murcha, hipertrofia, cancro, morte das pontas, talo-ôco e canela preta. As principais fontes de inóculo bacteriano são materiais de propagação infectados, solo infestado, restos culturais infectados e plantas infectadas ou infestadas. A disseminação a longa distância ocorre, principalmente, por meio do transporte de órgãos vegetais infectados, como sementes, tubérculos, estacas e frutos. A curta distância, a disseminação ocorre pela água de chuva, vento, insetos vetores, irrigação e pelo homem, através dos tratos culturais (MICHEREFF,

2001). Algumas doenças e sintomas causados por essas bactérias fitopatógenas estão descritas na Tabela 2.

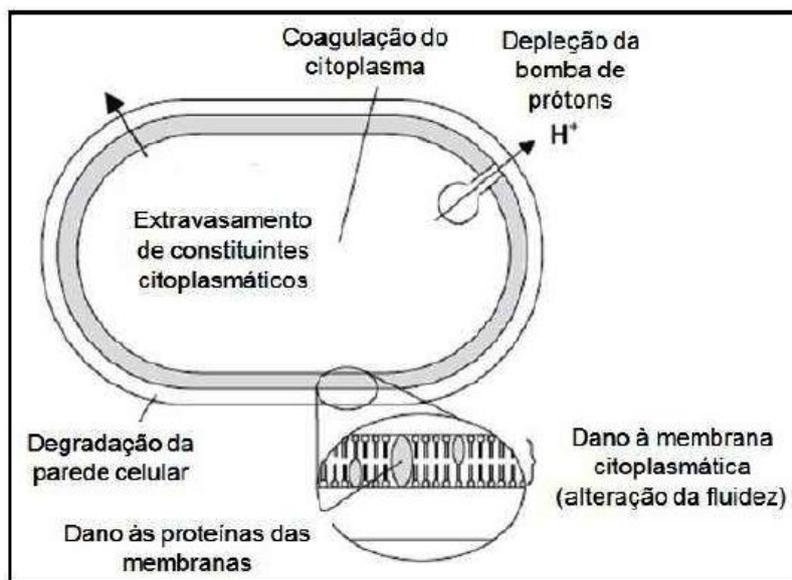
Tabela 2. Doenças e Sintomas causados por bactérias fitopatógenas.

Patógenos	Doenças/Sintomas
<i>Acidovorax citrulli</i>	Mancha-aquosa-do-melão (OLIVEIRA, 2003)
<i>Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum</i>	Podridão- Mole (PÉROMBELON; KELMAN, 1980)
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Murchas vasculares com sintomas externos e internos (MICHEREFF, 2001)
<i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i>	Podridão negra (MICHEREFF, 2001)
<i>Xanthomonas campestris pv. malvacearum</i>	Lesões nas folhas, rasgadura do limbo foliar e possui aspecto de podridão (CIA; SALGADO, 2005)
<i>Xanthomonas campestris pv. viticola</i>	Folhas com pontos necróticos, manchas escuras e alongadas nas nervuras e pecíolos das folhas, nos ramos e ráquis dos frutos (NAYUDU, 1972)

2.11 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais

Os alvos e mecanismos de ação dos óleos essenciais sobre uma célula bacteriana estão em sua maioria associados a processos ligados á membrana celular, como o transporte de elétrons e gradiente de íons, translocação de proteínas, fosforilação e outras reações dependentes de enzimas (DORMAN; DEANS, 2000). Esses mecanismos ainda não são bem compreendidos. Considerando o grande número de constituintes químicos presentes em sua composição, é natural que sua ação antimicrobiana não seja mediada por única via específica, podendo haver a participação de mais de um componente de diferentes formas, como mostra a Figura 6 (BURT, 2004).

Figura 6. Esquema do mecanismos propostos para a ação antimicrobiana dos óleos essenciais na célula bacteriana.



Fonte: ARAÚJO FILHO (2010)

O principal mecanismo de ação bactericida descrito pode ser atribuído a sua alta penetrabilidade na membrana citoplasmática, promovendo seu rompimento e aumentando sua permeabilidade não específica, desta forma gerando um extravasamento do conteúdo celular e posterior morte da bactéria (DEVI et al., 2010). Segundo Carson et al. (1995), o mecanismo consiste no comprometimento da integridade da membrana celular, com consequente perda de material intracelular, incapacidade de manter a homeostase e inibição da respiração.

Hammer, Carson e Riley (1998) afirmam que os óleos essenciais apresentam propriedade antimicrobiana sobre a fungos e bactérias, sendo que normalmente as bactérias Gram positivas são mais susceptíveis que as Gram negativas e que baixos valores de concentração inibitória mínima (CIM) inibem o crescimento desses organismos. Desta forma a descoberta das centenas de componentes dos óleos essenciais nas últimas décadas, a complexidade e a enorme diversidade que existe neste grupo de produtos naturais, levou a compreensão parcial das suas atividades biológicas.

2.12 Óleos Essenciais com Potencial de uso no Controle de Pragas

O controle químico, feito muitas vezes de maneira inadequada ao longo dos anos, traz graves problemas para a saúde do homem, dos animais, e para o meio ambiente, tais como a contaminação da água e do solo. Outra consequência negativa do uso de agrotóxicos é a seleção de raças do patógeno resistentes a doses crescentes (GHINI; KIMATI, 2000). Para minimizar este impacto, a biotecnologia pode contribuir para a busca de produtos alternativos no controle de fitopatógenos, entre eles, o uso de compostos do metabolismo secundário de plantas.

Nos últimos anos, o controle das doenças na agricultura sido realizado basicamente através do emprego de defensivos agrícolas, que geram altos custos e riscos ambientais (desequilíbrio ecológico) e toxicológicos (elevada concentração nos alimentos). Também tem se verificado que o uso intenso desses defensivos tem aumentado à resistência de fitopatógenos, pragas e plantas daninhas a certos agrotóxicos.

Segundo Bettiol (2013), a criação de métodos alternativos para o controle de doenças de plantas tem por finalidade oferecer possibilidades para se diminuir a dependência dos defensivos agrícolas e contribuir para uma prática de uma agricultura que seja mais adequada às novas exigências de qualidade ambiental e de qualidade de vida da sociedade moderna. Segundo Venzon, Júnior e Pallini (2006), o controle alternativo pode ser entendido como a integração de medidas ambientais, visando à redução de doenças e ao aumento da produção, da produtividade e da qualidade dos produtos agrícolas. Existem diversas tecnologias alternativas de controle dentre elas o controle biológico. Esse método alternativo vem crescendo e se expandindo comercialmente. Grigoletti Júnior, Santos e Auer (2000), descrevem o controle biológico como:

O controle biológico visa manter, através de certas práticas, um equilíbrio no agroecossistema, de modo que o hospedeiro, na presença do patógeno, não sofra danos significativos, em função da ação controladora dos organismos não patogênicos do sistema.

Dentre todos os métodos alternativos de controle, a utilização de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais pode ser uma opção viável, em relação do ponto de vista econômico e principalmente ambiental (RODRIGUES et al., 2006). A busca de substitutos para estes produtos sintéticos, tem encontrado nas plantas uma alternativa de interesse econômico e ecológico bastante promissor. O uso de extratos vegetais e óleos essenciais, por exemplo, têm sido fonte de inúmeras pesquisas que comprovam sua eficácia e o emprego desses pode ser uma forma mais sustentável para o uso em pequenas propriedades rurais. Na literatura são encontrados alguns trabalhos sobre o efeito de óleos essenciais de várias plantas no controle de fungos fitopatogênicos (NASCIMENTO et al., 2008; CARNELOSSI et al. 2009; KUMAR et al., 2009; SILVA et al., 2009; SOUZA JÚNIOR et al., 2009; ANARUMA et al., 2010; COMBRINCK et al., 2011; LORENZETTI et al., 2011).

Conforme Mota e Pessoa (2003), a utilização de óleos essenciais de espécies aromáticas e medicinais, isoladas ou em combinação com outros métodos, poderá ter um importante papel no controle de fitopatógenos, contribuindo para a redução do controle químico e, conseqüentemente, um menor impacto ao ambiente. É importante ressaltar o grande papel do uso de óleo essencial na agricultura sustentável, a esses compostos vegetais (especialmente mono e sesquiterpenos) atribui-se o mecanismo de ação à quantidade e variedade dos compostos químicos presentes, o que dificulta a atribuição de um mecanismo de ação específico para a atividade antimicrobiana, (BONNA, 2012).

Nesse contexto, as espécies medicinais recebem atenção especial pelas diferentes atividades que apresentam, sendo alternativas potenciais de uso como fungicidas, herbicidas, inseticidas, e nematicidas (SODAEIZADEH et al., 2010), porém, a composição química, o uso, e a ação de óleos essenciais necessitam de mais pesquisas, pois existe uma grande parcela de plantas brasileiras que ainda não foram pesquisadas, e entre as estudadas, pouco se conhece sobre a composição dos seus óleos essenciais e a ação de seus compostos químicos sobre os fitopatógenos.

2.13 Família Fabaceae, o Gênero *Hymenaea* e a espécie *Hymenaea courbaril* L.

As leguminosas estão presentes entre as plantas mais familiares para as pessoas de diversas partes do mundo. Esse grupo possui distribuição cosmopolita, compreende 727 gêneros e cerca de 19.325 espécies, distribuídas nas subfamílias Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae (LEWIS et al., 2005). Caesalpinioideae é composta de quatro tribos, dentre elas a Detarieae s.l. (POLHILL; RAVEN, 2014) abrangendo 82 gêneros, do qual apenas 20% ocorrem nos Neotrópicos (LEWIS et al., 2005).

Muitas são as plantas dessa família, que usamos como alimento, outras são cultivadas na arborização de ruas e várias apresentam uso medicinal (FRANCIS, 2013). Para a população do meio rural da Caatinga, as leguminosas são mais do que plantas alimentícias ou ornamentais, os sertanejos apresentam uma relação íntima com as leguminosas, sendo as mesmas capazes de produzir pastagens naturais, lenha, material para construção, produtos medicinais e até mesmo fazendo parte de seu folclore e rituais religiosos (ARAÚJO, 2009).

As leguminosas apresentam uma grande diversidade morfológica. No Brasil ocorrem 212 gêneros nativos e 2.719 espécies, estando entre as famílias mais ricas na maioria dos ecossistemas brasileiros, sempre com um conjunto de espécies e gêneros endêmicos (LIMA et al., 2015). Para a Caatinga, segundo GIULIETTI et al. (2005), essa família é a mais diversa. Recentemente no inventário intitulado “Leguminosas da Caatinga” foram encontrados 86 gêneros e 320 espécies, além de 94 táxons intraespecíficos (QUEIROZ, 2014). Segundo a classificação de CRONQUIST (1988), a Ordem Fabales se distribui em três famílias distintas: Caesalpinaceae, Mimosaceae e Fabaceae. O reconhecimento de uma única família com três subfamílias é mais aceito atualmente.

Hymenaea é um dos poucos gêneros da tribo *Detarieae* s.l., e agrega atualmente 14 espécies e 26 táxon (LEWIS et al., 2005), dos quais 23 ocorrem no Brasil (PESTANA, 2010). A delimitação dos táxons de *Hymenaea* é baseada principalmente em caracteres biométricos e reprodutivos que se sobrepõem, sobretudo de folhas, estruturas florais e frutos (LEE; LANGENHEIM, 1975), tornando assim a identificação pouco precisa.

Por isso recentemente, foram examinadas três espécies filogeneticamente relacionadas, levando em consideração os caracteres vegetativos, os dados de distribuição geográfica, espacial e morfológica. Logo, atualmente para *Hymenaea*, são reconhecidas diversas variedades, sendo *H. courbaril* var. *altíssima*, *H. courbaril* var. *courbaril*, *H. courbaril* var. *longifolia*, *H. courbaril* var. *stilbocarpa*, *H. courbaril* var. *subsessilis*, *H. courbaril* var. *villosa* as mais comuns (PESTANA, 2010).

Para o Brasil esse gênero apresenta cerca de 20 espécies, e tem como centro de distribuição a Amazônia (MARCHIORRI, 1997). Pode ser reconhecido pela combinação das folhas bifoliadas com as flores relativamente grandes, com pétalas e frutos robustos, lenhosas e indeiscentes. As flores são relativamente maciças com antese noturna, período no qual liberam um forte odor. Estes caracteres podem ser associados à polinização por morcegos, o que tem sido confirmado por estudos de ecologia da polinização de diferentes espécies do gênero. Além disso, fornecem madeiras valiosas, frutos comestíveis, resina e casca com tanino (QUEIROZ, 2009).

A espécie, *H.courbaril* L. possui no Brasil, uma ampla distribuição, ocorrendo desde a floresta amazônica até a floresta estacional semidecidual no sudeste do país, atualmente são aceitos duas seções e 14 espécies, distribuídas do México à América do Sul e uma na costa leste da África (LEWIS et al., 2005). A espécie em estudo, *Hymenaea courbaril* L. var. *courbaril* é uma espécie clímax da família Fabaceae. Caracteriza-se por ser, semidecídua, heliófita, pouco exigente em fertilidade, que atinge altura de 15-20 m, com tronco de até 1 metro de diâmetro podendo ultrapassar os 30 metros de altura, possuindo folhas compostas, inflorescência em panículas terminais e frutos em forma de vagens indeiscentes, duros e pardo-escuros, apresentando de duas a seis sementes envoltas por uma farinha comestível de grande valor nutritivo (Figura 7), consumida como alimento pelo homem e por animais, principalmente roedores (PRANCE; DA SILVA, 1975; CARVALHO FILHO et al., 2003; GORCHOV; PALMEIRIM; ASCORRA, 2004).

Figura 7. Aspectos gerais de *Hymenaea courbaril* L. var. *courbaril* (A) Hábito da planta (árvore), (B) indivíduo em floração, (C) detalhe da folha, (D) frutos, (E) Excicata tombada no Herbário IPA.



Fonte: Próprio autor, 2015

Hymenaea courbaril L. var *courbaril*, possui um amplo histórico de utilização pelos indígenas da floresta tropical e é popularmente conhecido como jatobá, burandã, farinheira, jataí, jutaí, jataíba, jataiba-peba, jataíba-uva, jataúba, juteí, jataí-amarelo, jataí-vermelho, jatal, jati, jassaí, jatobá de anta, jatobá de porco, árvore-copal-do-Brasil, abotii-timbaí e jataici (LORENZI, 2002; LORENZI; MATOS, 2002; PINTO; MADURO, 2003).

Os frutos contêm uma polpa que origina uma farinha muito nutritiva, consumida pelo homem e pelos animais silvestres (LORENZI, 2006), além de produzir sementes com abundância e regularidade sendo espécie com possibilidade de uso comercial (VELOSO, 1991) além disso, segundo AGAREZ (1997) apresenta indicação como medicinal, produzindo óleo essencial, taninos, materiais resinosos e pécnicos, amido e açúcares, sendo as cascas e folhas utilizadas no tratamento de diarreias, cólicas intestinais, cistite, tosses, bronquite e asma. Apresenta súber áspero, acinzentado, com folhas compostas, alternas, pecioladas, bifoliada, coriáceas, falciformes ou ovais. Possui inflorescência em panículas terminais e frutos do tipo legume indeiscente, lenhoso, de cor verde quando imaturo, marrom escuro quando maduro e preto quando velho, e com 8 a 15cm de comprimento. As sementes, em número de 2 a 6 ou mais por fruto, estão envoltas por uma farinha comestível de grande valor nutritivo, consumida principalmente pela população carente e por animais roedores (GORCHOV et al., 2014). A madeira é muito dura, resistente e bastante comercializada, assim como os frutos (GRISI, 2008). Pode ser plantado desde a condição de bordas e clareiras até fechamento de dossel. Em razão dos frutos desta espécie serem muito procurados pela fauna, ela é extremamente útil nos plantios de áreas degradadas destinadas à recomposição da vegetação arbórea (LORENZI, 2006).

A espécie *H. courbaril* vem sendo foco de várias pesquisas, grande parte delas associadas a estudos agronômicos e fitoquímicos, pois além de sua madeira de qualidade, seus frutos apresentam substâncias com propriedades biológicas, como os taninos (NOGUEIRA et al., 2001). Além disso, vários estudos comprovam as atividades, como demonstrado na tabela 3 o que valida sua longa história de uso medicinal.

Tabela 3. Atividades biológicas realizados com *Hymenaea courbaril* L. var. *courbaril*.

Atividades	Tecidos da planta	Referências
Antimicrobianas	Folhas	BRAGA et al., 2000
Antifúngica	Folhas e frutos	AGUIAR et al., 2010
Antioxidante	Folhas, frutos e resina	DO ROSARIO et al., 2011
Anti-inflamatória	Folhas e frutos	MENEZES, 2011
Antiplasmódica	Folhas e frutos	CECILIO et al., 2012
Larvicida	Folhas e frutos	MARTINS et al., 2010
Moluscicida	Folhas, frutos, cascas	BASTOS et al., 2011

Devido á carência de estudos, o presente trabalho se propôs a investigar a atividade antimicrobiana, antifúngica, inseticida e repelente do óleo essencial de *H. courbaril* L. *courbaril* a fim de produzir dados científicos como subsídio para comprovar que o mesmo, além de ser largamente utilizado e estudado na terapêutica humana, apresenta resultados promissores também como produto fitossanitário natural. E dessa forma, esclarecer que o controle alternativo utilizando óleos essenciais, pode ser considerado uma tecnologia viável para pequenos produtores rurais, ou para aqueles interessados no cultivo orgânico, podendo assim fornecer subsídios para o desenvolvimento de um novo defensivoagrícola.

Objetivos

1. Objetivo Geral

Avaliar comparativamente a variabilidade química, a atividade antimicrobiana e inseticida de quatro amostras de *Hymenaea courbaril* L. var. *courbaril* coletadas em diferentes fitofisionomias do Parque Nacional do Catimbau-Pernambuco, Brasil.

2. Objetivos Específicos

- ✓ Extrair o óleo essencial das folhas de quatro indivíduos de *Hymenaea courbaril* L. var. *courbaril* utilizando a técnica de hidrodestilação;
- ✓ Comparar quatro amostras, coletadas em diferentes áreas, quanto ao rendimento;
- ✓ Analisar a composição química dos óleos essenciais pela técnica de Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetria de massa (CG-EM);
- ✓ Averiguar o potencial antimicrobiano dos óleos, *in vitro*, sobre isolados fitopatógenos de referência, através da concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM).
- ✓ Determinar a bioatividade do óleo no controle de pragas;
- ✓ Avaliar os efeitos do óleo na sobrevivência e fisiologia de *Sitophilus zeamais* (gorgulho do milho) frente ao óleo;
- ✓ Verificar os efeitos do óleo sobre a sobrevivência e oviposição de *Tetranychus urticae* (Ácaro-rajado).

REFERÊNCIAS

AGAREZ, F.V.; RIZZINI, C.M.; PEREIRA, C. **Botânica: taxonomia, morfologia e reprodução dos angiosperma e: chaves para determinação das famílias.** Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, p-198-199, 1994.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology.** 5. ed. Burlington, MA, Elsevier Academic, 922p., 2005.

AGROFIT: **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários.** Cultivo de Hortaliças, 2009. Disponível em:
<http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons.> Acesso em: 15 maio 2015.

AGUIAR, J. C. et al. Chemical constituents and larvicidal activity of *Hymenaea courbaril* fruit peel. **Nat Prod Commun**, v. 5, n. 12, p. 1977-80, Dec 2010.

ALBUQUERQUE, U.P.; ANDRADE, L.H.C. **Uso de recursos vegetais da Caatinga: o caso do agreste do Estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil).** Interciência, Associação Interciência, Caracas, Venezuela, edição 27, numero 007, p. 336-346, 2002.

ANDRADE-LIMA, D. The caatinga dominium. **Revista Brasileira de Botânica**, n. 4, p. 149-153, 1981.

AQUINO, C. F., et al. "Composição química e atividade in vitro de três óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* do maracujazeiro." **Revista Brasileira de Plantas medicinais**, supl. 1, p. 329-336, 2014.

ARAÚJO FILHO, J. A.; CARVALHO, F. C. **Desenvolvimento sustentado da caatinga.** Sobral, CE: EMBRAPA-CNPC Circular Técnica, 13 p.19, 2010.

ARAÚJO, D. D. **Crescimento de mudas de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) sob quatro níveis de sombreamento.** p. 65. Dissertação (Mestrado) – UFPA. Vieira de Araújo, Belém, 2009.

ARAÚJO, M.E.M. **Química analítica aplicada aos produtos naturais.** Lisboa: Faculdade de Ciências de Lisboa - Departamento de Química e Bioquímica Lisboa, 60p. 2005.

ARCOVERDE, J. H. V. et al. Screening of Caatinga plants as sources of lectins and trypsin inhibitors. **Natural Product Research** v. 28, n. 16, p. 1297–1301, 18 ago. 2014.

BARROSO, G. M. et al. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas.** Viçosa: Imprensa Universitária, p.544. 2012.

BASTOS, G. M. et al. In vitro determination of the antimicrobial potential of homemade preparations based on medicinal plants used to treat infectious

diseases. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 113-120, 2011.

BATISTA, T. F. C. et al. Ocorrência de fungos e nematóides fitopatogênicos em áreas reflorestadas pela Petrobrás oriundas da exploração petrolífera no município de Coari, Amazônia; **Revista de Ciências Agrárias**, v.47, p. 163-171, 2007.

BLANCO, M.C.S.G. et al. Drying temperature effects in rosemary essential oil content and composition. **Acta Horticulturae**, n. 569, p. 99-103, 2002.

BRAGA, F. C. et al. Screening Brazilian plant species for in vitro inhibition of 5-lipoxygenase. **Phytomedicine**, v. 6, n. 6, p. 447-452, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10715848>>. Acesso em 04 de maio de 2015.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. **Resolução - RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 20 maio. 2015.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Monitoramento dos biomas brasileiros: bioma caatinga**. Brasília, 2015.

BRYANT, J. P. et al. Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to herbivory. **Oikos** v. 40, 1983, 40, 357.

BURNS, A.E. et al. Light alters the allocation of nitrogen to cyanogenic glycosides in *Eucalyptus cladocalyx*. **Oecologia**, 133, p. 288–294, 2002.

BURT, S.; **International Journal of Food Microbiology**, v.200, n. 1, p. 94, nov.2004.

CARRARA, Â. A. O “sertão” no espaço econômico da mineração, LPH. **Revista de História da Universidade Federal de Sergipe**, n. 6, p. 40-48, 1996.

CARSON C F et al. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. 35, p. 421-424, 1995.

CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 78, p. 264-269, 1998.

CARVALHO FILHO, J. D. et al. Produção de mudas de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) em diferentes ambientes, recipientes e composições de substratos. **Cerne**, Lavras, v. 9, n. 1, p. 109-118, 2003.

CASTELLEN, M. S. **Avaliação do estado de conservação de populações naturais de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) por meio de análises de estrutura genética e autocorrelação espacial**. 2005. 104f. Tese (Doutorado).

Pós-graduação em Ecologia e Agroecossistemas. Universidade de São Paulo, 2005.

CASTELLETTI, C.H.M. et al. Quanto ainda resta da caatinga? uma estimativa preliminar. In: SILVA, J.M.C. et al. (Orgs.). **Biodiversidade da caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente. p. 91-100, 2004.

CASTRO, R. D.; LIMA, E. O. Antifungal activity of the essential oils from *Eucalyptus globulus* L. on *Candida* spp. **Revista de Odontologia UNESP**, n. 39, v. 3, p. 179-184, 2010.

CECILIO, A. B. et al. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. **J Ethnopharmacol**, v. 141, n. 3, p. 975-81, Jun 14 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22469769>>. Acesso em 04 de maio de 2015.

CIA, E.; SALGADO, C. L. Doenças do algodoeiro (*Gossypium* spp.) **Manual de fitopatologia**, 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 41-52, 2005.

COSTA, A.F. **Elementos da flora aromática**. Rio de Janeiro: Editora Junta de Investigações Científicas do Ultramar, 2010.

COSTA, G.M. et al. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia.**, v. 15, n. 4, p. 304-309, 2005.

CRAVEIRO, A.A.; MACHADO, M.I.L. **De Aromas, Insetos e Plantas, Ciência Hoje**, p. 4, 23, 54-63, 1968.

CRONQUIST, A. The evolution and classification of flowering plants. **Columbia: University Press**, ed. 2, p. 1262, 1988.

CSEKE, LELAND J. et al. **Natural Products From Plants**, Taylor Francis Group Boca Raton, FL, USA, 2a Edição, 2006.

DE MORAIS, S. M. et al. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 907, 2006.

DEMENT, W. A.; MOONEY, H. A.; Seasonal variation in the production of tannins and cyanogenic glucosides in the chaparral shrub, *Heteromeles arbutifolia*. **Oecologia**, v. 15, p. 65-76, 2009.

DEVI, K. P. et al. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent Against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of ethnopharmacology**, v. 130, n. 1, p. 107-115, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21299135>>. Acesso em 04 de maio de 2015.

- DO ROSARIO, M. M. et al. Storage xyloglucans: potent macrophages activators. **Chem Biol Interact**, v. 189, n. 1-2, p. 127-33, Jan 15 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20888807> >. Acesso em 04 de maio de 2015.
- DODT, COLLEEN K.; **The Essential Oils Book**, VT: Storey Publishing, Pownal, 1996.
- DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G.; **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 1, p. 88, ago.2000.
- DUDT, J.F.; SHURE, D.J. The influence of light and nutrients on foliar phenolics and insect herbivory. **Ecology**, v. 75, p. 86–98, 2011.
- DUSTIN, C.D.; COOPER-DRIVER, G.A. Changes in phenolic production in the hay-scented fern (*Dennstaedtia punctilobula*) in relation to resource availability. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 20, p. 99–106, 2011.
- EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 4, p. 308- 323, 2007.
- EVANS, W. C. Trease and Evans' Pharmacognosy. **WB Saunders Company: London** 14th ed., cap. 7, 2010.
- FARIAS, L. R. História, ciência e saúde, **Revista da saúde** v.14, p.347, 2009.
- FERNANDES, I. F. **O desempenho do comércio exterior brasileiro de óleos essenciais**. In: SIMPOSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, 2005, Campinas. Simpósio... Campinas: IAC, p.26. 2005.
- FERNANDES, T. T. et al. Atividade antimicrobiana das plantas *Plathymenia reticulata*, *Hymenaea courbaril* e *Guazuma ulmifolia*. **Jornal de Patologia Tropical**, v. 34, n. 2, 2007. Disponível em: < <https://www.revistas.ufg.br/index.php/iptsp/article/view/1916/1841> >. Acesso em 08 de maio de 2015.
- FLETCHER, J. et al. **Plant pathogen forensics**: capabilities, needs, and recommendations. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, p. 450-471. 2006.
- FORZZA, R. C. et al. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro - A. Jakobsson Estúdio, v. 1, p. 1155. 2012.
- FRANCIS, J. K. *Hymenaea courbaril* L. Algarrobo, locust. New Orleans, LA: United State - **Department of Agriculture - Forest Service**, USDA. Southern Forest Experiment Station), p. 12. 2013.
- FREIRE, F. **História territorial do Brasil**: edição fac-similar. Salvador: Instituto Geográfico e Histórico da Bahia/ Secretaria da Cultura e Turismo, p.9, 1998.

FURLAN, M.R. **Ervas e temperos: cultivo e comercialização**. Cuiabá: SEBRAE/MT, v.15, p. 128, 2013.

GERSHENZON, J.; MAFFEI, M.; CROTEAU, R. Biochemical and histochemical localization of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of spearmint (*Mentha spicata*) **Plant Physiology**, v. 89, p. 1351-1357, 2010.

GHINI, R.; KIMATI, H. Resistência de Fungos a Fungicidas. 1ª ed. Jaguariúna. **Embrapa Meio Ambiente**, p. 78, 2000.

GIULIETTI, A. M. et al. Florística e fitossociologia da vegetação arbustiva subcaducifolia da Chapada de São José, Buíque, PE, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v. 20, p. 37-48, 2005.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, vol. 3, p. 374, 2007.

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Produção e composição do óleo essencial de alfavaquinha (*Ocimum selloi* Benth) em resposta a dois níveis de radiação solar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 1, p. 8-14, 2003.

GORCHOV, D. L.; PALMEIRIM, J. M.; ASCORRA, C. F. Dispersal of seeds of *Hymenaea courbaril* (Fabaceae) in a logged rain forest in the Peruvian Amazonian. **Acta Amazônica**, v. 34, n. 2, p. 251-259, 2014.

GRISI, P.U. et al. Desenvolvimento inicial de *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae-Caesalpinioideae). In: **SÍMPOSIO INTERNACIONAL SAVANAS TROPICAIS, 2., e SIMOSIO NACINAO CERRADO PARLA MUNDI**, Brasília, DF. 2008.

GRIZ, L. M. S.; MACHADO, I. C. S.; TABARELLI, M. Ecologia de dispersão de sementes. In: SILVA, J. M.; TABARELLI, M. (Org.). **Diagnóstico da biodiversidade do estado de Pernambuco**. Recife: SECTMA, p. 596-608, 2009.

GUARIM NETO, G. A importância da flora amazônica para uso medicinal. **Horticultura Brasileira**, v. 15, 1997.

GUSMAO, L.F.P.; BARBOSA, F.R.; BARBOSA, F.F. Fungos Conidiais. In: GUSMAO, L.F.P.; MAIA, L.C. (Org.). Diversidade e caracterização dos fungos no semi-árido. Recife: **Associação Plantas do Nordeste**, p.27-47, 2006.

HALL, G. D.; LANGENHEIM, J. H. Temporal changes in the leaf monoterpenes of *Sequoia sempervirens*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 14, p. 61-69, 2007.

HARBORNE, J.B.; Ecological Biochemistry, **Academic. London England**, ed. 4a, 1993.

HARTMANN, T. Global harmonization of herbal health claims. **Entomologia Experimentalis et Applicata** v. 80, p.177-179, 1996.

Herms, D.A.; Mattson, W.J. The dilemma of plants: to grow or defend. **The Quarterly Review of Biology**, v. 67, p. 283–335, 1992.

HERTWIG, L.F. Plantas aromáticas e medicinais. São Paulo: **Icone**, p.254-265, 2012.

HIRATA, K. et al. Effect of near-ultraviolet light on alkaloid production in multiple shoot cultures of *Catharanthus roseus*. **Planta Med.**, v. 57, p. 499-500, 2013.

HÖFT, M; VERPOORTE, R; BECK, E: Leaf alkaloid contents of *Tabernaemontana pachysiphon* as influenced by endogenous and environmental factors in the natural habitat. **Planta Medica**, v. 64, p. 148-152, 2009.

Horner, J.D. Nonlinear effects of water deficits on foliar tannin concentration. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.18, p. 211- 213, 2011.

HORST, K. **Westcott's plant disease handbook**. New York: Springer Berlin Heidelberg, 2008.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: Edufscar, 152p, 2003.

IMAI, T. *et al.* Heartwood extractives from the Amazonian trees *Dipteryx odorata*, *Hymenaea courbaril*, and *Astronium lecointei* and their antioxidant activities. **Journal of Wood Science**, v. 54, n. 6, p. 470-475, Dec 2008. ISSN 1435-0211. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000261953000007 >. Acesso em 04 de maio de 2015.

JAKIEMIU, E.A.R. **Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris* L.)**. 2008. 89p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, 2008.

JAYAPRAKASAM, B. *et al.* Terpenoids from Stinking toe (*Hymenaea courbaril*) fruits with cyclooxygenase and lipid peroxidation inhibitory activities. **Food chemistry**, v. 105, n. 2, p. 485-490, 2007.

JEONG, S. T.; GOTO-YAMAMOTO, N.; KOBAYASHI, S.; ESAKA, M. Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skin. **Plant Science** v.167, p. 247-252, 2004.

KIILL, L.H.P. **Caatinga**: patrimônio brasileiro ameaçado. Agronline.com.br. Disponível em: <<http://www.agronline.com.br/artigos/artigo.php?id=81>>. Acesso em: 04 maio 2015.

- KNOBLOCH, K. et al. **Action of Terpenoids on Energy Metabolism**, In: Brunke, E.J. (ed.), *Progress in Essential Oil Research*, Guyer, Berlin, Germany, 1986.
- KOEPPE, D. E. et al. The effect of age and chilling temperatures on the concentration of scopolin and caffeoylquinic acids in tobacco. **Physiol.Plant.** v. 233, p. 258-266, 2013.
- KORICHEVA, J. et al. **Regulation of woody plant secondary metabolism by resource availability**: hypothesis testing by means of meta analysis. *Oikos* v. 183, p. 212-226, 2000.
- KUTCHAN, T.M.** Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. **Plant Physiology** v.125, p. 58–60, 2001.
- LAM, S. K.; NG, T. B. Isolation of a small chitinase-like antifungal protein from *Panax notoginseng* (sanchi ginseng) roots. **International Journal of Biochemistry Cell Biology**, v. 33, p. 287–292, 2001.
- LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. **Ecologia e conservação da caatinga**. Recife: Editora Universitária da UFPE, p. 822, 2003.
- LEE, Y.; LANGENHEIM, J. H. Systematics of the genus *Hymenaea* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae, Detarieae). California: **University of California Publications in Botany**, v.69, 1975.
- LEWIS. G. et al. **Legumes of the world**. Kew: Kew Publishing, p.33-41. 2005.
- LIMA, H.R.P. et al. Influência dos fatores abióticos e variabilidade dos terpenóides em plantas. **Floresta e Ambiente**, v.10, n.2, p.71-77, ago/dez. 2003.
- LIMA, H.R.P.; KAPLAN, M.A.C.; CRUZ, A.V.M. Influência dos fatores abióticos e variabilidade dos terpenóides em plantas. **Floresta e Ambiente**, v. 10, n. 2, p. 71-77, ago./dez. 2014.
- LIMA, L.C.P.; OLIVEIRA, M.L.A.A.; TOZZI, A.M.G.A. **Lista de espécies da flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 03 Jun. 2015.
- LINDROTH, R. L.; HSIA, M. T. S.; SCRIBER, J. M. Seasonal patterns in the phytochemistry of three *Populus* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.15, p. 681-686, 1987.
- LOKAR, L. C. et al. Variation in terpene composition of *Artemisia alba* in relation to environmental conditions. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 15, p. 327-333, 2009.

LOMAZZI, G. **Aromaterapia**. 1. Blumenal/Santa Catarina: Susaeta Ediciones, 2006.

LOPES, N. P.; GOPPO-NETO, L. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2008.

LORENZETTI, E.R. et al. Bioatividade de óleos essenciais no controle de *Botrytis cinerea* isolado de morangueiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, especial, p.619-627, 2011.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002.

LORENZI, H. **Plantas Mediciniais no Brasil**: nativas e exóticas. Nava Odessa: Plantarum, 2006.

LORENZI, H.; MATOS, A. F. J. **Plantas medicinais no Brasil**. Rio de Janeiro. Instituto Plantarum de Estudo da Flora LDTA, p. 400. 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. D. A. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. D. A. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas. Brasil, vol. 1. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p. 368, 2002.

LOUGHRIN, J. H. et al. Volatiles from flowers of *Nicotiana sylvestris*, *N. otophora*, and *malus x domestica*: Headspace components and day/ night changes in their relative concentrations. **Phytochemistry** v. 29, p. 2473, 1990.

MARCHIORI, J.N.C. **Dendrologia das angiospermas**: leguminosas. Santa Maria: Editora UFSM, p. 200. 1997.

MARQUES, C. A. et al. Considerações anatômicas e análise de óleo essencial do hipanto e do fruto de *Hennecartia omphalandra* J. Poisson (Monimiaceae). **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 18, p. 415-429, 2008.

MARTIN, S. S.; LANGENHEIM, J. H.; ZAVARIN, E. Quantitative variation in leaf pocket resin composition in *Hymenaea courbaril*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 2, n. 2, p. 75-87, 1974.

MARTIUS, C.F.P.V. **A viagem Von Martius**: flora brasiliensis. Rio de Janeiro: Index, v.1, p. 140, 1896.

MATOS, J. M. D.; MATOS, M. E. O. **Farmacognosia**: curso teórico – prático. Fortaleza: UFC, 1989.

MATUDA, T.G., NETTO, F.M. Caracterização química parcial da semente de jatobá-do Cerrado (*Hymenaea stignocarpa* Mart). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, p.353-357, 2005.

MEDINA, E.; OLIVARES, E.; DIAZ, M. Water stress and light intensity effects on growth and nocturnal acid accumulation in a terrestrial CAM bromeliad (*Bromelia humilis* Jacq.) under natural conditions. **Oecologia** v. 70, p. 441, 2012.

MELO, J. I. M. Flora do parque nacional do Catimbau, Pernambuco, Brasil: Boraginaceae sensu lato. **Revista Biotemas**. Campina Grande, v. 25, n. 4, p. 109-120, 2012.

MELO, R.C. de A. Plantas medicinais, óleos essenciais e aromas. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.2. n. 2 p. 193-200, mar./abr. 2005. Disponível em <<http://www.nutritime.com.br>>. Acesso em: 12 de maio de 2015.

MONTESINOS, E. Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. **International Microbiology**. v. 6, p. 245–252, 2003.

MOONEY, H.A.; BULLOCK, S.H.; MEDINA, E. **Seasonally dry tropical forest**. Cambridge: Cambridge University Press, p.1-8. 1995.

MOTHES, K.; **Historical Introduction of Plant Products**, Springer, Berlin, Germany, 1980.

NAYUDU, M. V. *Pseudomonas viticola* sp. nov., incitant of a new bacterial disease of grape vine. **Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v. 73, p. 183- 186, 1972.

NCCLS. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-Difusão: Norma Aprovada. 8.ed. Waine, Pennsylvania, 2003.

NEUVONEN, S.; HAUKIOJA, E.; MOLARIUS, A. Delayed inducible resistance against a leafchewing insect in four deciduous tree species. **Oecologia**, v. 74, p. 363-369, 2012.

NOGUEIRA, R.T. et al. Clerodane-type diterpenes from the seed pods of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. **Phytochemistry**, v.58, p.1153-1157, 2001.

ODUM, E.P. **Ecologia**. Rio de Janeiro: Guanabara, p.434. 1988.

OLIVEIRA, R. B., GODOY, S. A. P., COSTA, F. B. **Plantas tóxicas: conhecimento e prevenção de acidentes**. Ribeirão Preto – SP: Editora Holos, p - 64, 2003. Disponível em: < <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=74409110>>. Acesso em 02 de junho de 2015.

PALHINHA, R.T. Plantas aromáticas de Portugal. **Brotéria**, v. 15, p.97-113. 2013.

- PEREIRA, Á. I. S. et al. Atividade antimicrobiana no combate as larvas do mosquito *Aedes aegypti*: Homogeneização dos óleos essenciais do linalol e eugenol. **Educação química** [online], vol.25, n.4, pp. 446-449, 2014.
- PEREIRA, C. K. B. et al. **Composição química, atividade antimicrobiana e toxicidade do óleo essencial de *Hymenaea courbaril* (jatobá)**. 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. QUÍMICA, S. B. D. Águas de Lindoia - SP 2007.
- PEREIRA, I.M. et al. **Regeneração natural em um remanescente de caatinga sob diferentes níveis de perpetuação, no Agreste paraibano**. Acta Botanica Brasilica, v.15, n.3, p.413-426, 2001.
- PÉROMBELON, M.C.; KELMAN, A. **Revista Phytopathol.**v.18, p. 361-387, 1980.
- PERRY, N. S. et al. Salvia for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 75, p. 651–659, 2008.
- PESTANA, L. T. C. **Estudo taxonômico de *Hymenaea* L.:** complexo H. courbaril, H. martiana e H. stigonocarpa (Fabaceae: Caesalpinioideae: Detarieae) 56 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal). Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2010.
- PICHERSKY, E.; NOEL, J. P.; DUDAREVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science**, v. 311, p. 808–811, 2008.
- PICMAN, A. K. Biological activities of sesquiterpene lactones. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 14, n. 3, p. 255-281, 2007.
- PINTO, A. A. D. C.; MADURO, C. B. Produtos e subprodutos da medicina popular comercializadas na cidade de Boa Vista, Roraima. **Acta Amazônica**, v. 33, n. 2, p. 281- 290, 2003. Disponível em: <<http://acta.inpa.gov.br/fasciculos/33-2/PDF/v33n2a09.pdf>>. Acesso em 09 de maio de 2015.
- PITAROKILI, D.; TZAKOU, O.; LOUKIS, A.; HARVALA, C. Volatile metabolites from *Salvia fruticosa* as antifungal agents in soilborne pathogens. **J. Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3294– 3301, 2004.
- POLHILL, R.M.; RAVEN, P.H. **Advances in legume systematics**. Kew: Royal Botanic Gardens, Part 1, p. 425, 2014.
- PRADO, D. As caatingas da América do Sul. In: LEAL, I.R.;TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. (Eds.). **Ecologia e conservação da caatinga**. Recife: Editora Universitária da UFPE, p.3-73, 2003.

PRADO, D. E. As caatingas da América do Sul. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (Ed.). **Ecologia e conservação da caatinga**. Recife: Editora Universitária da UFPE, p.3-74. 2003.

PRANCE, G. T.; DA SILVA, M. F. **Árvores de Manaus**. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 1975.

PRITSCH, C. et al. Fungal Development and Induction of Defense Response Genes During Early Infection of Wheat Spikes by *Fusarium graminearum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 13, n. 2, p. 159–169, 2000.

QUEIROZ, L. P. **Leguminosas da caatinga**. Feira de Santana: UEFS, 467 p. 2014.

QUEIROZ, L.P. Leguminosas da Caatinga. Universidade Estadual de Feira de Santana, **Royal Botanic Gardens, Kew e Associação de Plantas do Nordeste**. Feira de Santana. 2009.

QUEIROZ, L.P. The brazilian caatinga: phytogeographical patterns inferred from distribution data of the Leguminosae. In: PENNINGTON, R.T.; LEWIS, G.P.; J.A. RATTER, J.A. (Eds.). **Neotropical dry forests and savannas**. Edinburgh: Royal Botanical Garden, p.113-149. 2013.

RAY, R. C.; RAVI, V. Post harvest spoilage of sweet potato in tropics and control measures. **Critical Reviews on Food Science**. v. 45, p. 623-644, 2005.

RICKLEFS, R.E. **Economia da natureza**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 572. 2003.

RICKLEFS, R.E. **Economia da natureza**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, . p. 610. 2010.

RIZZINI, C. T.; MORS, W. B. **Botânica econômica brasileira**. São Paulo: EPU/ EDUSP, p.445. 1976.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. Terpenóides. In: ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmaco biotecnologia**. Baltimore, MA: Williams Wilkins. p. 188-222. 2013.

ROBINSON, T. Metabolism and Function of Alkaloids in Plants. **Science**, v. 184 n. 4135 p. 430-435, 1974.

ROCA-PÉREZ, L.; BOLUDA, R.; GAVIDIA, I.; PÉREZ-BERMÚDEZ, P. Seasonal cardenolide production and Dop5βr gene expression in natural populations of *Digitalis obscura*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 1869-1878, 2014.

ROCHA, G. M.; ROCHA, M. E. D. N. Uso popular de plantas medicinais. **Saúde Ambiente em Revista**, v. 1, n. 2, 2009.

RODAL, M. J. N.; ANDRADE, K. V. S.; SALES, M. F.; GOMES, A. P. S. Fitossociológico componente lenhoso de um refúgio vegetacional no município de Buíque, Pernambuco. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 58, p. 517-526, 1998.

RODRIGUES, N. M. **Potencialidades e impactos ambientais no Parque Nacional do Catimbau e sua Zona de amortecimento**. Dissertação (Mestrado em Gestão e Políticas Ambientais) Universidade Federal de Pernambuco. Recife, p. 42-53. 2006.

SÁ, I.B. et al. Processos de desertificação no semiárido brasileiro. Petrolina: **Embrapa Semiárido**, p.112. 2010.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant Physiology**. Wadsworth Publishing Co.: Belmont, 4th ed, 2007.

SAMPAIO, E. V. S. B. Pesquisa botânica nordestina: progressos e perspectivas. Recife: **Sociedade Botânica do Brasil/Seção Regional de Pernambuco**, p. 203-212. 2009.

SAMPAIO, E.V.S.B. Overview of the brazilian caatinga. In: BULLOCK, S.H.; MOONEY, H.A.; MEDINA, E. (Eds.). **Seasonally dry forests**. Cambridge: University Press, p.35-58. 1995.

SANTANA, J. A. da S.; SOUTO, J. S. Diversidade e estrutura fitossociológica da caatinga na estação ecológica do Seridó, RN. **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, v.6, n.2, p.232-242, 2006.

SCHWOB, I. et al. Changes in essential oil composition in Saint John's wort (*Hypericum perforatum* L.) aerial parts during its phenological cycle. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 735-745, 2012.

SILVA, F. et al. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. Pt 10, p. 1479-86, Oct 2011.

SILVA, F.; CASALI, V.W.D. **Plantas medicinais e aromáticas: pós-colheita e óleos essenciais**. Viçosa, MG: UFV, p. 135, 2014.

SILVA, M. G. V. et al. Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves. **Fitoterapia**, v. 70, p. 32-34, 2004.

SILVA, M.C. da et al. (Orgs.). **Biodiversidade da caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, p. 382, 2014.

SILVA, N. C. C. **Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas**. Dissertação (Mestrado) Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, 2003.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. UFRGS Florianópolis: UFSC, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Óleos voláteis**. In: SIMÕES, C.M.O et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Editora UFRGS, 5.ed, p. 67-495, 2003.

SIMÕES, C.M.; SPITZER, V. Óleos essenciais. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora UFRGS, p.87-415. 2007.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: Editora UFRGS, 2000.

SIMOES, C.M.O. et al. **Farmacognosia, da Planta ao Medicamento**, Editora da UFRGS, Porto Alegre, Editora da UFSC, Florianópolis, Brasil, 6a Edição, 2007.

SIQUEIRA FILHO, J.A. **A Flora das caatingas do Rio São Francisco: histórias e conservação**. Rio de Janeiro: Ied, p.552. 2012.

SLATER, A.; SCOTT, N.; FOWLER, M. Plant disease resistance. In: SLATER, A.; SCOTT, N.; FOWLER, M. **Plant biotechnology: The genetic inoculation of plants**. New York: Oxford, 2003, p. 157-178.

SLIMESTAD, R. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: agricultural and storage practices. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 26, p. 225-229, 2011.

SODAEIZADEH, H. et al. Herbicidal activity of a medicinal plant, *Peganum harmala* L. and decomposition dynamics of its phytotoxins in the soil. **Industrial Crops and Products**, v.31, n.2, p.385-94, 2010.

STUBBLEBINE, W.; LANGENHEIM, J. Estudos comparativos da variabilidade na composição da resina da folha entre árvore parental e prole de espécies selecionadas de *Hymenaea*: comparação de populações Amazônicas com uma população do sudeste brasileiro. **Acta Amazônica**, v. 10, n. 2, p. 293-309, 1980. Disponível em: < <http://acta.inpa.gov.br/fasciculos/10-2/PDF/v10n2a07.pdf> >. Acesso em 04 de maio de 2015.

SUZUKI, R. et al. Characterization and antioxidant activity of Amazonian woods. **Journal of Wood Science**, v. 54, n. 2, p. 174-178, 2008.

TABARELLI, M. et al. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade**, v. 1, p.132-138, 2005.

TABARELLI, M.; CARDOSO-SILVA, J.M. **Áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da**

biodiversidade do bioma caatinga. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, p.92, 2002.

TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. Áreas e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da caatinga. In: LEAL, I.R.; TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. (Eds.). **Ecologia e conservação da caatinga**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, p.88. 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, p. 85. 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Metabolitos secundários e defesa vegetal. In: _____. **Fisiologia Vegetal** 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 309-334.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, p.449-484, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 3.ed. Sunderland: Sinauer Associates, p.423-460, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; **Plant Physiology**, Sinauer Associates Inc. Publisher, Sunderland, Massachusetts, USA, 3rd ed, 2004.

TAYLOR, N.P.; ZAPPI, D. Distribuição das espécies de cactaceae na caatinga. In:

SAMPAIO, E.V.S.B. et al. (Eds.). **Vegetação e flora das caatingas**. Recife: APNE / CNIP, p. 355. 2004.

TROMBETTA, D. et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2474-2478, 2005. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1140516/>>. Acesso em 09 de maio de 2015.

VELLOSO, A.L.; SAMPAIO, E.V.S.B.; PAREYN, F.G.C. *Eco-rregiões propostas para o bioma caatinga*. Recife: **Associação Plantas do Nordeste**, p.12. 2002.

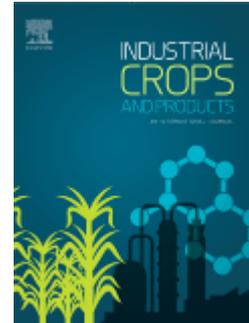
VELOSO, H. P.; RANGEL FILHO, A. L. R.; LIMA, J. C. A. Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal. Rio de Janeiro: IBGE, **Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais**, p.124, 1991.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. Analysis of phenolic plant metabolites. **Blackwell Scientific Publications** Oxford, ed. 1, cap. 3, 2004.

Conclusões

CONCLUSÕES

- As plantas da Caatinga indicadas popularmente para tratamento de várias enfermidades apresentam atividade antimicrobiana comprovada.
- O rendimento dos óleos essenciais foi diretamente e altamente correlacionado para todas as espécies analisadas. A quantidade presente nos óleos não se relacionou com nenhum dos outros parâmetros do estudo.
- Entre os parâmetros químicos e de atividade analisadas, todos os óleos apresentaram atividades de total eficácia.
- O conhecimento fitoquímico da espécie *Hymenaea courbaril* var. *courbaril* L. foi ampliado, além disto, o óleo apresentou atividade frente a bactérias e fungos fitopatogênicos.
- Este estudo levantou hipóteses importantes quanto à relação de preferência das plantas por uma comunidade e sua composição fitoquímica e atividades biológicas
- Os resultados demonstrados neste trabalho podem servir de base para estudos de bioprospecção de inseticidas naturais



Capítulo 1

Manuscrito a ser submetido no Periódico: **Industrial Crops and Products**

Fator de impacto: 2.837

Qualis: B1

Guia para submissão:

https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/522825?generatepdf=true

Variabilidade química e atividade antimicrobiana contra fitopatógenos dos óleos essenciais das folhas de *Hymenaea courbaril* L. var. *courbaril* (Fabaceae: Caesalpinioideae).

Paula Fernanda Figueiredo das Mercês¹, Alexandre Gomes da Silva², Cibele Maria Alves da Silva Bessa^{1,2}, Ana Paula Sant'Anna da Silva¹, Bruno Souza Santos², Patrícia Cristina Bezerra da Silva³, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro⁴, Maria Tereza dos Santos Correa⁵, Márcia Vanusa da Silva⁵,
Maria Luiza Vilela Oliva⁶

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, 1235, 50.670-901, Recife, PE, Brasil.

² Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, 1235, 50.670-901, Recife, PE, Brasil.

³ Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, 1235, 50.670-901, Recife, PE, Brasil.

⁴ Departamento de Química Fundamental Universidade Federal de Pernambuco, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, 1235, 50.670-901, Recife, PE, Brasil.

⁵ Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, 1235, 50.670-901, Recife, PE, Brasil.

⁶ Professora Associado e Livre Docente da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP, SP, Brasil.

* Autor para correspondência. Tel.: +55 81 9 8562 7490;
Email: pauladasmerces@gmail.com (MERCÊS, P.F.F das)

RESUMO

O emprego de agrotóxicos na agricultura tem levado riscos à saúde humana e frequentes danos ao meio ambiente. Assim, na busca de métodos alternativos para o controle de doenças de plantas objetivou-se neste estudo avaliar a variabilidade química e a atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas do Jatobá (*Hymenaea courbaril* L. var. *courbaril*) coletados em quatro distintas fisionomias do Parque Nacional do Catimbau (PARNA do Catimbau). Para obtenção do óleo utilizou-se a técnica de hidrodestilação por meio do aparelho de Clevenger, a identificação e quantificação dos constituintes das quatro amostras de óleo (I, II, III e IV) se deu por análises em CG/MS. A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada por meio do método de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida/fungicida mínima (CBM/CFM). Os micro-organismos utilizados foram seis bactérias fitopatógenas: *Acidovorax citrulli* (DEPA 1.12), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (DEPA 31), *Ralstonia solanacearum* (DEPA CRM 10), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (DEPA 53), *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (DEPA 11.2.1), *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (DEPA 137) e cinco fungos fitopatogénicos: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani*, *Verticillium lecanii* e *Aspergillus flavus*. Foram analisadas temperatura, umidade relativa e os nutrientes presentes no solo afim de se verificar a influência dos mesmos sobre as amostras coletadas. Os óleos apresentaram rendimento de 0,86%, 0,87%, 1,32% e 1,45% para as amostras I, II, III e IV, respectivamente. Nas análises cromatográficas, o Caryophyllene oxide, β -Caryophyllene e Junipene foram os compostos majoritários. Todos os óleos foram eficazes para todos os micro-organismos testados, sendo mais ativo frente a bactéria *Xanthomonas campestris* subsp. *malvacearum* apresentando CIM: 1,56 e CBM μ /mL: 1,56 μ /mL. Para os fungos testados, a amostra IV apresentou CIM: 12,5 μ /mL e CFM: 12,5 μ /mL frente ao *F.moniliforme*. Após as análises de caracterização, perfil do ambiente e atividade antimicrobiana pode-se concluir que a variação geográfica teve efeito significativo sobre as características do óleo do jatobá coletado em diferentes fisionomias da região.

Palavras-chave: Fungo, bactéria, caracterização, compostos e fatores abióticos.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país rico em biodiversidade, embora, muitas espécies de plantas estejam em risco de extinção devido a fatores como mudanças climáticas, ações antrópicas, entre outros. A caatinga é considerado uma das 37 grandes regiões geográficas do planeta, que possui a vegetação mais heterogênea dentre os biomas brasileiros (AGUIAR et al. 2012). Abrangendo uma área de aproximadamente 844.453km², é considerada como tipo vegetacional brasileiros menos conhecidos, razão por que, sua diversidade biológica tem sido subestimada (MMA 2012).

Segundo Tabarelli et al. (2000), a Caatinga possui grande variedade de espécies vegetais, sendo muitas delas endêmicas e adaptadas às condições de estresse ambiental característicos das regiões semiáridas, como baixa pluviosidade, temperaturas elevadas e altas taxas de evapotranspiração. Assim, estudos recentes apontam espécies vegetais desse bioma como fontes promissoras de biomoléculas que apresentam atividades biológicas importantes (ARCOVERDE et al., 2014; DE BM TROVÃO et al., 2007; FÉLIX-SILVA et al., 2014). Portanto, esta grande reserva natural de compostos orgânicos tem assumido um papel altamente importante na descoberta e no desenvolvimento de novos agentes com atividades antimicrobianas (COWAN, 2009).

A pesquisa por novas fontes de compostos naturais com atividade biológica tornou-se importante principalmente, no que diz respeito a novas alternativas de manejo fitossanitário, visto que, o Brasil é um dos maiores consumidores de defensivos agrícolas do mundo. São gastos, anualmente, cerca de 2,5 bilhões de dólares com a aquisição desses produtos, sendo o país responsável pelo consumo de cerca de 50% da quantidade de defensivos utilizados na América Latina (MMA, 2000). Como consequência, ocorrem graves desequilíbrios ambientais, resultando na contaminação de alimentos, animais e reservas hídricas, e ocasionando a redução na qualidade e na expectativa de vida da população.

Além disso, nos sistemas de produção em que a utilização do controle químico não é permitida, como por exemplo no cultivo orgânico, há necessidade de métodos alternativos com eficiência comprovada para o controle de pragas e doenças (Ochwang'i et al., 2014). Considerando-se o valor das plantas da Caatinga, torna-se importante estabelecer linhas de ações voltadas ao desenvolvimento de técnicas, utilizando metabólitos secundários, tais como óleos essenciais (OEs), que são compostos complexos, naturais e voláteis, cuja a atividade biológica dos seus constituintes pode atuar como agentes para o controle de micro-organismos fitopatógenos.

De fato, os OEs representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto, sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais. Variações temporais e espaciais podem influenciar em diferentes níveis (sazonais e diárias; intraplanta, inter- e intraespecífica) e, apesar da existência de um controle genético, a expressão pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos. Segundo, Gobbo-Neto (2007) esses metabolitos podem variar tanto em nível quantitativo como qualitativo podem ser influenciados pelo clima, altitude, solo e nível de radiação. Mesmo dentro de uma mesma região de coleta, diferenças no habitat como, onde cada espécime foi coletado, pode produzir diferenças estatisticamente significativas,

Das inúmeras espécies vegetais utilizadas, no controle de pragas agrícolas, algumas são pertencentes à família Fabaceae, ao qual se insere o gênero *Hymenaea* que apresenta ampla distribuição, ocorrendo com frequência no nordeste Brasileiro (PESTANA, 2010). O Jatobá (*Hymenaea courbaril* L. var. *courbaril*.) é uma espécie clímax dessa família, possui propriedades medicinais e suas diferentes partes são utilizadas para tratar gripe, anemia, bronquite, asma, dor de garganta, além da utilização como fortificante, expectorante, hepatoprotetor e vermífugo (Bezerra et al., 2013). Ainda não se sabe sobre o efeito dos óleos essenciais dessa espécie medicinais sobre alguns micro-organismos fitopatogênicos que atacam culturas economicamente importantes.

O objetivo desse trabalho foi investigar e comparar a caracterização química e atividade biológica, frente à fitopatogênicos, dos óleos essenciais de quatro amostras do Jatobá (*H. courbaril* L. var. *courbaril*) coletados em fisionomias distintas do Parque Nacional do Catimbau (PARNA Catimbau) localizado no Nordeste do Brasil (Pernambuco, Brasil). Tais informações podem contribuir para o controle alternativo de algumas doenças e desenvolvimento futuro de novos produtos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta do Material Botânico

As folhas adultas de quatro indivíduos de *H. courbaril* L. var. *courbaril* encontrados em fitofisionomias distintas do PARNA Catimbau foram coletadas, em fevereiro de 2014 (Tabela 1). Em seguida, foram separadas 300g em sacos de papel, e armazenadas sob refrigeração, para posterior extrações dos óleos essenciais. Utilizou-se o moedor elétrico (Cienlab, CE-430), para trituração das amostras vegetais. Os indivíduos foram identificados e tombados pelo Herbário do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) e os nomes científicos foram verificados no Índice Internacional de Nomes de Plantas (<http://www.ipni.org>) e brasileira checklist Flora (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/listaBrasil>).

2.2 Extração dos Óleos Essenciais

A técnica empregada para a extração foi à destilação por arraste a vapor com aparelho de Clevenger (Figura1). A cada extração, eram pesadas 300g de folhas moídas e adicionado 3000 ml de água destilada. O tempo de destilação variou de 4 a 6 horas. Quando encerrava-se o procedimento eram separadas as fases óleo/água no doseador e o óleo foi armazenados em recipientes de vidro tipo âmbar sobre refrigeração para evitar possíveis perdas de constituintes voláteis, até serem submetidos à análise química e/ou teste de atividade biológica. Para o cálculo do rendimento em porcentagem utilizou os dados da massa do óleo em relação à massa da amostra da planta utilizada.

2.3 Análise dos Aspectos Bióticos e do Solo

Os dados do perfil climático da região que serviram de base ao estudo, foram extraídos do banco de dados do Laboratório de Meteorologia do ITEP (LAMEP), onde

foi possível obter informações a respeito da taxa de pluviosidade e clima no período que houve a coleta. Para o solo, utilizou-se a técnica tradicional, onde as amostras foram coletadas dividindo-se a área em quatro pontos, tomados ao acaso sob a projeção da copa das árvores. Removeu-se da superfície do solo, as folhas, pedras e detritos. Em seguida com uma pá reta, retirou-se aproximadamente 500g de solo, de cavidades com 30cm de profundidade, em seguida as amostras foram armazenadas em sacos limpos e identificados (amostra 1, 2, 3 e 4) de acordo com cada indivíduo. Posteriormente foram encaminhadas a análise no Laboratório de Fertilidade do Solo no IPA (Instituto Agrônomo de Pernambuco). Utilizou-se o GPS Garmin e Trex Legend Azul para localização dos pontos de coleta. Todas as amostras foram submetidas à mesma metodologia, além disso, foi verificado o aspecto e as condições bióticas, que as espécies se encontravam.

2.4 Análises por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

Para a análise dos óleos essenciais foram injetadas alíquotas de 1 μ L em split 1:50 do óleo essencial com concentrações variando entre 2000 a 3000 ppm. Posteriormente, injetou-se 1 μ L em split (1:50) da mistura de padrões de hidrocarbonetos: C9-C34. E por fim, injetou-se a mistura do óleo essencial e a mistura de padrões de hidrocarbonetos, 1 μ L (0.2 μ L de alcanos e 0.8 μ L de óleo) sob o modo splitless. A temperatura do CG foi mantida em 60 °C por 3 min, depois foi aumentando de 2,5 °C min⁻¹ até 240 °C e mantida por 10 min nesta temperatura. O fluxo de hélio foi mantido em pressão constante de 100 kPa. A interface do EM foi definida em 200 °C e os espectros de massa registrados em 70 eV (em modo EI) com uma velocidade de escaneamento de 0.5 scan-s de *m/z* 20-350.

A partir da análise dos tempos de retenção dos compostos presentes na amostra do óleo essencial, dos padrões de hidrocarboneto e a combinação do óleo essencial com a mistura de padrões foi calculado o índice de retenção para cada componente do óleo, segundo a equação de Kratz. Os compostos foram identificados a partir de comparação de seus espectros de massa e tempos de retenção àqueles de padrões autênticos disponíveis nas bibliotecas de referência MassFinder 4, NIST08 e Wiley Registry™ 9th Edition, integradas ao software Agilent MSD Productivity ChemStation (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA). As áreas dos picos nos cromatogramas foram integradas para obtenção do sinal iônico total e seus valores utilizados para determinar as proporções relativas de cada composto.

2.5 Obtenção dos isolados

As bactérias patogênicas foram cedidas pela coleção do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil. Para o experimento, utilizou-se: *Acidovorax citrulli* (DEPA 1.12), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (DEPA 31), *Ralstonia solanacearum* (DEPA CRM 10), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (DEPA 53), *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (DEPA 11.2.1), *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (DEPA 137). Todas as espécies bacterianas foram mantidas em meio NYD nutriente. Os seis fungos fitopatogênicos utilizados durante as experiências de crescimento foram as seguintes: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani*, *Verticillium lecanii*, *Rhizopus*

stolonifer e *Aspergillus flavus* As amostras de micélio necessários para as experiências in vitro, foram tomados a partir de culturas cultivadas em ágar dextrose de batata (PDA, Disco). Os mesmos foram cedidos na micoteca da Universidade Federal de Pernambuco.

2.6 Ensaios de Atividade Antimicrobiana

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Mínima Bactericida (CBM)

O ensaio de susceptibilidade foi realizado usando o método estabelecida pelo Instituto Clinical and Laboratory Standards (CLSI). Para a determinação a CMI, foi utilizado placa de microdiluição com meio NYD para as bactérias. Os micro-organismos teste foram padronizados pela turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland, correspondente a uma concentração de aproximadamente 10^8 UFC/mL para bactérias. As amostras de ensaio dos óleos foram solubilizadas em Tween[®]80 a 1%. As diluições seriadas foram preparadas em placas de 96 poços para obter concentrações finais que variam de 50 – 0,09 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Em cada poço, foi adicionado 100 μL do caldo nutriente e 10 μL de inóculo. As placas foram incubadas a 30° C durante 24 h. Após esse tempo, foi adicionado 10 μL de resazurina a 0,01% como um indicador colorimétrico de caracterização da viabilidade celular. Em seguida, as microplacas foram novamente incubadas por 4 h, e a concentração mais baixa do extrato que inibiu o crescimento microbiano foi registrado como a CMI.

Utilizando os resultados do ensaio da CMI, as concentrações que mostram a ausência completa de crescimento visual de bactérias foram identificadas e 20 μL de cada caldo de cultura foi transferida para placas de ágar e incubados durante o tempo especificado e temperatura, como mencionado acima. A completa ausência de crescimento sobre a superfície do ágar na concentração mais baixa de amostra foi definida como o MBC. Cada ensaio neste experimento foi repetido três vezes. A droga de referência padrão, foi o clorafenicol (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) utilizado como um controle positivo e o DMSO como controle negativo seguindo a mesma metodologia utilizada para a obtenção da MIC dos micro-organismos. Os experimentos foram feitos em quadruplicata.

Determinação da Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM)

O método de micro-diluição, como descrito anteriormente, foi utilizado com pequenas modificações para determinar os valores da concentração inibitória mínima (CMI) dos compostos voláteis. Os OEs foram diluídos em série, que vão desde 1/2 até uma diluição de 1/100 a partir do óleo puro. Em cada poço, 100 μL de cada diluição do óleo foi misturada com 10 μL da suspensão de esporos de fungos (2×10^6 esporos mL^{-1} em fresco APO). As microplacas foram incubadas durante 2-3 dias a 27°C, com monitorização diária. Todas as experiências foram realizadas em triplicado. As leituras da CMI foram realizados espectrofotometricamente com um leitor de microplacas a 595 nm. Os valores foram calculados comparando o crescimento nos poços de controle e o extracto em branco, que consistiram em placas não inoculadas. A CMI

dos óleos foi definida como a menor concentração de extracto de planta que causou a inibição de crescimento de mais de 90% às 48 h, em comparação com o controle. A atividade *in vitro* fungicida (CFM) foi determinada descrito por Espinel-Ingroff et al. (2002). Após 72h de incubação, 20 uL de cada uma foi subcultivada bem que não mostrou nenhum crescimento visível (inibição de crescimento de mais de 98%), a partir do último poço positivo (crescimento semelhante ao usado para o controle do crescimento poço), e a partir do controle do crescimento (extrair-livre médio) em placas de BDA. As placas foram incubadas a 27 ° C até que o crescimento foi observado no controle do crescimento subcultura. A concentração fungicida mínima foi considerada como a concentração mais baixa do óleo que não apresentou qualquer crescimento de fungos sobre a forma sólida usada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as amostras foram coletadas na mesma data, em diferentes localidades do PARNA do Catimbau, obdeceram a mesma metodologia, sendo denominadas de amostra I, II, III e IV de acordo com o ponto de coleta (Figura 2). De acordo com a tabela 1, podem ser observados os dados de coleta, bem como as coordenadas e tombamento referente a cada amostra estudada. O rendimento dos óleos essenciais foram calculados a partir da massa do tecido vegetal e massa do óleo obtido, conforme apresentado na tabela 2.

Os valores de rendimento da hidrodestilação das folhas de *H. courbaril* L. var. *courbaril* estão condizentes com os encontrados na literatura para esta espécie que vão de 0,003 a 0,6%. Não consta nenhum dado na literatura para a comparação de indivíduos diferentes da mesma espécie, como o estudado no presente artigo. Ainda na mesma tabela, é possível verificar que o as amostras, mesmo apresentando o mesmo peso de massa vegetal, contiveram rendimentos distintos, onde os indivíduos III e IV se destacam com valores maiores.

Os fatores abióticos influenciam diretamente na biossíntese dos metabólitos secundários das plantas, por isso foi analisado tais valores para obter um *Screening* das características as quais as espécies se encontravam. Segundo o Laboratório de Meteorologia do ITEP (LAMEP), o clima predominante na região do PARNA do Catimbau é o semi-árido, na zona de transição entre o agreste e o sertão. No período da coleta fevereiro de 2014, o índice pluviométrico registrou 19mm de precipitação, caracterizando como período seco. Ainda segundo a LAMEP o índice de UV era muito alto e a temperatura média variava de 21° a 22,8°C, para esse mês. A caatinga é caracterizada por um período quente e seco, ou seja, temperaturas altas e umidade baixa isso acarreta a redução de níveis fotossintéticos, o crescimento e redução de biomassa, esses fatores podem afetar a síntese e o acúmulo do óleo essencial, segundo Lima (2003) O estresse sofrido em relação à umidade e temperatura, associado ao foto período longo, com intensidade de luz alta durante o verão, pode atuar nos níveis de rendimento dos óleos. Relacionando as amostras pode-se perceber que obtiveram rendimentos distintos, alterações no conteúdo e na composição química, mesmo sendo coletadas sob as mesmas condições e sendo obedecido os mesmos parâmetros de metodologia. Esse resultado pode garantir o que Pitarevic, 2013 afirma, que o óleo obtido de uma de planta serve como característica para aquela espécie. Mesmo que óleos diferentes apresentem compostos iguais

qualitativamente, diferenças quantitativas farão com que aquele óleo tenha propriedades químicas e biológicas diferentes dos demais. O solo de cada amostra também foi averiguado, quanto aos macro nutrientes e PH (Tabela 3) os valores indicam que o PH de todas as coletas encontrava-se ácido, com valores abaixo de 7. Essa característica influencia diretamente no teor dos outros nutrientes como P, Ca, Mg e K que são de fundamental importância para manutenção, desenvolvimento e do indivíduo (AKROUT, 2003). Segundo Grulova, 2014 o solo possui um efeito complexo sobre o crescimento, o desenvolvimento, e produção de metabólitos especiais, afirma também que foi detectado no solo alcalino e ácido um efeito estimulador na produção de óleo essencial. Comparando os teores das amostras coletadas, há pouca variação quanto aos níveis de nutriente, a amostra que se diferencia é a II que apresentou PH menos ácido e conseqüentemente valores maiores de cálcio, magnésio e potássio. Mesmo que, as condições abióticas e o estudo do solo, apresentem resultados adversos ao ideal para os óleos essenciais, nesse estudo foi possível comprovar a eficácia do óleo nas atividades biológicas, e esses fatores podem estar relacionados a extrema adaptabilidade das espécies a esse bioma, apresentam diversas adaptações fisiológicas às condições estressantes.

As análises cromatográficas dos óleos de *H. courbaril* L. var. *courbaril* podem ser observadas na tabela 4, onde um total de 36 componentes foram identificados, dos quais 32 estavam presentes nos óleos das quatro amostras. Os resultados das análises cromatográficas constam os índices de retenção calculados experimentalmente e os publicados na literatura para os compostos. Na Figura 2 é possível observar a seqüência de eluição dos componentes do óleo essencial, onde é possível contrapor que o perfil cromatográfico das amostras e observar que eles se diferem em termos quantitativos, principalmente no que se refere à proporção dos componentes.

Em todas as amostras, os principais compostos identificados foram Caryophyllene oxide (I: 20,55%; II: 20,50%; III: 20,83%; IV: 21,77%), β -Caryophyllene (I: 16,97%; II: 17,20%; III: 16,18%; IV: 17,32%) e Junipene (I: 13,58%; II: 13,07%; III: 13,72%; IV: 14,26%). O Caryophyllene oxide foi o composto majoritário encontrado apresentando variações no rendimento. De acordo com Santos et al. (2012), é provável que estas diferenças sejam devidas ao estágio de desenvolvimento da planta e a condições ambientais e geográficas em geral, já que as amostras foram coletadas em diferentes localidades, onde fatores podem estar influenciando na variabilidade químicas desses óleos.

A composição do óleo essencial das folhas do jatobá relatado no presente artigo está previamente de acordo com o estabelecido por Sales et al., 2014, porém os compostos majoritários diferem um pouco, estes autores determinaram que o germacreno-D (17,61%) era o componente majoritário seguido por β -cariofileno (17,56%) e óxido de cariofileno (14,65%). Enquanto, o do presente estudo o composto majoritário foi o Caryophyllene oxide para os quatro indivíduos, seguido pelo β -Caryophyllene e Junipene. No mesmo estudo os autores não fizeram distinção sobre a variedade da espécie estudada e afirmaram que todos os compostos identificados se tratavam de sesquiterpenos. No presente estudo, averigou-se 55% de sesquiterpenos e 45% de monoterpenos. Entre todas as amostras os quatro indivíduos apresentam ausência de alguns compostos, como o β -Copaene, α -Calacorene e τ -Muurolool, e isso pode estar relacionado à metodologia de extração, pois de acordo com Autran et al. (2009) quanto maior for o tempo de secagem dos tecidos vegetais maior é a proporção

de volatilidade dos compostos. Como a extração do óleo do indivíduo IV, foi a última é possível relacionar o tempo de extração após o corte e a composição do óleo.

Segundo Pereira (2007), a composição do óleo essencial de uma espécie de planta é, geralmente, específica para um determinado órgão e característica para o seu desenvolvimento, porém os aspectos ambientais são capazes de causar significativas variações. Alguns desses aspectos são: o ciclo vegetativo da planta; o processo de obtenção do óleo essencial; o ambiente no qual a espécie se desenvolve, o tipo de cultivo, a temperatura, umidade relativa, a quantidade de água e os nutrientes no terreno, entre outros. Essa dependência da composição do óleo essencial das condições ambientais pode ser verificada ao se comparar a composição e o rendimento de óleos essenciais extraídos em diferentes locais e partes de planta.

3.1 Atividade biológica

O ensaio da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais obtidos das amostras de *Hymenaea courbaril L. var courbaril* coletadas em diferentes fisionomias do Catimbau, foi contra 11 micro-organismos fitopatogênicos sendo cinco fungos e seis bactérias (Tabela 5 e 6). Os resultados obtidos a partir da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida/fungicida mínima (CBM/CFM), determinada pelo método de microdiluição em caldo, indicaram que as *Xanthomonas* e os *Fusarium* foram os microrganismos mais sensíveis, pois apresentaram valores de CIM e CBM/CFM entre 1,56-3,12 µl/mL e 12,5-25 µl/mL, respectivamente. Esta atividade pode ser atribuída à presença de monoterpenos, sesquiterpenos, como foi previamente relatado por Gazim et al. (2010).

A atividade contra os micro-organismos testados foi mais elevada na amostra IV. O óleo essencial do jatobá mostrou atividade contra diferentes linhagens de fungos envolvidos em várias doenças de planta como a murcha do tomate que de acordo com Hossein (2015) é considerada a grande vilã da tomaticultura, onde cerca de 15% dos custos de produção de tomate são atribuídos ao uso de fungicidas no combate de doenças causadas por este grupo de patógenos. Os óleos contêm uma elevada percentagem de sesquiterpenos oxigenados, segundo Ravindra (2015) os compostos desse grupo já foram bastante listados por possuir atividade positiva frente a fitopatogênicos. Os resultados dos bioensaios mostraram que os óleos essenciais exibiram boa atividade antimicrobiana contra todas as bactérias testadas o que demonstram serem fortes potenciais e um bom método alternativo para o combate dessas pragas e doenças agrícola.

4. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo sugerem que as variações entre as amostras na composição dos óleos essenciais podem ser atribuída a fatores genéticos e ambientais além disso, as origens geográficas não afetam o produto químico final. Neste trabalho, foi possível revelar que não houve diferenças significativas nos rendimentos, nas características químicas e nem nas atividades biológicas dos óleos essenciais da parte aérea coletadas em quatro fisionomias do PARNA do Catimbau.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, J.T.E.; LACHER, J.R.; DA SILVA, J.M.C. THE CAATINGA. **CEMEX, AGRUPACIÓN SERRA MADRE, S.C., MÉXICO**, P. 181, 2012.

AKROUT, A.A.; CHEMIL, R.; SIMMONDS, M.; KITE, G.; HAMMANI, M.; CHREIF, I. **SEASONAL VARIATION OF THE ESSENTIAL OIL OF ARTEMISIA CAMPESTRIS L.** JOURNAL ESSENT. OIL RES, V. 15, P. 333-336, 2003.

ANDRADE-LIMA, D. THE CAATINGAS DOMINIUM. REVISTA BRAILEIRA DE BOTÂNICA, V 4, P.149-153, 1981.

ARCOVERDE, J. H. V. Screening of Caatinga plants as sources of lectins and trypsin inhibitors. **Natural Product Research** v. 28, n. 16, p. 1297–1301, 2014.

AUTRAN, E.S., NEVES, I.A., DA SILVA, C.S.B., SANTOS, G.K.N., DA CÂMARA, C.A.G. Composition, Oviposition Deterrent and Larvicidal Activities against *Aedes aegypti* of Essential Oils from *Piper marginatum* Jacq. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2284-2288, 2009.

BEZERRA, G. P. et al. Phytochemical study guided by the myorelaxant activity of the crude extract, fractions and constituent from stem bark of *Hymenaea courbaril* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, p. 62–69, 2013.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 2009.

DE TROVÃO, D. M. Variações sazonais de aspectos fisiológicos de espécies da Caatinga. **R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental** v. 11, n. 3, p. 307–311, 2007.

ELOFF, J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Med**, v. 64, p. 711-713, 1998.

ESPINEL-INGROFF, A., KERKERING, T.M. Spectrophotometric method of inoculum preparation for the in vitro susceptibility testing of filamentous fungi. **J Clin Microbiol**, p. 393–394, 2002.

FÉLIX-SILVA, J. *et al.* In vitro anticoagulant and antioxidant activities of *Jatropha gossypifolia* L.(Euphorbiaceae) leaves aiming therapeutical applications. **BMC complementary and alternative medicine** v. 14, n. 1, p. 405, 2014.

GAZIM, Z.C.; AMORIM, A.C.L.; HOVELL, A.M.C.; REZENDE, C.M.; NASCIMENTO, I.A.; FERREIRA, G.A.; CORTEZ, D.A.G. Seasonal Variation, Chemical Composition, and Analgesic and Antimicrobial Activities of the Essential Oil from Leaves of *Tetradenia riparia*(Hochst.) Codd in Southern Brazil. **Molecules**, 2010.

GRULOVA, D.; MARTINO, L.; MANCINI, E.; SALAMONC, I.; DE FEOB, V. Seasonal variability of the main components in essential oil of *Mentha piperita* L. **Sci Food Agric**, v.25, 2014.

HOSSEIN S.; ZAHRA R.; MOHAMMAD, J. S. Variability in *Zataria multiflora* Bioss. essential oil of twelve populations from Fars province, Iran. **Industrial Crops and Products**, p. 221–226, 2015.

LIMA, H.R.P.; KAPLAN, M.A.C.; CRUZ, A.V. M. Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. **Floresta e Ambiente**, v. 10, n.2, p.71 - 77, 2003.

MMA (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, DOS RECURSOS HÍDRICOS E DA AMAZÔNIA LEGAL). 2012. Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da caatinga. Universidade Federal de Pernambuco/Fundação de apoio ao desenvolvimento, Fundação Biosiversitas, EMBRAPA/Semi-Árido, MMA/SBF, Brasília - DF. 36p.

N.S. RAVINDRA; R.N. KULKARNI. Essential oil yield and quality in rose-scented geranium: Variation among clones and plant parts. **Scientia Horticulturae**, p. 31–35, 2015.

National Committee for Clinical Laboratory Standards: NCCLS, 2009. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, approved standard-second edition M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, USA.

PEREIRA, C. K. B. et al. Composição química, atividade antimicrobiana e toxicidade do óleo essencial de *Hymenaea courbaril* (jatobá). 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. QUÍMICA, S. B. D. Águas de Lindoia - SP 2007.

PITAREVIC, I. Seasonal variation of essential oil yield and composition of dalmatian sage, *Salvia officinalis*. **Journal of natural products**, v. 47, n.3, p.409-412, 2013.
RIZZINI, C.T. Tratado de fitogeografia do Brasil (Segunda Edição). **Âmbito Cultural Edições Ltda.**, Rio de Janeiro, p.157, 2007.

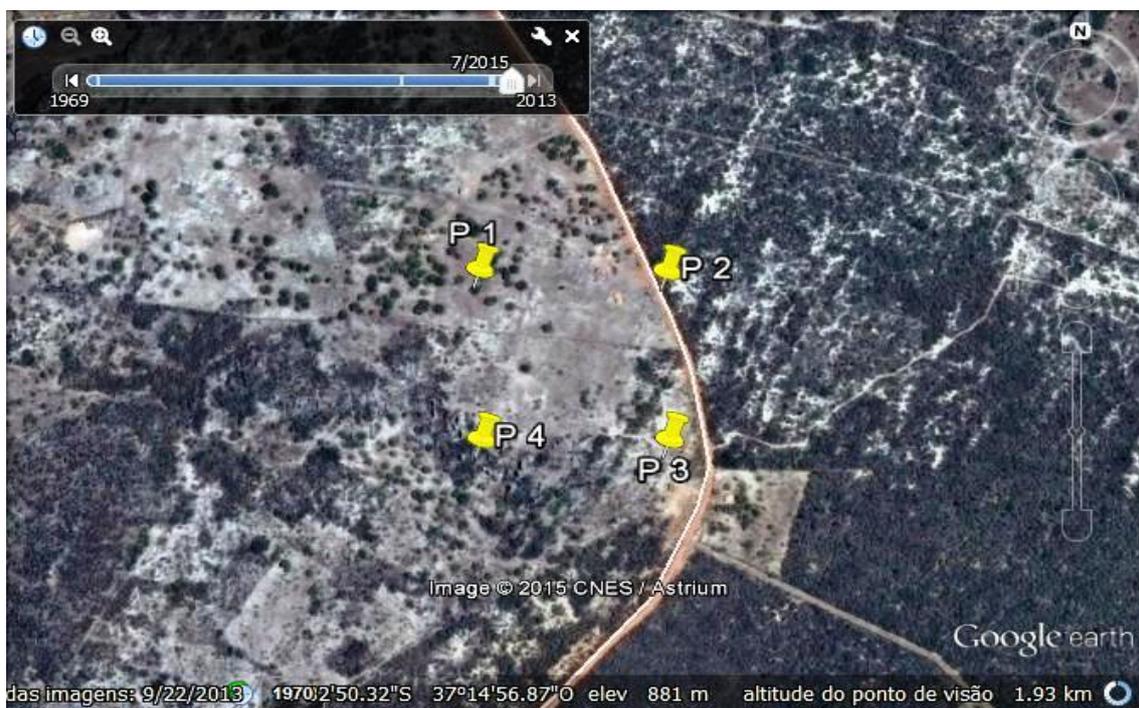
SALES, G. W. P. **Avaliação da atividade antimicrobiana e do mecanismo de ação do óleo essencial extraído da casca de frutos da *Hymenaea courbail* L.** 2014. 138 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará; Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas; Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza. 2014.

SANTOS, G. K. N., DUTRA, K. A., BARROS, R. A., CÂMARA, C. A. G., LIRA, D. D., GUSMÃO, N. B., NAVARRO, D. M. A. F. Essential oils from *Alpinia purpurata* (Zingiberaceae): Chemical composition, oviposition deterrence, larvicidal and antibacterial activity. **Industrial Crops and Products**, v. 40, p. 254-260, 2012.

TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C.; SANTOS, A.M.M.; VICENTE, A. Análise de representatividade das unidades de conservação de uso direto e indireto na caatinga. Relatório do Projeto Avaliação e Ações Prioritárias para a Conservação da biodiversidade da Caatinga, Petrolina, Brasil. **The Nature Conservancy do Brasil Associação Caatinga**, Recife, p. 301, 2000

ANEXOS

Figura 1. Localização dos pontos de coleta sendo, amostra I (P1), amostra II (P2), amostra III (P3) e amostra IV (P4).



Fonte: Google Earth (2015)

Figura 2. Cromatograma dos óleos das quatro amostras com detecção por espectrometria de massas (CG-MS).

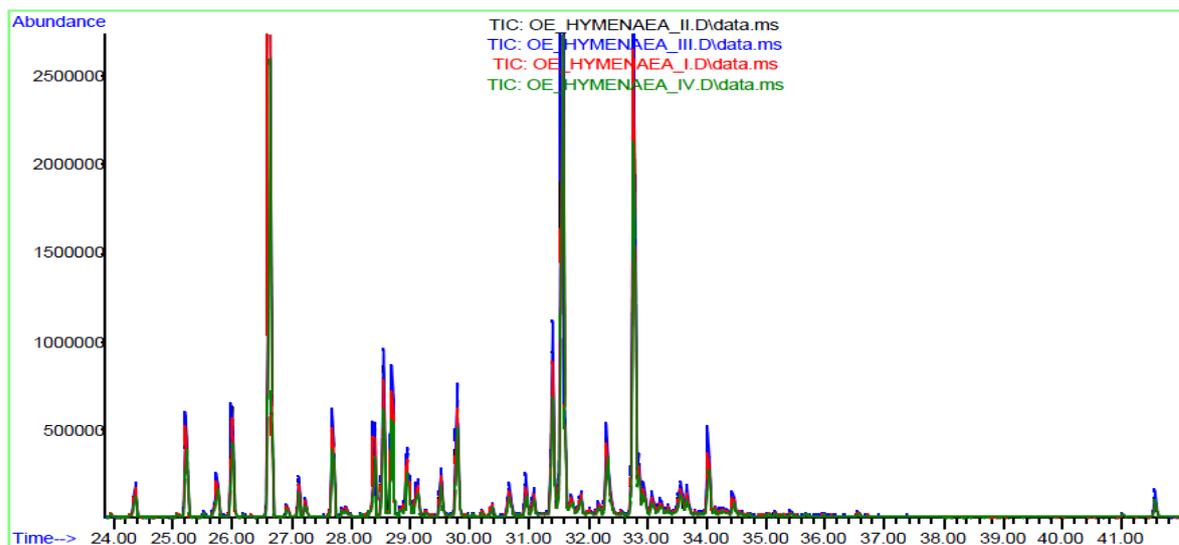


Tabela 1. Rendimento dos óleos essenciais dos quatro indivíduos de *Hymenaea courbaril* L. var. *courbaril*.

Amostra	Massa das folhas (g)	Massa do óleo (g)	Rendimento (%)
I	300	2,569	0,862
II	300	2,652	0,875
III	300	3,965	1,325
IV	300	4,358	1,452

Tabela 2. Localização dos pontos de coleta, destacando-se as coordenadas geográficas, as características do solo e os números de registro de tombamento das espécies.

Amostras	Local de coleta	Coordenadas	Voucher
Amostra I	P1 - Trilha da Pedra do Cachorro	8°32'47.7"S 37°15'0.76"O	IPA - 84893
Amostra II	P2 - Trilha da Prainha	8°32'47.48"S 37°14'45.20"O	IPA - 84894
Amostra III	P3 - Trilha da Igrejinha	8°32'53.88"S 37°14'53.81"O	IPA - 84895
Amostra IV	P4 - Trilha do Cânion	8°32'54.24"S 37°15'0.27"O	IPA - 84896

Tabela 3: Resultados da análise dos solos, quanto aos macro nutrientes e PH.

Solo	Macro Nutrientes mg/dm ³				
	$\frac{I}{p}$	p	$\frac{C}{Mg}$	Mg	\leq
I	4.70	10	0.75	0.65	0.06
II	5.20	1	1.85	0.85	0.09
III	4.60	11	1.20	0.80	0.06
IV	4.70	11	0.65	0.60	0.06

Tabela 4. Identificação dos constituintes dos óleos essenciais das quatro amostras de *Hymenaea courbaril* L. var. *courbaril*.

Nº	Composto ^a	Índice de retenção		Amostra (% do total de óleo)			
		Calculado ^b	Literatura ^c	I	II	III	IV
1	α -Cubebene	1351	1345	0,85	0,90	0,82	0,82
2	α -Copaene	1377	1374	2,42	2,51	2,29	2,41
3	β -Elemene	1393	1389	1,28	1,33	1,22	1,23
4	Cyperene	1401	1398	2,77	2,83	2,62	2,77
5	β-Caryophyllene	1421	1417	16,97	17,20	16,18	17,32
6	β -Copaene	1431	1430	0,29	0,31	0,29	-
7	<i>trans</i> - α -Bergamotene	1437	1432	0,88	0,91	0,86	0,87
8	Aromadendrene	1441	1439	0,45	0,47	0,44	0,45
9	α -Humulene	1456	1452	2,53	2,57	2,51	2,51
10	γ -Muurolene	1479	1478	2,64	2,69	2,56	2,54
11	germacrene D	1483	1484	3,95	3,98	3,90	3,95
12	β -Selinene	1488	1489	3,66	3,74	3,58	3,74
13	α -Selinene	1497	1498	2,18	2,22	2,14	2,24
14	<i>trans</i> - β -Guaiene	1503	1502	1,25	1,28	1,26	1,33
15	γ -Cadinene	1516	1513	1,12	1,13	1,08	1,14
16	δ -Cadinene	1525	1522	2,95	3,05	2,97	3,10
17	α -Calacorene	1545	1544	0,31	0,32	0,31	-
18	Ledane	1555	1542	0,89	0,95	0,97	0,89
19	<i>trans</i> - Nerolidol	1565	1561	0,82	0,83	0,96	0,79
20	1,5-epoxy-salvial-4(14)-ene	1569	1548	0,60	0,59	0,59	0,61
21	Limonene	1580	1584	4,52	4,47	4,59	4,53
22	Caryophyllene oxide	1586	1582	20,55	20,50	20,83	21,77
23	CNI	1591	-	0,66	0,63	0,62	-
24	Salvial-4(14)-em-1-one	1596	1594	0,68	0,72	0,68	0,73
25	CNI	1607	-	0,32	0,36	0,37	-
26	Humulene epoxide II	1612	1608	2,66	2,75	2,86	2,76
27	Junipene	1628	1620	13,58	13,07	13,72	14,26
28	1,5-epoxy-salvial-4(14)-ene	1631	1625	1,35	1,28	1,32	1,41
29	germacrene D	1634	1628	0,90	0,79	0,91	0,83
30	Caryophylla-4(12),8(13)-dien-5-ol	1639	1639	0,66	0,51	0,68	0,50
31	τ -Muurolol	1645	1640	0,61	0,42	0,61	-
32	α -Cadinol	1657	1652	1,29	1,07	1,31	1,02
33	CNI	1660	-	0,76	0,70	0,79	0,71
34	Caryophyllene <14-hydroxy-9-epi(E)->	1673	1668	1,72	1,94	2,01	1,75
35	Eudesma-4(15),7-dien-1-ol	1689	1687	0,42	0,49	0,55	0,40
36	CNI	1968	-	0,51	0,49	0,61	0,66
	Monoterpenos			46,5	47,44	45,03	46,42
	Sesquiterpenos			53,50	52,56	54,97	53,58
	Total			100	100	100	100

Tabela 5: Atividade antifúngica, determinação das concentrações inibitórias mínimas (MIC) e concentração mínima fungicida (MFC) das quatro amostras dos óleos essenciais de *Hymenaea courbaril* L. var *courbaril* contra fungos fitopatógenos.

Microrganismo	Óleos Essenciais (µl/mL)												Tiofanato-Metílico (µl/mL)		
	Amostra I			Amostra II			Amostra III			Amostra IV			MIC	MBC	C
	MIC	MBC	MBC/MI C	MIC	MBC	MBC/MI C	MIC	MBC	MBC/MI C	MIC	MBC	MBC/MI C			
<i>Aspergillus flavus</i>	50	25	2	50	25	2	50	25	2	12,5	12,5	1	0,12	0,12	1
<i>Fusarium moniliforme</i>	12,5	25	2	12,5	25	2	12,5	25	2	12,5	12,5	1	0,25	0,12	1
<i>Fusarium oxysporum</i>	12,5	25	2	12,5	25	2	12,5	25	2	12,5	25	2	0,5	0,5	1
<i>Fusarium solani</i>	12,5	25	2	12,5	25	2	12,5	25	2	12,5	25	2	0,25	0,25	1
<i>Verticillium lecanii</i>	50	25	2	50	25	2	50	25	2	12,5	12,5	2	0,12	0,25	2

Tabela 6: Atividade antibacteriana, determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) das quatro amostras dos óleos essenciais de *Hymenaea courbaril* L. var *courbaril* frente à bactérias fitopatogênas.

Microorganismo	Óleos Essenciais (µl/mL)												Cloraphenicol (µl/mL)		
	Amostra I			Amostra II			Amostra III			Amostra IV			MIC	MBC	MBC/MIC
	MIC	MBC	MBC/MIC	MIC	MBC	MBC/MIC	MIC	MBC	MBC/MIC	MIC	MBC	MBC/MIC			
<i>Acidovorax citrulli</i>	25	50	2	25	50	2	25	50	2	6,25	6,25	1	0,009	0,009	1
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	12,5	25	2	12,5	25	2	12,5	25	2	12,5	25	2	0,039	0,078	2
<i>Ralstonia solanacearum</i>	6,25	12,5	2	6,25	12,5	2	6,25	12,5	2	3,12	6,25	1	0,078	0,156	2
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	1,56	3,12	2	1,56	3,12	2	1,56	3,12	2	1,56	3,12	2	0,019	0,019	1
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>malvacearum</i>	1,56	1,56	2	1,56	1,56	2	1,56	1,56	2	1,56	1,56	2	0,039	0,039	1
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i>	3,12	6,25	2	3,12	6,25	2	3,12	6,25	2	3,12	6,25	2	0,004	0,004	1



Capítulo 2

Manuscrito a ser submetido no Periódico: **Journal of Stored Products Research**

Fator de impacto: 1.824

Qualis: B3

Guia para submissão:

https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/306?generatepdf=true

Avaliação do Potencial Inseticida do Óleo Essencial de *Hymenaea Courbaril* L. var. *Courbaril* sobre o ácaro-rajado *Tetranychus Urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) e o gorgulho do milho *Sitophilus Zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae)

Paula Fernanda Figueiredo das Mercês¹, Cibele Maria Alves da Silva Bessa^{1,2}, Ana Paula Sant'Anna da Silva^{1,2}, Cláudio Augusto Gomes da Câmara³, Milena Martins Correia Da Silva³, Thiago Henrique Napoleão⁴, Maria Tereza dos Santos Correa⁴, Márcia Vanusa da Silva⁴, Maria Luiza Vilela Oliva⁵

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, 1235, 50.670-901, Recife, PE, Brasil.

² Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, 1235, 50.670-901, Recife, PE, Brasil.

³ Laboratório de Produtos Naturais Bioativos, Departamento de Química – UFRPE, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900- Recife-PE, Brasil,

⁴ Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, 1235, 50.670-901, Recife, PE, Brasil.

⁵ Professora Associado e Livre Docente da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP, SP, Brasil.

* Autor para correspondência. Tel.: +55 81 9 8562 7490;
Email: pauladasmerces@gmail.com (MERCÊS, P.F.F das)

RESUMO

As propriedades inseticidas dos óleos essenciais têm sido reconhecidas empiricamente durante séculos, e foram confirmadas cientificamente nas últimas décadas. Tais produtos podem ser utilizados na agricultura como forma alternativa de controle de pragas. O óleo essencial extraído de folhas frescas de *Hymenaea courbaril* L. var. *courbaril* por hidrodestilação de arraste a vapor foi caracterizado e avaliado quanto à sobrevivência e fisiologia do *Sitophilus zeamais* Motsch. e analisado o efeito acaricida frente a *Tetranychus urticae* Koch que ocorre em uma grande variedade de culturas economicamente importantes em todo o mundo. Após analisado por CG/EM, 36 compostos foram identificados, os quais representaram 46,42% de monoterpenos e 53,58% de sesquiterpenos. Os bioensaios inseticidas com as duas pragas de interesse agrícola o *Sitophilus zeamais* (gorgulho-do-milho) e *Tetranychus urticae* (ácaro-rajado), foram realizados com uma amostra do óleo. Para avaliar a interferência do óleo essencial na fisiologia nutricional do gorgulho do milho, foram testadas quatro concentrações de 10, 30, 40 e 50 µl/g. O óleo causou mortalidade significativa ($p < 0.05$), promovendo dano fisiológico aos insetos, em todas as concentrações testadas. Nos testes de fumigação para com o ácaro-rajado, a CL_{50} foi de 35,57 µL L⁻¹ de ar, foram testadas concentrações 2,0 á 100,0 µL. Ainda no mesmo teste, pode-se observar que a oviposição também foi suscetível ao óleo essencial. Em conclusão, o óleo das folhas de *H courbaril* L. var. *courbaril* são fonte de compostos capazes de interferir e prejudicar o metabolismo das duas pragas estudadas.

Palavras-chave: Inseticidas naturais, toxicidade, gorgulho do milho, ácaro-rajado.

1. INTRODUÇÃO

Sabe-se que as plantas produzem diversos compostos orgânicos, muitos dos quais não participam diretamente de seu desenvolvimento. Essas substâncias referidas como metabólitos secundários ou produtos naturais desempenham um papel fundamental nas suas interações de defesa contra predadores e patógenos. Muitos destes apresentam atividades biológicas e têm sido utilizados na indústria farmacêutica e agroquímica (ANDRADE, 2006).

Entre os produtos alternativos, os óleos essenciais apresentam uma composição complexa, com centenas de componentes. As propriedades biológicas inerentes a eles são conhecidas desde tempos remotos e, por isso, têm sido usados como remédios, perfumes, condimentos, etc. em várias regiões do mundo e só recentemente têm sido comercializados para o controle de pragas (ISMAN et al., 2010). Nas últimas décadas têm sido amplamente investigados para o manejo integrado de várias pragas, ocupando um lugar de destaque na busca por alternativas aos pesticidas sintéticos (COUTINHO et al., 2011).

O uso prolongado e em grande quantidade de defensivos agrícolas pode levar a contaminação ambiental e dos alimentos, representando perigo para a saúde dos consumidores. Devido a tais problemas e a necessidade de se praticar uma agricultura sustentável, diversos estudos vêm sendo conduzidos na busca por métodos alternativos para o controle de doenças em plantas (KIMATI et al., 2010). Insetos-praga são aqueles que ocasionam grandes avarias e prejuízos a produtos e recursos agrícolas, podendo causar danos cujos impactos superam o gasto que seria necessário para evitá-los (BUZZI 2005, SALVADORI 2009).

O gorgulho do milho (*Sitophilus zeamais*) é um inseto cosmopolita que ocorre ao longo das regiões tropicais e infesta grãos de maior importância mundialmente: como o milho, e ainda capaz de se alimentar de outros produtos como pêssegos, maçã, uva, marmelo e ameixa, além de produtos processados como macarrão e biscoitos (BOTTON 2005, FAZOLIN et al. 2010). De acordo com Tefera et al. (2011) junto com outras pragas o *S. zeamais* causa um perda estimada de 20 a 30% da produção de milho. As perdas no armazenamento de grãos são muitas vezes mais graves do que as que ocorrem na cultura em campo, pois são definitivas e irrecuperáveis. Estudos relatam prejuízos provocados pelos inseticidas atualmente utilizados no controle desse inseto a organismos não-alvo e ao homem, além da persistência no ambiente.

Outra praga cosmopolita de interesse agrícola que provoca prejuízo para pequenos, médios e grandes agricultores é *Tetranychus urticae* Koch conhecido como ácaro-rajado (GALLO et al., 2002) Sua presença é registrada em todo o Brasil e em Pernambuco, desde 1985. São minúsculos artrópodes que se alimentando da seiva, isso causa o aparecimento de manchas cloróticas e a morte foliar. (ARAÚJO- JUNIOR, et al., 2010). O controle desta praga é feito com a utilização de inseticidas convencionais, os quais trazem efeitos negativos, como a perda de produtividade (MAZZOLENI, 2010). Uma das preocupações atuais é a identificação de compostos vegetais que promovem efeitos deletérios no ciclo biológico de insetos que causam danos a saúde humana ou perdas econômicas.

O bioma Caatinga, característico da flora do Nordeste do Brasil, se destaca por apresentar uma vegetação composta principalmente por plantas adaptadas às

drásticas condições climáticas (SAMPAIO, 1995). Possui uma flora aromática, abrangendo vários gêneros, como: *Hymenaea* (Fabaceae-Caesalpinioideae) que agrega presentemente 14 espécies e 26 táxon (LEWIS et al., 2005), dos quais 23 ocorrem no Brasil (PESTANA, 2010). Espécies de *Hymenaea* são relatadas como ricas em terpenóides (óleo essencial) e alcaloides (SALES, 2014). Esse gênero está entre os mais ricos da família das leguminosas como fonte de compostos bioativos (CASTELLEN, 2005). As espécies do gênero *Hymenaea* são conhecidas popularmente como jatobá e jatobá do cerrado e são utilizadas para os mais variados fins (KIM et al. 2004).

Entre as espécies de plantas aromáticas que são abundantes na Caatinga de Pernambuco está *Hymenaea courbaril* L. var. *courbaril*. Esta planta constitui uma árvore de 3m de altura aproximadamente, que ocorre naturalmente nos afloramentos rochosos na zona do agreste pernambucano. Na vegetação, se caracteriza pelo cheiro agradável proveniente principalmente de suas folhas e frutos. Até o presente momento, o potencial inseticida dessa espécie não foi avaliado. Assim, este trabalho estudou a composição química dos óleos essenciais das folhas de *H. courbaril* L. var. *courbaril*. e seu potencial contra duas importantes pragas no Nordeste do Brasil.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta do material Botânico

As folhas de *H. courbaril* L. var. *courbaril* foram coletadas no Parque Nacional do Catimbau (Latitude: 8°32'47.7"; Longitude: 37°15'0.76"), em fevereiro de 2014. Em seguida, foram separadas dos galhos e armazenadas em sacos sob refrigeração, para posterior extrações dos óleos essenciais. Utilizou-se o moedor elétrico (Cienlab, CE-430), para trituração das amostras vegetais. Os indivíduos foram identificados e tombados pelo Herbário do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), sob o número de registro IPA – 84893.

Extração dos óleos essenciais

As folhas frescas (cerca de 300g) foram submetidas à hidrodestilação por 5h e os óleos essenciais coletados através de aparelho tipo Clevenger, pela técnica de arraste a vapor. Os óleos foram separados da água, e armazenados em recipientes âmbar selados à baixa temperatura. O rendimento dos óleos foi calculado com base no peso do material fresco. O procedimento da extração foi repetido três vezes.

Análises por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

Para a análise dos óleos essenciais foram injetadas alíquotas de 1µL em split 1:50 do óleo essencial com concentrações variando entre 2000 a 3000 ppm. Posteriormente, injetou-se 1µL em split (1:50) da mistura de padrões de hidrocarbonetos: C9-C34. E por fim, injetou-se a mistura do óleo essencial e a mistura de padrões de hidrocarbonetos, 1µL (0.2µL de alcanos e 0.8µL de óleo) sob o modo splitless. A temperatura do CG foi mantida em 60 °C por 3 min, depois foi aumentando de 2,5 °C min⁻¹ até 240 °C e mantida por 10 min nesta temperatura. O fluxo de hélio foi mantido em pressão constante de 100 kPa. A interface do EM foi definida em 200 °C e os espectros de massa registrados em 70 eV (em modo EI) com uma velocidade de escaneamento de 0.5 scan-s de *m/z* 20-350. A partir da análise dos tempos de

retenção dos compostos presentes na amostra do óleo essencial, dos padrões de hidrocarboneto e a combinação do óleo essencial com a mistura de padrões foi calculado o índice de retenção para cada componente do óleo, segundo a equação de Kratz. Os compostos foram identificados a partir de comparação de seus espectros de massa e tempos de retenção àqueles de padrões autênticos disponíveis nas bibliotecas de referência MassFinder 4, NIST08 e Wiley Registry™ 9th Edition, integradas ao software Agilent MSD Productivity ChemStation (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA). As áreas dos picos nos cromatogramas foram integradas para obtenção do sinal iônico total e seus valores utilizados para determinar as proporções relativas de cada composto.

Bioensaio – *Tetranychus urticae* (ácaro-rajado)

Criação do Ácaro

O ácaro rajado *T. urticae* utilizado foi obtido da criação mantida em plantas de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformes* L.) do Laboratório de Acarologia Agrícola do Departamento de Agronomia da UFRPE a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, U.R. $65 \pm 3\%$ e fotofase de 12h. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Química de Produtos Naturais Bioativos da UFRPE, à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, U.R. $70 \pm 10\%$ e fotofase 12h.

Teste de Contato Residual – Fumigação

O método de “pincelagem” em disco de folha descrito por SILVA, M. et al., (2013), foi usado para avaliar a toxicidade de contato residual do óleo essencial. As concentrações utilizadas variaram de 2 a 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$, sendo as soluções preparadas através da diluição dos óleos em metanol. Três discos foliares de feijão-de-porco (2,5cm) foram imersos nas soluções previamente preparadas. Após secagem os discos foram condicionados de forma equidistantes em placas de Petri (9cm) contendo um disco de papel de filtro saturado com água para evitar a fuga dos ácaros e manter a turgidez das folhas. Em cada disco de folha foram colocadas 10 fêmeas adultas do *T. urticae*. A mortalidade foi determinada após 24 horas de exposição. Os ácaros foram considerados mortos quando incapazes de caminhar uma distância superior ao comprimento do seu corpo após um leve toque com a extremidade de um pincel de cerdas finas. Os discos controle foram tratados apenas com metanol. O Eugenol foi usado como controle positivo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados foram analisados pelo modelo de Probit através do Software POLO-PC para a determinação dos valores da CL_{50} , com intervalos de confiança a 95% (LEORA, 1987), validados através do programa estatístico SAS (SAS Institute 2002- 2004) e gerados na forma de gráfico através do Software SigmaPlot (SigmaPlot, 2007).

Bioensaio - *Sitophilus zeamais* (Gorgulho-Do-Milho)

Criação dos insetos

Colônias de *S. zeamais* foram mantidas no Laboratório de Bioquímica de Proteínas do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco (Recife, Brasil). As colônias foram mantidas em recipientes de vidro (capacidade de 1 L) cobertos com voal, à temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$, 70% de umidade relativa e fotoperíodo de 12:12 claro:escuro. A dieta consistiu em grãos de milho selecionados

de acordo com a integridade, condições sanitárias, tamanho, e ausência de contaminação por insetos. Insetos adultos (30 a 60 dias de idade) foram utilizados nos experimentos.

Experimento

Os testes foram realizados segundo uma adaptação do método de Xie et al. (1996) descrita por Napoleão et al. (2013). Cada bioensaio consistiu em uma placa de petri (90 x 15 mm) contendo cinco discos de uma mistura de farinha de trigo com o extrato de folhas. Para preparação dos discos, 5 mL de uma solução do extrato em determinada concentração foram adicionados a 2 g de farinha de trigo autoclavada. Após homogeneização por 5 min, cada disco foi preparado retirando-se uma alíquota de 200 µL da mistura. As placas foram postas em estufa a 56 °C por 24 h e, em seguida, a massa dos discos foi registrada.

Foram avaliadas concentrações de 20, 60, 80 e 100 µl/ml. Ao final, grupos de 20 insetos com peso conhecido foram transferidos para cada placa. Os bioensaios foram realizados em quadruplicata e mantidos a 28 ± 2 °C. No controle negativo foi utilizado Tween[®]80 a 1%. Após 7 dias de experimento, a taxa de mortalidade e o peso dos discos e dos insetos foram determinados. O índice de deterrência alimentar (IDA) foi calculado segundo a fórmula: $IDA = [100 \times (C - T)]/C$, onde *C* corresponde à massa ingerida no controle e *T* à massa ingerida no teste. De acordo com os valores de IDA, o efeito da amostra foi classificado como: não-deterrente (IDA < 20%), deterrente fraco ($50\% > IDA \geq 20\%$), deterrente moderado ($70\% > IDA \geq 50\%$) ou deterrente forte (IDA $\geq 70\%$) (PROCÓPIO et al. 2015).

Os seguintes índices nutricionais foram também calculados: Taxa de ganho relativo de biomassa (TGB): (biomassa adquirida)/(biomassa inicial dos insetos x dias); Taxa de consumo relativo (TCR): (massa ingerida)/(biomassa inicial dos insetos x dias). Eficiência de conversão do alimento ingerido (ECAI): (biomassa adquirida/massa ingerida) x 100. Para a análise estatística foi calculado as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos e foram calculadas através do Teste de Tukey. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O rendimento do óleo das folhas foi de 0,53% (v/m), o mesmo apresentou cor esverdeada com forte aroma. A análise dos constituintes do óleo essencial de folhas de *H. courbaril* L. var. *courbaril* revelou a presença de componentes reconhecidamente inseticidas, como o α -pineno, junipene e limoneno (MOREIRA, 2005), além disso, permitiu a identificação de 36 compostos representando 96,68% dos constituintes do óleo. Essa análise revelou também que os compostos majoritários foram: Caryophyllene oxide (21,77%), β -Caryophyllene (17,32%) e Junipene (14,26%). O índice de retenção e a percentagem de compostos identificados constam na Tabela 1. O óleo volátil de várias espécies de *Hymenaeae* tem sido caracterizado pela predominância de constituintes químicos da classe dos monoterpenos e sesquiterpenos como principais componentes (Meccia et al., 2000).

De acordo com a Tabela 2 verifica-se que o óleo das folhas foi tóxico ao ácaro rajado com uma CL_{50} de 35,27 microlitros por litros de ar, provocando 79,6% de mortalidade em 24h. O óleo das folhas do jatobá pode ser considerado significativo,

pois a eficiência aumentou diretamente com a concentração e tempo de exposição, caracterizando o efeito fumigante. Resultados semelhantes foram encontrados por Aslan et al. (2004) e Çalmaşur et al. (2005) com óleos essenciais obtidos de outras plantas aromáticas contra espécies do gênero *Hymeneae*.

O óleo do jatobá foi tóxico ao *T. urticae*, pois a mortalidade e a oviposição diminuíam à medida que as concentrações eram aumentadas. Como pode-se verificar na figura 1, onde na concentração, de 10,0µL/mL, ocorreu redução na fecundidade de 40%. As concentrações de 20,0 e 25,0 µL/mL reduziram a fecundidade em 26,8 e 18,4%, respectivamente. Porém na concentração de 2,0 µL/mL, houve aumento do numero de ovos, como é possível observar na figura 1, para explicar tal acontecimento, acredita-se que tenha ocorrido um efeito de hormoligose. De acordo com Luckey (1968), hormoligose é a ação de agentes estressantes sobre um organismo que numa determinada dosagem pode estimular o desenvolvimento desse organismo quando aplicado em sub-dosagem. Nesse experimento, os insetos foram confinados em câmaras de fumigação, não podendo fugir a ação do agente estressante. Provavelmente, o óleo pode ter liberado substâncias estressantes, causando uma mudanças no comportamento do ácaro-rajado, estimulando sua reprodução como tentativa para perpetuar sua descendência, deste nodo desencadeado o fenômeno conhecido como hormoligose. Após a análise pode-se verificar que o óleo de *H. courbaril* L. var. *courbaril* é uma mistura complexa de monoterpenos, sesquiterpenos que atua no ácaro através da ingestão desse complexo de constituintes visto que o artrópode escarifica o tecido vegetal para se alimentar, dessa forma, os diversos constituintes do óleo essencial atuam no sistema nervoso central e o organismo do artrópode não consegue desenvolver mecanismos suficientes para agir contra o ataque dessas diversas substâncias. Esse resultado pode ser explicado devido aos diferentes modos de ação que esses metabólitos especiais podem apresentar para diferentes espécies, sem excluir o possível efeito sinérgico de outros constituintes do óleo, em pequenas quantidades, que podem ter mascarado a reconhecida atividade acaricida de ambos os monoterpenos descritos por Sutherst et al. (1982).

A ingestão do óleo das folhas de *Hymeneae courbaril* L. var *courbaril* resultou na CL₅₀ de 43,70 µl/g ocasionando a morte dos adultos de *S. zeamais* nas concentrações de 10, 30, 40 e 50 µl/g.com. A taxa de ganho de biomassa relativa nos tratamentos com o óleo a 30µL/g foi significativamente mais baixo ($P < 0.05$) do que o controle (figura 2A). Esses valores continuaram negativos nos tratamentos com as concentrações mais elevadas, indicando que o inseto não só teve menos ganho de peso, mas que eles perderam biomassa, segundo Napoleão (2013) uma possível explicação para esse resultado é que os altos níveis do óleo alteram os processos de ingestão e a absorção, de modo que o inseto começa a metabolizar as suas reservas corporais para sobreviver. A taxa de consumo relativo (Fig. 2B) não foram significativamente diferentes do que o controle ($p > 0,05$) determinando e um fraco efeito de deterrência alimentar. Não houve efeito deterrente em nenhuma concentração. Para os experimentos com o *S. zeamais* verificou-se que a ingestão dos discos contendo o óleo induziu distúrbios nutricionais, em todas as concentrações testadas. Os valores de ECAI, capazes de demonstrar quanto do alimento foi ingerido e convertido em bimoassa, negativamente de variou de 10 a 30% (figura 2C) indicando que o alimento ingerido foi insuficiente para contrabalançar o prejuízo causado, esse resultado pode ser evidenciado no controle, onde o alimento ingerido foi de 12,02%,

porém esse parâmetro diminuiu na primeira concentração para 0,13% indicando uma dificuldade inicial para os insetos em incorporar os nutrientes na dieta. Nos tratamentos com as concentrações de 10 e 50 μ L/g os valores negativos aumentaram e variaram.

Esses resultados indicam que os insetos não conseguiram incorporar a dieta e que a quantidade de comida ingerida não foi suficiente para compensar os efeitos deletérios causados pelo óleo, resultando em perda de biomassa, logo isso demonstrou que a incorporação do óleo das folhas do jatobá na dieta dos insetos, levou a um desequilíbrio no crescimento e na fisiologia do inseto. Produtos naturais podem ser utilizadas em pequena escala por agricultores para proteger grãos armazenados de infestação dos insetos. Diversas plantas aromáticas, têm sido usados para proteger grãos e leguminosas armazenados de pragas (Ngamo et al 2007;.. Li et al 2013). A fumigação é o método mais comumente utilizado para o controle de pragas em produtos armazenados porque é geralmente barato, rápido, eficaz contra insetos em todas as fases da vida, e aplicação direta de insetos é possível (Graver, 2004; Nenaah, 2014). O óleo de jatobá foi menos eficaz do que o brometo de metilo, que é capaz de matar adultos *S. zeamais* com CL_{50} de 0,67 μ l/mL (Liu e Ho, 1999). No entanto, esses inseticidas fumigante utilizado atualmente é fortemente tóxico para os seres humanos (Yang et ai, 1995;.. Nath et al, 2011). Nos os últimos anos, tem havido um esforço considerável para avaliar o potencial dos metabólitos secundários das plantas como fontes de agentes de controle e conseqüentemente novas fontes para a concepção de moléculas alvo-específica (Ateyyat et ai. 2009; Gaikwad et ai. 2010; Li et al. 2011).

4. CONCLUSÃO

Na caracterização química do óleo é possível averiguar a presença de diversos componentes descritos na literatura com efeitos inseticidas. Na atividade acaricida o óleo causou alterações na redução da eficiência reprodutiva e da longevidade, afetando o comportamento do ácaro-rajado. Pode-se concluir também que o óleo essencial das folhas de *H. courbaril* L. var. *courbaril* são fonte de compostos com ação deletéria sobre a fisiologia nutricional de adultos de *S. zeamais*. Contudo, esse resultados comprovam que o óleo pode causar interferência tóxica nas funções bioquímicas e fisiológicas dessas pragas.

5. REFERENCIAS

ANDRADE, S. P. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de *Cassia fistula* (Leguminosae). Osasco, SP: **Revista PIBIC**, v.3, n.2, p. 151-158. 2006.

ARAÚJO, C.P.JR.; C.A.G. CÂMARA; I.A. NEVES; N.C. RIBEIRO; C.A. GOMES; M.M. MORAES; P.S. BOTELHO. Acaricidal activity against *Tetranychus urticae* and chemical composition of peel essential oils of three *Citrus* species cultivated in NE Brazil. **Nat. Prod.Communic**, v.5, p. 471-476. 2010.

ASLAN, İ.; H. ÖZBEK; Ö. ÇALMASUR; F. ŞAHİN. Toxicity of essential oil vapours to two greenhouse pests, *Tetranychus urticae* Koch and *Bemisia tabaci* Genn. **Ind. Crop Prod**, v 19, p. 167-173. 2004.

BOTTON, M; LORINI, I; AFONSO, A. P. S. Ocorrência de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae) danificando a cultura da videira no Rio Grande do Sul. **Neotropical Entomology**, v. 34. 2005.

CASTELLEN, M. D. S. **Avaliação do estado de conservação de populações naturais de Jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) por meio de análises de estrutura genética e autocorrelação espacial.** Tese Pós-graduação em Ecologia e Agroecossistemas, Universidade de São Paulo. 2005

COITINHO, R.; J.V. DE OLIVEIRA; M.G. GONDIM JÚNIOR; C.A.G. DA CAMARA. Toxicity by fumigation, contact and ingestion of essential oils in *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1885 (Coleoptera: Curculionidae). **Ciênc. Agrotec**, v.35, p.172-178. 2011.

FAZOLIN, M; COSTA, C. R; DAMACENO, O. J. E. O; ALBUQUERQUE, E. S; CAVALCANTE, A. S. S; ESTRELA, J. L. V. Fumigação de milho para o controle do gorgulho utilizando caule de *Tanaecium nocturnum*(Bignoniaceae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, p. 1-6. 2010.

GALLO, D; NAKANO, O; NETO, S. S; CARVALHO, R. P. L; BAPTISTA, G. C; FILHO, E. B; PARRA, J. R P; ZUCCHI, R. A; ALVES, S. B; VENDRAMIM, J. D; MARCHINI, L. C; LOPES, J. R. S; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, v. 10, p. 920. 2002.

ISMAN, M.B.; S. MIRESMALLI; C.M. MACHIAL. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. **Phytochem**, rev.9, p.1-8. **2010.**

KATO N.S.; E.C. LIMA; S.R. CONCEIÇÃO; R.M. KUSTER; A.M. OLIVEIRA FILHO ; C.L.S. LAGE. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Quim. Nova**, v.27, p.46-49. 2004.

KIMATI, H., et al. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas.** São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda., v.2. 2010.

LEORA SOFTWARE. POLO - PC: a User's Guide to Probit Logit Analysis. **LeOra Software**, Berkely, CA, 1987.

LUCKEY, T. D. Insecticide hormoligosis. **Journal of Economic Entomology**, v.61, p.7-12, 1968.

MAZZOLENI, E. M.; OLIVEIRA, L. G. Inovação Tecnológica na Agricultura Orgânica: estudo de caso da certificação do processamento pós-colheita. **RESR**, Brasília, 48, p. 567-586, 2010.

MECCIA, G.; L.B. ROJAS; C. ROSQUETE; A. SAN FELECIANO. Essential oil of *Croton ovalifolius* Vahl from Venezuela. **J. Flavour Fragr. J.**,v.15, p.144-146. **2000.**

MOREIRA, I.C.; J. H. G. LAGO; N. F. ROQUE. Sesquiterpenes, diterpenes, steroids and alkaloid from branches of *Xylopiá brasiliensis* Spreng (Annonaceae). **Biochem. Syst. Ecol**, p. 948-951. 2005.

NAPOLEÃO, T.H.; BELMONTE, B.R.; PONTUAL, E.V.;ALBUQUERQUE, L P.; SÁ, R.A.; PAIVA, L.M.; COELHO, L.C.B.B; PAIVA, P.M.G. Deleterious effects of *Myracrodruon urundeuva* leaf extract and lectin on the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 54, p. 26-33. 2013.

PESTANA, L.T.C. **Estudo taxonômico de *Hymenaea* L.: complexo *H. courbaril*, *H. martiana* e *H. stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioidea: Detarieae).** 2010, Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS, 2010.

PROCÓPIO, T.F.; BELMONTE, B.R.; PAIVA, P.M.G.; AFONSO CORDEIRO AGRA-NETO, A.C.; EMMANUEL VIANA PONTUAL, E.V.; THIAGO HENRIQUE NAPOLEÃO, T.H. Interferência do extrato aquoso de folhas de *Tradescantia spathacea* na fisiologia nutricional do gorgulho do milho, *Sitophilus zeamais*. **Arrudea**, Recife, v.1,n.1, p. 023 – 027. 2015.

SAMPAIO, E.V.S.B. Overview of the brazilian caatinga. In: BULLOCK, S.H.; MOONEY, H.A.; MEDINA, E. (Eds.). **Seasonally dry forests**. Cambridge: University Press, p.35-58. 1995.

SILVA, M. M. C.; LIMA, G. S.; CAMARA, C. A. G. Forte efeito antagônico entre óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Syzygium aromaticum* L. (cravo-da-índia) sobre o ácaro rajado (*Tetranychus urticae*). 13. In: **Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão – UFRPE**, Recife, 2013.

SUTHERST, R.W.; R.J. JONES; H.J. SCHNITZERLING. Tropical legumes of the genus *Stylosanthes* immobilize and kill cattle ticks. **Nature**, v.295, p.320-321. **1982**.

TEFERA, T.; MUGO, S.; LIKHAYO, P. Effects of insect population density and storage time on grain damage and weight loss in maize due to the maize weevil *Sitophilus zeamais* and the larger grain borer *Prostephanus truncates*. **African Journal of Agricultural Research**, v. 6, p. 2249-2254. 2011.

VIEGAS JR., C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Quím. Nova**, v.26, p. 390-400. 2013.

XIE, M.; HU, J.; LONG, Y.M.;ZHANG, Z.L.; XIE, H.Y.; PANG, D.W. Lectin-modified trifunctional nanobiosensors for mapping cell surface glycoconjugates. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 1311-1317. 2009.

LI, H.Q.; BAI, C.Q.; CHU, S.S., ZHOU, L.G.; DU, S.S.; LIU, Z.L. Chemical composition and toxicities of the essential oil derived from *Kadsura heteroclita* stems against *Sitophilus zeamais* and *Meloidogyne incognita*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, p. 4943–4948, 2011.

NGAMO T.S.L.; GOUDOU, A.; NGASSOUM, M.B. Chronic toxicity of essential oil of 3 local aromatic plants towards *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). **African Journal of Agricultural Research**, v. 2, p. 164–167, 2007.

YANG, J.F.; YANG, C.H.; CHANG, H.W.; YANG, C.S. Chemical composition and antibacterial activities of *Illicium verum* against antibiotic-resistant pathogens. **Journal of Medicinal Food**, v.13, p. 1254–1262, 2010.

ATEYYAT, M.A.; AL-MAZRA'AWI, M.; ABU-RJAI, T.; SHATNAWI, M.A. Aqueous extracts of some medicinal plants are as toxic as Imidacloprid to the sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci*. **Journal of Insect Science**, v. 9, p. 15, 2009.

NAPOLEÃO, T.H.; BELMONTE, B.R.; PONTUAL, E.V.; ALBUQUERQUE, L.P.; SA, R.A.; PAIVA, L.M.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P.M.G. Deleterious effects of Myracrodruon urundeuva leaf extract and lectin on the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 54, p. 26- 33, 2013.

GRAVER, J.E.; VAN, S. Guide to Fumigation under Gas-Proof Sheets. **Food and Agricultural Organization of the United Nations**, Rome, v. 25, p. 25, 2004.

Tabela1: Percentual dos Constituintes voláteis de Folhas de *Hymenaea courbaril* L. var. *courbaril*. Os componentes são listados de acordo com a ordem de eluição. RI: retenção índices calculados em relação a padrões de mistura de hidrocarbonetos.

Nº	Composto ^a	Índice de retenção		Óleo IV
		Calculado ^b	Literatura ^c	
1	α -Cubebene	1351	1345	0,82
2	α -Copaene	1377	1374	2,41
3	β -Elemene	1393	1389	1,23
4	Cyperene	1401	1398	2,77
5	β -Caryophyllene	1421	1417	17,32
6	β -Copaene	1431	1430	-
7	<i>trans</i> - α -Bergamotene	1437	1432	0,87
8	Aromadendrene	1441	1439	0,45
9	α -Humulene	1456	1452	2,51
10	γ -Muuroleone	1479	1478	2,54
11	Germacrene D	1483	1484	3,95
12	β -Selinene	1488	1489	3,74
13	α - Selinene	1497	1498	2,24
14	<i>trans</i> - β -Guaiene	1503	1502	1,33
15	γ -Cadinene	1516	1513	1,14
16	δ -Cadinene	1525	1522	3,10
17	α -Calacorene	1545	1544	-
18	Ledane	1555	1542	0,89
19	<i>trans</i> - Nerolidol	1565	1561	0,79
20	1,5-epoxy-salvial-4(14)-ene	1569	1548	0,61
21	limonene	1580	1584	4,53
22	Caryophyllene oxide	1586	1582	21,77
23	CNI	1591	-	-
24	Salvial-4(14)-em-1-one	1596	1594	0,73
25	CNI	1607	-	-
26	Humulene epoxide II	1612	1608	2,76
27	Junipene	1628	1620	14,26
28	1,5-epoxy-salvial-4(14)-ene	1631	1625	1,41
29	germacrene D	1634	1628	0,83
30	Caryophylla-4(12),8(13)-dien-5-ol	1639	1639	0,50
31	τ -Muurolol	1645	1640	-
32	α -Cadinol	1657	1652	1,02
33	CNI	1660	-	0,71
34	Caryophyllene <14-hydroxy-9-epi(E)->	1673	1668	1,75
35	Eudesma-4(15),7-dien-1-ol	1689	1687	0,40
36	CNI	1968	-	0,66
	Monoterpenos			46,42
	Sesquiterpenos			53,58
	Total			100

Tabela 2: Toxicidade por contato residual (CL_{50} em $\mu\text{L/mL}$) do óleo essencial de *H. courbari* L. var. *courbaril* e eugenol sobre *T. urticae*.

Óleo	N	GL	slope	CL_{50} (IC 95%)	χ^2	RT (IC 95%)
<i>H. courbari</i> L. var. <i>courbaril</i>	540	4	3,51 (3,19 – 3,83)	35,57 (31,44 – 39,88)b	2,91	1,36 (1,09 – 1,69)
Eugenol	540	4	9,14 (7,90 – 10,38)	26,26 (22,11- 28,62)a	7,04	-

Figura 1: Mortalidade  e oviposição  de *T. urticae* em discos de folhas pulverizados com diferentes concentrações do óleo das folhas de *H. courbari* L. var. *courbaril*.

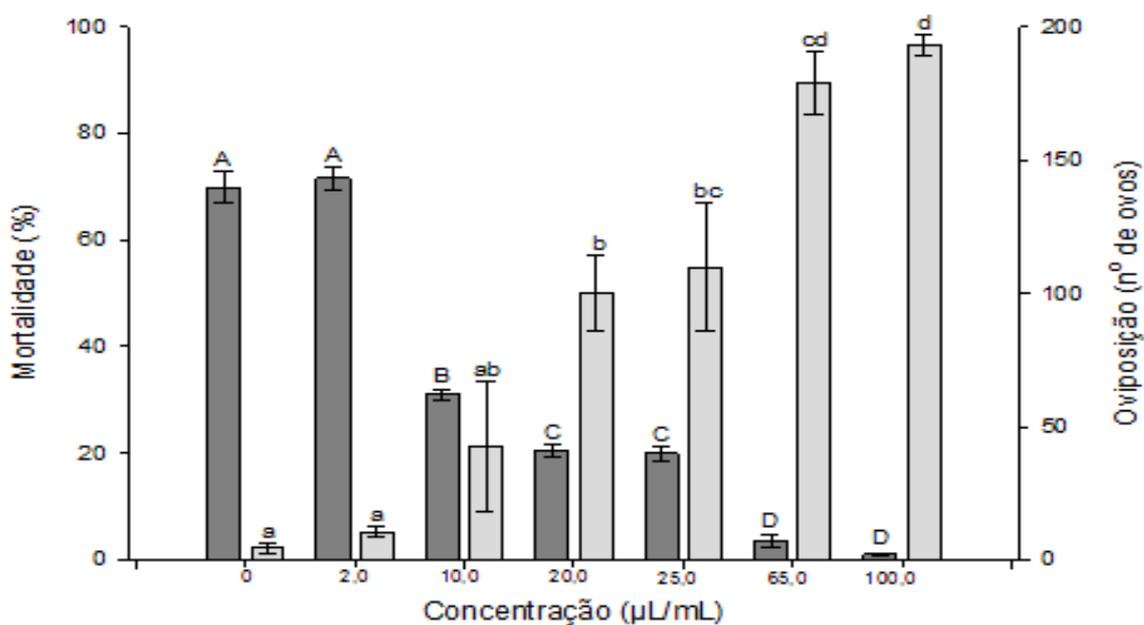
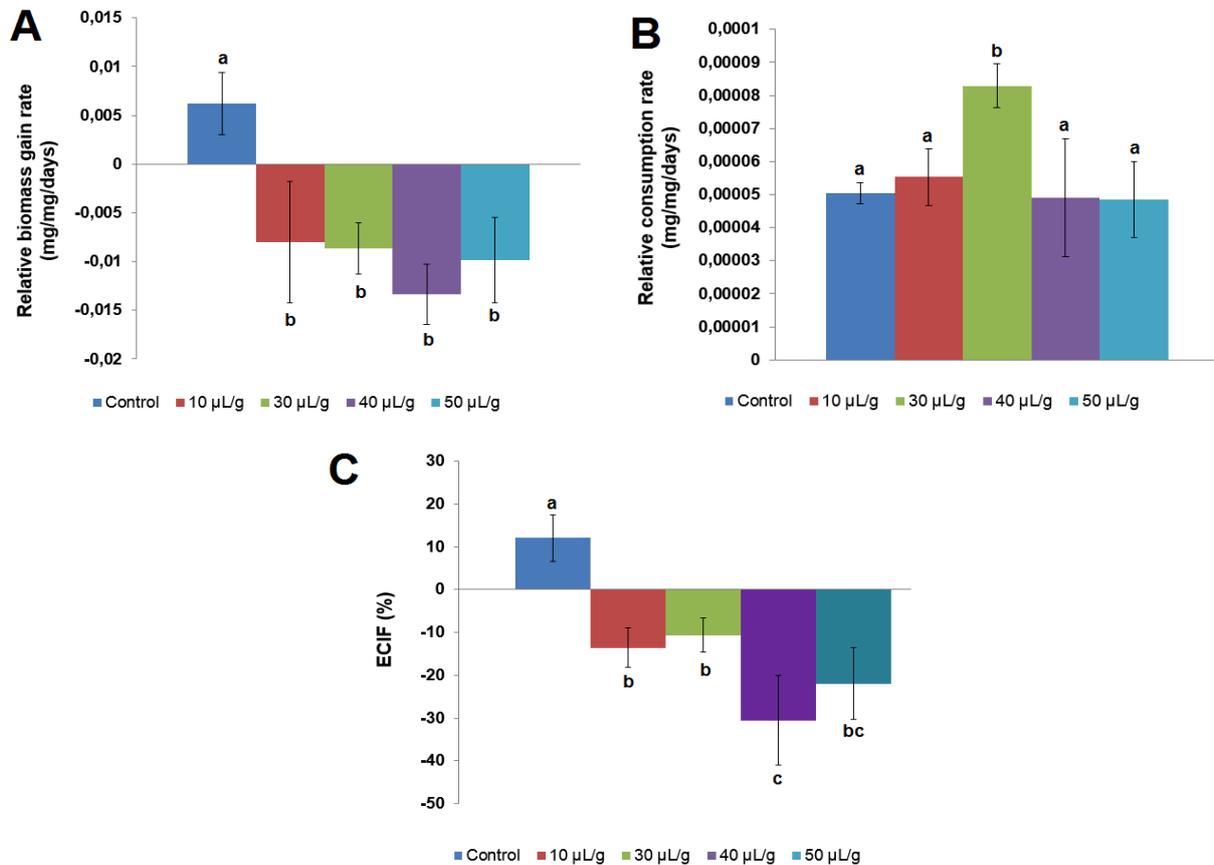


Figura 2: Parâmetros nutricionais de adultos de *S. zeamais* criadas em dietas artificiais. (A) O ganho de biomassa em relação taxa indica a quantidade de biomassa obtida em todos os dias por $\mu\text{L/g}$ de corpo inicial peso. (B) A taxa de consumo relativo indica a quantidade de alimentos consumido em $\mu\text{L/g}$ por mg de peso corporal por dia de insetos. (C) A eficiência de conversão do alimento ingerido (%) indica a quantidade de alimentos ingeridos pelos insetos incorporada como biomassa. Letras diferentes indicam ($P < 0,05$) diferenças significativas entre os tratamentos.



Anexos

ANEXO 1: Autorização para atividades com finalidade científica, emitida pelo ministério do meio ambiente – MMA- instituto chico mendes de conservação da biodiversidade – ICMBIO (sistema de autorização e informação em biodiversidade – SISBIO).



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBIO
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 26743-1	Data da Emissão: 28/01/2011 12:34
Dados do titular	
Nome: ALEXANDRE GOMES DA SILVA	CPF: 038.585.604-05
Título do Projeto: Atividade Antimicrobiana da Flora do Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco, Brasil	
Nome da Instituição : EMPRESA PERNAMBUCANA DE PESQUISA AGROPECUARIA	CNPJ: 10.912.293/0001-37

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de material botânico	01/2011	12/2014

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA n° 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	BUIQUE	PE	PARQUE NACIONAL DO CATIMBAU	UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta de material botânico, fúngico ou microbiológico	Angiospermae (*Qtde: 5), Pteridophyta (*Qtde: 5), Magnoliophyta (*Qtde: 5), Bryophyta (*Qtde: 5)

* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa n°154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 44726333



Página 1/2



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 26743-1	Data da Emissão: 28/01/2011 12:34
Dados do titular	
Nome: ALEXANDRE GOMES DA SILVA	CPF: 038.585.604-05
Título do Projeto: Atividade Antimicrobiana da Flora do Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco, Brasil	
Nome da Instituição : EMPRESA PERNAMBUCANA DE PESQUISA AGROPECUARIA	CNPJ: 10.912.293/0001-37

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 44726333



Página 2/2

ANEXO 2 : Ficha De Identificação Botânica – FIB.

**HERBÁRIO IPA – DÁRDANO DE ANDRADE LIMA
FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA**

FIB N^o. 43/2014

N ^o	N ^o de Tombo	Família	Nome Científico
01	84893	<i>Leguminosae- Caes.</i>	<i>Hymenaea courbaril</i> L. var. <i>courbaril</i>

Obs.: Amostra coletada para trabalho de conclusão do curso.

Dr^a. Rita de Cássia Pereira

Curadora do Herbário IPA

Consulta: Paula Fernanda F. das Mercês – aluna do curso de Ciências Biológicas da UPE

Procedência: Material coletado em Pernambuco, Parque Nacional do Catimbau, às margens da pedra do cachorro, em área de Caatinga. Determinada em: Fevereiro de 2014.

Recebi em 16/10/2014 _____

Paula Fernanda Figueiredo das Mercês

Instituto Agrônomo de Pernambuco - IPA

Vinculado à Secretaria de Agricultura e Reforma Agrária
Av. Gal. San Martin, 1371 – Bongi – 50761-000 – Recife – PE – C.P. 1022
CNPJ 10.912.293/0001-37 – PABX: (81) 3184-7200 – Fax: (81) 3184-7211
Home Page: www.ipa.br / E-mail: ipa@ipa.br

IPA – 77 anos semeando conhecimento

ANEXO 3: Resultados da Análise do Solo

EMPRESA PERNAMBUCANA DE PESQUISA AGROPECUARIA - IPA Vinculada a Secretaria de Produção Rural e Reforma Agrária											Boletim 622/2015P		Remetente:	
DEPARTAMENTO DE LABORATORIOS LABORATORIO DE FERTILIDADE DO SOLO											Remessa 291 A/B		DR. ANTONIO FELIX DA COSTA	
											Amostra(s) 914/7		VALE DO CATIMBAU	
											Entrada 01/06/2015		BUIQUE-PE	
											Saída 16/06/2015			
RESULTADOS DE ANÁLISE											CALAGEM		cmolc/dm ³	
CLASSIFICACAO	AMOSTRA	P ⁺	pH	cmolc/dm ³						t/ha	S	CTC	V	
LAB.	mg/dm ³	(H ₂ O)	Ca	Mg	Na	K	Al	H						
01	4-91A	10	4.70	0.75	0.65	0.03	0.06	0.25	3.95	-	1.5	5.7	26	
02	5-	1	5.20	1.85	0.85	0.04	0.09	0.10	4.02	-	2.8	6.9	41	
03	6-	11	4.60	1.20	0.80	0.04	0.06	0.40	5.20	-	2.1	7.7	27	
04	7-	11	4.70	0.65	0.60	0.03	0.06	0.45	4.25	-	1.3	6.0	22	
OBS.														
Assistente Pesquisa		Visto		M ^{sc} Fernando Ferrero Silva Eng ^o Agrônomo										
B27M & F2AC											Av. Gal. San Martín, 1371 - Bonfá (CEP 50.761-000) - RECIFE-PE - C.P. 1022 - CXC 10.912.293/001-37 - Home Page: http://www.ipa.br			

