



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CIBELE MARIA ALVES DA SILVA BESSA

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS DE FOLHAS DE *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb)
Altschul (FABACEAE:MIMOSOIDEAE)

Recife
2017

CIBELE MARIA ALVES DA SILVA BESSA

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE
FOLHAS DE *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb) Altschul (FABACEAE:MIMOSOIDEAE)

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Pernambuco, como
requisito parcial para obtenção do título de Doutor
em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Luiza Vilela Oliva
Coorientador: Prof^a. Dr^a. Maria Tereza dos Santos Correia

Recife

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Elaborado por Elaine C. Barroso CRB4/1728

Bessa, Cibele Maria Alves da Silva

Isolamento, caracterização e aplicação de metabólitos secundários de folhas de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb) Altschul (Fabaceae: Mimosoideae)/ Cibele Maria Alves da Silva Bessa- 2017.

163 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Maria Luiza Vilela Oliva

Coorientadora: Maria Tereza dos Santos Correia

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2017.

Inclui referências, apêndice e anexos

1. Fitoquímicos 2. Metabólitos 3. Angico-de-carço I. Oliva, Maria Luiza Vilela (orient.) II. Correia, Maria Tereza dos Santos (coorient.) III. Título

572.2

CDD (22.ED.)

UFPE/CB-2018-234

Elaborado por Elaine C. Barroso CRB4/1728

CIBELE MARIA ALVES DA SILVA BESSA

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE
FOLHAS DE *Anadenathera colubrina* var. *cebil* (Griseb) Altschul (FABACEAE:MIMOSOIDEAE)

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Pernambuco, como
requisito parcial para obtenção do título de Doutor
em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 31 / 07 / 2017

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Luiza Vilela Oliva
Departamento de Bioquímica – UNIFESP

Profa. Dr^a. Maria Tereza dos Santos Correia
Departamento de Bioquímica – UFPE

Dr^a Priscilla Barbosa Sales de Albuquerque
Centro de Tecnologia Estratégicas do Nordeste

Dr^a. Ana Paula Sant 'Anna da Silva
Departamento de Bioquímica – UFPE

Dr^a. Carolina Barbosa Malafaia
Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por sempre iluminar meu caminho, dando forças para que conseguisse concluir mais uma etapa na minha vida;

Aos meus pais, José Nivaldo e Isabel Alves por acreditarem em mim e serem os maiores incentivadores de meus sonhos. Obrigada pelo amor, dedicação e educação proporcionado durante toda minha vida, ensinando os valores e princípios éticos, resultando em quem sou. Amo muito vocês;

Ao meu marido Rafael Bessa que sempre esteve comigo em todos os momentos me dando força, amor e incentivo para que eu nunca desistisse dos meus objetivos, a você meu amor, obrigada por fazer parte da minha vida;

A meus irmãos Isabela Alves e José Nivaldo Filho por todo carinho, apoio, incentivo, amizade e confiança que sempre demonstraram em mim, sou feliz por ter vocês como irmãos;

A minha família que esteve presente ao longo de toda minha vida acadêmica, dando apoio e amor;

A minha professora orientadora Dr^a. Maria Luiza Vilela Oliva, pela oportunidade ao aceitar-me como sua orientanda, por toda compreensão, apoio e disposição em todas as etapas deste trabalho;

A minha professora co-orientadora Dr^a. Maria Tereza dos Santos Correia pela contribuição em minha formação acadêmica, por todo conhecimento, experiência, atenção, compreensão e amizade transmitida ao longo desses anos, meu muito obrigada;

A professora Dr^a. Márcia Vanusa da Silva pelo apoio, conselhos e sugestões estruturais do meu projeto.

Ao professor Dr. Thiago Napoleão por sua orientação, paciência e ajuda na realização dos experimentos;

Ao professor Dr. Nicácio Henrique por disponibilizar seu laboratório para a realização de grande parte do trabalho, obrigada pelo incentivo, ensinamento e amizade construída;

A todos que compõem o laboratório de Produtos Naturais, por toda ajuda e incentivo durante essa caminhada, por fazerem parte do meu dia a dia compartilhando os conhecimentos, dificuldades e momentos de descontração;

Ao técnico Sr. João Antônio, por está sempre disposto a orientar e ajudar no que fosse preciso ensinando muito além das práticas de um laboratório, e por sua amizade;

A Dr^a. Mônica Martins, pelo exemplo de pessoa, sempre ensinando e ajudando no que fosse preciso, contribuindo em grande parte no andamento deste trabalho;

A minha companheira de experimentos Paula Fernanda que alegrava meus dias com suas brincadeiras, dando todo apoio, incentivo, ajuda e carinho, sou feliz em tê-la como minha amiga;

A amiga Ana Paula Sant'Anna, pelo seu apoio incondicional, por todos esses anos de amizade, pela parceria, ajuda e conhecimentos compartilhados;

A Tiago Fonseca pela amizade que construímos durante esse período e por sempre está disposto a me ajudar e apoiar;

A professora Juciara Tenório pela nossa amizade, pelas ajudas e por todo apoio;

Aos meus amigos do Laboratório de Biologia Molecular que fizeram parte dessa caminhada dando o maior apoio e incentivo;

A Daniel Cavalcanti por sua amizade ao longo desses últimos seis anos, por todo seu incentivo e ajuda ao longo de todo esse trabalho principalmente na etapa final dele, muito obrigada;

A amiga Bárbara Ramos por sua amizade, conversas, caronas no Rio Doce cdu, além das suas ajudas e contribuições no desenvolver desse trabalho;

A Raiana Apolinário e Mychely Luna, pela amizade, apoio e por nossas conversas maravilhosas nos corredores da bio química que sempre alegravam nossos dias;

A amiga Priscilla Sales por toda sua ajuda e apoio sempre que precisava;

A Clóvis Macedo pela sua amizade e carinho e por sempre está disposto em me ajudar;

A amiga Carolina Malafaia, pela ajuda e auxílio no decorrer de todo trabalho, agradeço de todo meu coração;

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

A todos os funcionários, professores e amigos do Departamento de Bioquímica que ajudaram de certa forma no desenvolver desta tese;

A Universidade Federal de Pernambuco e a FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) pelo suporte financeiro.

Por fim a todos aqueles que de uma forma direta ou indiretamente contribuíram para que esse momento se tornasse realidade.

A todos muito obrigada!

“Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar.”

(Anatole France)

RESUMO

Como uma alternativa pouco agressiva ao meio ambiente e aos seres vivos, a exploração da atividade de compostos secundários de plantas tem se tornado uma alternativa com potencial ecológico para o controle de fitopatógenos e pragas. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi investigar compostos bioativos existentes nas plantas da Caatinga com potencial contra microorganismos fitopatógenos e insetos-pragas de importância agrícola. Foi realizado um screening da atividade antifitopatogênica de extratos aquosos de 12 espécies de plantas existentes no semiárido de Pernambuco. Para tal, foi empregada a técnica de microdiluição e as concentrações inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) foram determinadas. Todas as bactérias foram sensíveis aos extratos aquosos, com os valores de CIM variando 3,12 a 25 mg/mL, porém a *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* apresentou melhores valores para todos os isolados testado sendo potencialmente promissora para o emprego no combate a doenças vegetais. A partir deste *screening* inicial foram preparados extratos orgânicos de folhas de *A. colubrina* coletadas na estação seca e chuvosa em Soxhlet seguindo a série eluotrópica ciclohexano (CHX), clorofórmio (CF), acetato de etila (EA) e metanol (MET). Foram realizadas análises da composição fitoquímica dos extratos por cromatografia em camada delgada e também foram avaliados sua atividade antimicrobiana. A composição fitoquímica mostrou a presença de terpenos, flavonoides, triterpenos, taninos, cumarinas e açúcares redutores. Todos os extratos orgânicos foram ativos contra todas as bactérias e fungos avaliados sendo os extratos em CHX e EA os mais ativos com CIM variando entre 0,78 a 3,12mg/mL. O composto majoritário presente no extrato de EA da estação chuvosa foi isolado e apresentou CBM 0,5 mg/mL para *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* (Xcc) e CIM 0,5 mg/mL para *Acidovorax citrulli*, com maior atividade. Além disso, Xcc tratada com o extrato de CHX da estação seca foi observada por microscopia eletrônica de varredura e de transmissão e houve perda de viabilidade celular e morte por formação de vacúolos intracelulares. A atividade inseticida foi testada com os extratos CHX e EA, contra o *Sitophilus zeamais* e o *Tetranychus urticae* e os extratos se mostraram tóxicos para ambos os insetos. Diante disso, podemos concluir que a *A. colubrina* possui metabólitos secundários com fortes potenciais antimicrobianos e inseticidas.

Palavras-chaves: Caatinga. Angico. Potencial biológico.

ABSTRACT

As a less aggressive alternative to the environment and to living beings, in the last decades, the exploration of secondary plant compound activity has become an alternative for the control of phytopathogens and pests with ecological potential. Therefore, the aim of this work was to investigate bioactive compounds existing in plants of the caatinga against phytopathogenic microorganisms and insect pests of agricultural importance. A screening of the phytopathogenic antimicrobial activity of the aqueous extracts of twelve species of plants in the semi arid region of Pernambuco was carried out. The activity was done through the microdilution technique and the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (CMM) was determined. All bacterial species were sensitive to aqueous extracts, with MIC values ranging from 3.12 to 25 mg / mL, but *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* showed better values for all isolates tested, therefore potentially promising for use in combating plant diseases. From this initial screening, organic extracts of the leaves of *A. colubrina* were carried out in Soxhlet apparatus following an elutropic series using the solvents: cyclohexane (CHX), chloroform (CF), ethyl acetate (EA) and methanol (MET). Analysis of the phytochemical composition of the extracts were carried out by thin layer chromatography and their antimicrobial activity was also evaluated. The screening of the phytochemical composition showed the presence of terpenes, flavonoids, triterpenes, tannins, coumarins and reducing sugars. All organic extracts were active against all bacteria and fungi evaluated and the extract in CHX and EA were the most promising with MIC ranging from 0.78 to 3.12 mg / mL. The main compound present in the EA extract from the rainy season was isolated and presented MBC 0.5 mg / mL for Xcc and MIC 0.5 mg / mL for Ac, obtaining a higher antimicrobial activity. In addition, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* treated with extracts of CHX from the dry season was observed by scanning and transmission electron microscopy, with a loss of cell viability and death by formation of intracellular vacuoles. The insecticidal activity was carried out with extracts CHX and EA, against *Sitophilus zeamais* and *Tetranychus urticae*, and the extracts showed to be toxic for both insects. According to these results, we can conclude that *A. colubrina* has secondary metabolites with strong antimicrobial potentials and insecticides.

Key-words: Caatinga. Angico. Biological potential.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Sitophilus zeamais</i> (A) inseto adulto. Diferenciação física entre (B) fêmea, rosto longo e afilado; (C) macho, cabeça projetada à frente em forma de rosto curto e grosso.	27
Figura 2 - Danos em grãos de milho causados por <i>Sitophilus zeamais</i>	29
Figura 3 - <i>Tetranychus urticae</i> (A) inseto adulto e ovo (seta). Diferenciação física entre (B) fêmea, corpo oval maior que o dos machos e (C) macho corpo menor e mais estreito.....	30
Figura 4 - Ciclo de vida do <i>Tetranychus urticae</i>	31
Figura 5 - Vendas de Defensivos Agrícolas no Brasil (2011- 2015).....	33
Figura 6 - Distribuição do semiárido Brasileiro.	37
Figura 7 - Localização do Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco.	39
Figura 8 - Ilustrações do relevo do Parque Nacional do Catimbau. (A) e (B) Pedra do cachorro; (C) Morro do elefante; (D) Igrejinha; (E) Formações rochosas; (F) Paredão de arenito.	40
Figura 9 - Nomes aceitos de espécies por domínio fitogeográfico no Brasil.....	41
Figura 10 - Ocorrência natural de (A) <i>Anadenanthera colubrina</i> e suas variedades (B) cebil e (C) colubrina no Brasil.	44
Figura 11 - <i>A. colubrina</i> ; (A) Porte da planta; (B) Detalhe do Tronco; (C) Folhas; (D) Flores; (E) Fruto e Sementes.	46
Figura 12 - Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.....	52
Figura 13 - Resumo da biossíntese dos terpenoides.....	57
Figura 14 - Exemplo dos tipos de alcaloides; (A) Estrutura química de um alcaloide (Teobromina); (B) Alcaloide verdadeiro (Nicotina); (C) Protoalcaloide (Colchicina) e (D) Pseudoalcaloide (coniina).	58
Figura 15 - Principais grupos de compostos fenólicos e suas variedades.	62

Figura 16 - Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos (A) e hidroxicinâmicos (B).....	63
Figura 17 - Estrutura dos ácidos Benzóicos (A); Cinâmicos(B) e seus derivados.....	64
Figura 18 - Estrutura geral dos flavonoides.....	65
Figura 19 - Estrutura dos principais tipos de flavonoides.	65

LISTRA DE FIGURAS ARTIGO 2

Figure 1 - HPLC-UV chromatograms of ethyl acetate extracts from the rainy season of <i>A. colubrina</i> leaves. Detection at 256 nm. UV spectra analysis of the main peaks. Peak 9: is associated to p-hydroxybenzoic compound; peaks 18 e 21: quercetin derivatives; peaks 34: is associated to quercetin (UV 190- 400nm).....	101
Figure 2 - HPLC chromatogram and UV spectra of the phenolic compound associated with the p-hydroxybenzoic compound released from <i>Anadenanthera colubrina</i>	104
Figure 3 - Effect of Cyclohexane extract on <i>Xanthomonas campestris pv campestris</i> cells. observed by transmission electron microscopy. A: untreated cells, normal cytoplasm, intact plasma membrane; B: Treated Cells, formation of vacuums in the cytoplasm.....	105
Figure 4 - <i>Effect of cyclohexane extract on Xanthomonas campestris pv campestris cells. observed by scanning electron microscopy. A: untreated cells; cells in normal rod format, normal cell division B: treated cells, space between cells.</i>	105

LISTRA DE FIGURAS ARTÍGO 3

Figura 1 - Taxa de Mortalidade (%) de <i>Sitophilus zeamais</i> sob o efeito do: (A) Extrato em acetato de etila estação chuvosa (EAr); (B) Extrato em acetato de etila estação seca (EAd); (C) Extrato em ciclohexano estação chuvosa (CHXr); (D) Extrato em ciclohexano estação seca (EAd); (C) Extrato em ciclohexano estação chuvosa (CHXr); (D) Extrato em ciclohexano estação seca (CHXd).	123
---	-----

Figura 2 - Parâmetros nutricionais de adultos de *S. zeamais* mantidos em dietas artificiais. (A) Taxa de ganho relativo de biomassa de EAd; (C) Taxa de consumo relativo de EAd; (C) Taxa de ganho relativo de biomassa de EAr; (D) Taxa de consumo relativo de EAr. Letras diferentes indicam ($P < 0,05$) diferenças significativas entre os tratamentos. 124

Figura 3 - Parâmetros nutricionais de adultos de *S. zeamais* mantidos em dietas artificiais. (A) Taxa de ganho relativo de biomassa de CHXd; (C) Taxa de consumo relativo de CHXd; (C) Taxa de ganho relativo de biomassa de CHXr; (D) Taxa de consumo relativo de CHXr. Letras diferentes indicam ($P < 0,05$) diferenças significativas entre os tratamentos. 125

Figura 4 - Mortalidade e oviposição de *T. urticae* em discos de folhas pulverizados com diferentes concentrações de: (A) Extrato ciclohexano estação seca de *A. colubrina*; (B) Extrato Acetato de Etila estação chuvosa de *Anadenanthera colubrina*; (C) Controle com Azamax. 128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sintomas causados por Fungos e Bactérias Fitopatógenos.....	25
Tabela 2 - Classificação dos terpenos com base no número de subunidades isoprenoides.....	54
Tabela 3 - Principais classes de alcaloides sintetizados pelas plantas.....	59
Tabela 4 - Classe de compostos fenólicos em plantas.....	61
Tabela 5 - Principais subclasses e características dos flavonoides.....	66

TABELAS ARTÍGO 1

Table 1 - Plants employed in this study and their ethnobotanical information	73
Table 2 - Minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of aqueous extracts of medicinal plants of Caatinga against the growth of plant pathogenic bacteria.....	75

TABELAS ARTÍGO 2

Table 1 - Chromatographic and revealing systems used for the phytochemical screening of the leaves extracts of <i>Anadenanthera colubrina</i>	97
Table 2 - Yield organic extracts of <i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i> harvest at dry and rain season.....	98
Table 3 - Phytochemical screening of <i>A. colubrina</i> var. <i>cebil</i> extracts harvest at Catimbau National Park at dry and rainy season.....	98
Table 4 - Antibacterial activity, Minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of organics extracts from <i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i> harvest at dry and rain season against selected plant pathogenic bacterial.....	99
Table 5 - Antifungal activity, Minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of organics extracts from <i>Anadenanthera colubrina</i>	

var. cebil harvest at dry and rainy season against selected plant pathogenic fungal..... 100

Table 6 - Antibacterial activity, Minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of Flash Chromatography fractions of EAr extract against selected plant pathogenic bacterial..... 102

Table 7 - Antibacterial activity, Minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of preparative fractions against selected plant pathogenic bacterial..... 103

TABELAS ARTÍGO 3

Tabela 1 - Toxicidade por contato residual (CL50 em mg/mL) dos extratos CHXd e EAr das folhas de *Anadenanthera colubrina* sobre *T. urticae*126

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
2.1	AGRICULTURA: EVOLUÇÃO E PROBLEMÁTICA	19
2.1.1	Fitopatógenos	22
2.1.2	Inseto-praga.....	25
2.2	USO DE METABÓLITOS DE PLANTAS COMO DEFENSIVOS NATURAIS	32
2.3	A CAATINGA E SUAS CARACTERÍSTICAS	35
2.4	FABACEAE: ASPECTOS TAXONÔMICOS E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA.....	40
2.4.1	Subfamília Mimosoideae.....	42
2.4.1.1	Anadenanthera colubrina.....	43
2.5	METABÓLITOS DE PLANTAS	46
2.5.1	Fatores que influenciam a produção de metabólitos secundários	49
2.5.2	Metabólitos Secundários de Vegetais.....	51
2.5.2.1	Terpenos	53
2.5.2.2	Alcaloides	57
2.5.2.3	Compostos Fenólicos	60
2.5.2.3.1	Ácidos Fenólicos.....	62
2.5.2.3.2	Flavonoides.....	64
3	OBJETIVOS	68
3.1	GERAL.....	68
3.2	ESPECÍFICOS	68
4	RESULTADOS	70
4.1	ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SEVERAL BRAZILIAN MEDICINAL PLANTS AGAINST PHYTOPATHOGENIC BACTERIA.....	70
4.2	ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF ANADENANTHERA COLUBRINA VAR. CEBIL EXTRACTS AGAINST PHYTOPATHOGENIC BACTERIA AND FUNGI	77

4.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INSETICIDA DE EXTRATOS DE FOLHAS DE ANADENANTHERA COLUBRINA VAR. CEBIL (GRISEB) ALTSCHUL CONTRA TETRANYCHUS URTICAE KOCH E SITOPHILUS ZEAMAE MOTS.....	106
5 CONCLUSÃO	129
REFERÊNCIAS	130
APÊNDICE	148
APÊNDICE A - ARTIGO PUBLICADO EM JUNHO DE 2016.	148
APÊNDICE B - CAPÍTULO DE LIVRO PUBLICADO EM JULHO 2016.	156
ANEXOS.....	157
ANEXO A - FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA – FIB.	157
ANEXO B - 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).	158

1 INTRODUÇÃO

Durante aproximadamente dois milhões de anos, os seres humanos viveram da colheita e da caça, sendo totalmente dependentes de produtos fornecidos de maneira natural. Foi então por volta de 10.000 aC. período neolítico, que o homem deixou de depender dessas práticas e começou a cultivar plantas e criar animais, transformando, assim, os ecossistemas naturais originais em ecossistemas cultivados (MAZOYER; ROUDART, 2010). O surgimento da agricultura foi um marco histórico na evolução do homem que deixa de ser nômade e passa a ser sedentário, começam a surgir regras, chefias, com organização política e temporal marcada por períodos de plantio e colheitas (LUTZENBERGER, 1998; KRÜGER, 2001; MORAN, s/d apud GONÇALVES, 2006).

A partir da segunda guerra mundial a agricultura passa a depender cada vez menos dos recursos locais, e cada vez mais dos tratores, ceifeiras, arados, agrotóxicos e ração animal produzido pelas indústrias (OLIVEIRA, 1989). O homem passa a utilizar máquinas para o aumento da produção agrícola, suprimindo as necessidades da maioria da população, que cada vez mais aumentava sua densidade. Embora sejam importantes trouxeram diversas consequências, tais como a perda da biodiversidade, degradação dos solos, desmatamentos, erosão genética, contaminação da água e solos, contaminação do agricultor e dos alimentos, causando um desequilíbrio ambiental cada vez maior e favorecendo o aumento e surgimento de pragas e doenças em cultivos agrícolas (BETTIOL; GHINI, 2003).

A utilização de métodos químicos como os agrotóxicos no controle de doenças e as pragas agrícolas, feito muitas vezes de maneira não recomendada ao longo dos anos, nem sempre são eficazes ou economicamente viáveis (GHINI; KIMATI, 2000; LUCCHESI, 2005). Seu uso inadequado e excessivo é resultado de uma visão equivocada do processo agrícola, quanto maior o uso maior os riscos e danos aos seres humanos e ao meio ambiente (AUGUSTO et al., 2012). Além de causar diversos problemas ambientais, como a contaminação dos alimentos, solo, água e animais, geram resistência de patógenos, de pragas e de plantas invasoras a certos princípios ativos dos agrotóxicos; o surgimento de doenças iatrogênicas (as que ocorrem devido ao uso de agrotóxicos); o desequilíbrio biológico, alterando a ciclagem de nutrientes e da matéria orgânica; a eliminação de organismos benéficos e a redução da biodiversidade (BETTIOL; MORANDI, 2009).

A redução ou eliminação de produtos químicos no controle de pragas e doenças de plantas é uma necessidade econômica e ambiental. Na busca de um controle alternativo, eficaz e menos danoso, tem-se verificado o uso de extratos de plantas no combate a esses problemas. Estes possuem em sua composição substâncias com princípios ativos que tem por finalidade defender a planta contra insetos, patógenos e micro-organismos que causam danos a grandes produções agrícolas (RODRIGUES et al., 2006; JAMAL et al., 2008; PERREIRA, 2014). As principais vantagens relacionadas ao uso de extratos vegetais, quando comparados aos produtos sintéticos, devem-se ao fato de encontrar novos compostos, os quais os patógenos não se tornaram capazes de inativar, além de serem degradados rapidamente no ambiente, são menos tóxicos, derivados de recursos renováveis, possuem um amplo modo de ação e mantem a produtividade e a qualidade dos produtos agrícolas. (FERNANDES; CARNEIRO, 2006; FERRAZ, 2008).

O Brasil é o país responsável pela gestão do maior patrimônio de biodiversidade do mundo, contando com mais 46 mil espécies catalogadas da flora (MMA Flora do Brasil 2020), logo o conhecimento sobre essa dinâmica é de grande importância para a manutenção da biodiversidade. Nesse contexto, a Caatinga se destaca por apresentar grande importância ecológica devido a sua vegetação única (PRADO, 2003). Possui ampla variedade de espécies vegetais, adaptadas às condições de estresse ambiental característico das regiões semiáridas, o que a tornapromissoras para o estudo de novas biomoléculas que possam apresentem importantes atividades biológicas (ARCOVERDE et al., 2014; FÉLIX-SILVA et al., 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 e antifúngico dos extratos das folhas de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* obtidas no Parque Nacional da Serra do Catimbau, reserva da caatinga localizada no município de Buíque, Pernambuco. Embora esta espécie anteriormente tenha sido submetida a alguns estudos, sua grande utilização pela população, principalmente no Nordeste, justifica a importância de novos estudos com o propósito de se conhecer detalhadamente sua composição química, possibilitando seu uso no combate a microorganismos fitopatógenos e insetos de culturas com importância agrícola.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 AGRICULTURA: EVOLUÇÃO E PROBLEMÁTICA

Ao longo do Paleolítico, a espécie humana foi evoluindo, crescendo fisicamente e ampliando sua capacidade intelectual, desenvolvendo assim a linguagem oral. O homem paleolítico sobrevivia da caça, da pesca e da coleta de vegetais, deslocava-se em busca dos recursos alimentares disponíveis. Por volta de 10000 a.C., já no período Neolítico, o homem deixou de depender da caça e da coleta e passou a sobreviver da agricultura e da criação de animais. Essa prática levou à sedentarização da espécie e ao aparecimento das primeiras aldeias. Aos poucos, os instrumentos de pedra foram substituídos por instrumentos de cobre, de bronze e, mais tarde, de ferro. Esse progresso técnico permitiu aumentar a produção agrícola e possibilitou o crescimento populacional. Dessa forma, a agricultura começou a mudar não apenas os hábitos alimentares como também a civilização (MAZOYER; ROUDART, 2010; AGUIAR, 2017).

Durante os 8500 a.C. que se seguiram a agricultura evoluía e os humanos habitantes do Crescente Fértil (uma região que compreende os atuais Egito, Israel, Turquia e Iraque) lentamente começaram a plantar grãos em vez de colhê-los da natureza. De 800 a 1400 d.C. as ferramentas agrícolas permaneceram inalteradas. Os primeiros colonizadores da América do Norte usavam arados iguais aos usados durante o império Romano. O desenho do arado foi modificando e a primeira semeadeira mecânica foi inventada pelo inglês Jethro Tull; esse instrumento permitia a plantação de sementes de forma mais rápida, organizada e em linha reta. Uma colheitadeira puxada por cavalos veio logo em seguida facilitando ainda mais o trabalho dos agricultores que passaram a plantar e colher em uma fração de tempo reduzida, fazendo com que a produtividade agrícola aumentasse (MAZOYER; ROUDART, 2010). Foi então durante os séculos XVIII e XIX, com o advento da agricultura moderna, que a produção em maior escala teve início, caracterizando a Primeira Revolução Agrícola Contemporânea, período marcado por intensas mudanças ao nível econômico, social e tecnológico. Estas mudanças desempenharam um papel central no processo de decomposição do feudalismo e no surgimento do capitalismo (VEIGA, 1991).

A Primeira Revolução Agrícola teve como característica a introdução do sistema de rotação com leguminosas e/ou tubérculos e o abandono gradativo do pousio. Estas plantas eram utilizadas tanto na alimentação humana e animal, quanto na adubação do solo (OLIVEIRA, 1989). Desta forma foi possível intensificar o uso da terra e obter significativos aumentos na produção agrícola, “eliminando” a escassez de alimentos que caracterizaram os períodos anteriores (EHLERS, 1996).

Ainda no final do século XIX e início do século XX, aconteceram grandes transformações na agricultura, principalmente nos EUA e na Europa, com as inúmeras descobertas científicas e a evolução das ciências associadas ao grande desenvolvimento tecnológico (fertilizantes químicos, melhoramento genético de plantas e motores de combustão interna), que acabaram por impor um novo padrão de desenvolvimento para a agricultura. Este período foi marcado por grandes mudanças, como por exemplo, a redução da importância relativa da rotação de culturas, o progressivo abandono do uso da adubação verde e do esterco na fertilização, a separação da produção animal da vegetal e a absorção de algumas etapas do processo de produção agrícola pelas indústrias. Essas mudanças marcaram o início de uma nova fase na história da agricultura, a chamada Segunda Revolução Agrícola Contemporânea (EHLERS, 1996).

A partir da Segunda Guerra Mundial, a agricultura passou a depender cada vez menos dos recursos locais, e cada vez mais dos tratores, ceifeiras, arados, agrotóxicos e ração animal produzida pela indústria. Produtos provenientes da agricultura passam a ser transformados pela indústria (OLIVEIRA, 1989). A agricultura mundial passou por uma série de transformações aliadas às conquistas da pesquisa nas áreas da genética, da mecânica e da química, bem como a evolução do setor industrial voltado para a agricultura. Todas essas transformações culminaram no final da década de 60, início da década de 70, em um novo processo de modernização profunda da agricultura mundial, conhecida como Revolução Verde que seguiu com as transformações mais recentes, a partir do início dos anos 90, marcada pela globalização econômica e pela constituição de grandes empresas, agroindústrias e varejistas, que controlam o mercado mundial. Ela é baseada em um conjunto de tecnologias voltadas ao aumento da produtividade das culturas e especialização da produção (variedades geneticamente melhoradas, uso intensivo

de adubos químicos de alta solubilidade, agrotóxicos, irrigação e máquinas agrícolas) (TILMAN, 2001; AMBROSANO et al., 2002).

Equipamentos artesanais foram substituídos por máquinas modernas possibilitando o rápido crescimento das culturas e a diminuição da mão de obra nas explorações agrícolas. O problema da fome servia como uma justificativa para o aumento da produção, porém os resultados dessa revolução foram sentidos no Brasil e no mundo. Trazendo como consequência a perda da biodiversidade, degradação dos solos, desmatamentos, erosão genética, contaminação da água e solos, contaminação do agricultor e dos alimentos, aparecimento de novas pragas, surgimento de pragas resistentes, aumento de custos de produção e diminuição da eficiência energética, mostrando que a revolução verde é altamente controversa, não apenas entre o meio científico, mas para a sociedade (LUCCHESI, 2005).

O principal interesse da exploração agrícola baseava-se na produção de grandes quantidades a fim de obter o maior lucro possível, sem a preocupação de manter a qualidade dos produtos, diante disso surgiu a agricultura moderna. As máquinas passaram a substituir os homens no campo, o rendimento e a produtividade cresceram exponencialmente, mas a qualidade da produção, e do ambiente não foram tidas em conta, causando um desequilíbrio ambiental cada vez maior e favorecendo o aumento e surgimento de pragas e doenças em cultivos agrícolas (BETTIOL; GHINI, 2003).

O uso de agrotóxico no combate das pragas foi aumentando e em conjunto com os fertilizantes e as máquinas, houve um aumento na produtividade, porém, diversos efeitos negativos foram surgindo (LUCCHESI, 2005). No Brasil, na década de 70, Paschoal (1979) mostrou um dos resultados do desequilíbrio ecológico causado pelo crescimento do consumo de agrotóxico: o aumento significativo do número de pragas.

A presença de pragas no campo pode se tornar um dos fatores que pode diminuir drasticamente os valores finais da produção de uma dada cultura. Essas pragas podem ser vírus, bactérias, fungos, insetos, vegetais e pequenos vermes, que muitas vezes se alastram pelas lavouras causando prejuízos de bilhões de reais. As pragas são responsáveis, em média, por cerca de 42,1% das perdas na produção agrícola, onde estima-se que os fitopatógenos sejam responsáveis por 13,3% de

danos, as plantas daninhas por 13,2%; e os insetos e ácaros por 15,6% (KREYCI, 2017). As perdas do agronegócio brasileiro podem chegar a R\$ 55 bilhões ao ano e estima-se que, no mundo, as perdas da agricultura devido aos ataques de pragas cheguem a quase 5% do PIB mundial (AGROLINK, 2017). Segundo Batista et al. (2011), é importante realizar periodicamente levantamentos dos fitopatógenos causadores de doenças de plantas em áreas de plantios, como os reflorestamentos, áreas agrícolas, pastos, florestas naturais, campos naturais e sistemas agroflorestais, antes que estes se tornem endêmicos e possam causar danos expressivos às plantas.

2.1.1 Fitopatógenos

Os micro-organismos quando atacam as plantas causam nelas doenças, e uma vez doente essas plantas são acometidas por doenças que ocasionam mudanças na sua estrutura ou processos fisiológicos provocados pelos diversos fatores, tanto agentes patogênicos, como, condições desfavoráveis do ambiente em que vivem. Fitopatógenos, eles podem provocar perdas nas fases de pré e pós-colheita, prejudicar a aparência das plantas, alterar suas características físicas e químicas, diminuir o conteúdo nutricional e o aproveitamento dos alimentos (JUNQUEIRA et al., 2006; HORST, 2008). Eles podem ser encontrados associados a diversas partes das plantas, tais como raiz, caule, folhas, botões florais, flores, frutos e sementes (AGRIOS, 2005). Com relação às bactérias e fungos, sua importância como patógenos de plantas se deve não só à gravidade das doenças que causam nas culturas de valor econômico, mas também à facilidade com que podem se espalhar (FLETCHER et al., 2006).

Quase toda a disseminação de patógenos responsáveis por surtos de doenças em plantações de grande e pequeno porte é realizada passivamente por agentes como ar, insetos, água, outros animais, sementes contaminadas e até mesmo pelos seres humanos (AGRIOS, 2005). Os micro-organismos causadores de doenças de plantas geralmente interagem com o hospedeiro, invadem seus tecidos, gerando o processo infeccioso, e ao colonizarem a planta, retiram desta todos os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento (BATISTA et al., 2007). Eles

podem utilizar diversas formas para infectar o hospedeiro, as quais incluem sítios lesionados e aberturas naturais das plantas, tais como os estômatos e enzimas podem ser secretadas pelos patógenos para invadir os tecidos das plantas por meio da degradação de macromoléculas da parede celular (SLATER; SCOTT; FOWLER, 2003). Os fitopatógenos estão associados à indução do apodrecimento de frutas e verduras pré e pós-colheita, diminuindo o conteúdo nutricional e aproveitamento destes alimentos (RAY; RAVI, 2005). Estudos mostram uma perda média anual da produção agrícola brasileira de até 7,7%, o equivalente a 25 milhões de toneladas, devido a doenças que atacam as plantas (SUGAYAMA et al., 2015).

Fungos fitopatogenicos fazem parte da maioria dos relatos de doenças em plantas, são pequenos organismos, eucariotas, heterotróficos e geralmente filamentosos, que incluem os cogumelos, bolores e levedura (MANFIO, 2000). Cada fungo patogênico pode atacar um ou mais tipos de plantas. A maioria deles passa parte do seu ciclo de vida no solo ou nas plantas que infecta, enquanto outros vivem em pedaços de plantas em decomposição, alguns passam todo o seu ciclo de vida sobre o hospedeiro e somente seus esporos se depositam no solo, onde permanecem em dormência até que sejam levados a um hospedeiro no qual germinam e se reproduzem. Para o desenvolvimento dos fungos fitopatógenos eles dependem principalmente das condições climáticas favoráveis (ROCHA, 2013).

Esses microorganismos estão entre os maiores problemas na produção agrícola (FLETCHER et al., 2006). Por serem capazes de produzir grandes quantidades de esporos, infectam rapidamente os plantios e sua disseminação depende principalmente de fatores como, vento, água, insetos e outros animais. Os fungos patogênicos podem biossintetizar fitotoxinas e enzimas capazes de desestabilizar os mecanismos de defesa e afetar os tecidos das plantas, além de serem produtores de toxinas que perturbam o funcionamento normal. Também absorvem nutrientes de regiões economicamente importantes das plantas, como sementes e frutos, causando perdas no rendimento da cultura (STRANGE, 2003; STRANGE; SCOTT, 2005).

Outros micro-organismos também de importância agrícola são as bactérias importantes patógenos de plantas não somente pela alta incidência e severidade em culturas de valor econômico, mas também pela facilidade com que se disseminam (MICHEREFF, 2001). As bactérias formam um grupo diversificado de organismos

unicelulares, procariotas e que, em geral, se reproduzem por divisão binária. Já as bactérias miceliais reproduzem-se por esporulação ou segmentação do micélio e formação de conídios ou esporângios no ápice das hifas. A forma das bactérias fitopatógenas é de bastonete, embora possam apresentar também outras formas. São geralmente móveis e dividem-se em duas grandes categorias, as Gram positivas e as Gram negativas, sendo a maioria das bactérias que causam doenças em plantas Gram negativas (ROCHA, 2013).

Elas penetram nas plantas através de aberturas naturais como estômatos, lenticelas, hidatódios, aberturas florais e também através de ferimentos. Uma vez no interior das plantas, elas podem se multiplicar nos espaços intercelulares ou no tecido vascular causando danos irreparáveis (AGRIOS, 2005). 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 à longa distância ocorre, principalmente, por meio do transporte de órgãos vegetais infectados, como sementes, tubérculos, estacas e frutos. À curta distância, a disseminação ocorre pela água de chuva, vento, insetos vetores, irrigação e pelo homem, através dos tratos culturais (MICHEREFF, 2001).

Com a expansão do cultivo de grandes áreas e da agricultura, os problemas causados por fitopatógenos têm aumentado concomitantemente. Inúmeros patógenos têm causado prejuízos à agricultura, elevando os custos com produtos químicos para a prevenção e controle das doenças e diminuindo a produção (FINATTI; APARECIDO, 2009). Na Tabela 1 podemos observar alguns exemplos de fitopatógenos, utilizados nesse trabalho que causam grandes perdas nas culturas de importância agrícola.

Tabela 1- Sintomas causados por Fungos e Bactérias Fitopatógenos

Fungos e Bactérias Fitopatógenos	Doenças/Sintomas	Referências
<i>Fusarium oxysporum</i>	Tombamento em plântulas e podridão de espigas de milho;	(MICHEREFF, 2001)
<i>Fusarium moniliforme</i>	Murcha em diversas plantas;	
<i>Fusarium solani</i>	Podridões de raízes em diversas culturas	
<i>Verticillium lecanii</i>	Murcha e deteriorização em plantas	(MICHEREFF, 2001)
<i>Rhizopus stolonifer</i>	Podridão de frutos e sementes	(MICHEREFF, 2001)
<i>Aspergillus flavus</i>	Deterioração das sementes	(AGROFIT, 2011)
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	Podridão- Mole	(PÉROMBELON; KELMAN, 1980).
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Murchas vasculares com sintomas externos e internos	(MICHEREFF, 2001)
<i>Acidovorax citrulli</i>	Mancha-aquosa-do-melão	(OLIVEIRA, 1995)
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestres</i>	Podridão negra	(MICHEREFF, 2001)
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i>	Folhas com pontos necróticos, manchas escuras e alongadas nas nervuras e pecíolos das folhas, nos ramos e ráquis dos frutos	(NAYUDU, 1972)
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>malvacearum</i>	Lesões nas folhas, rasgadura do limbo foliar e possui aspecto de podridão	(CIA; SALGADO, 2005).

2.1.2 Inseto-praga

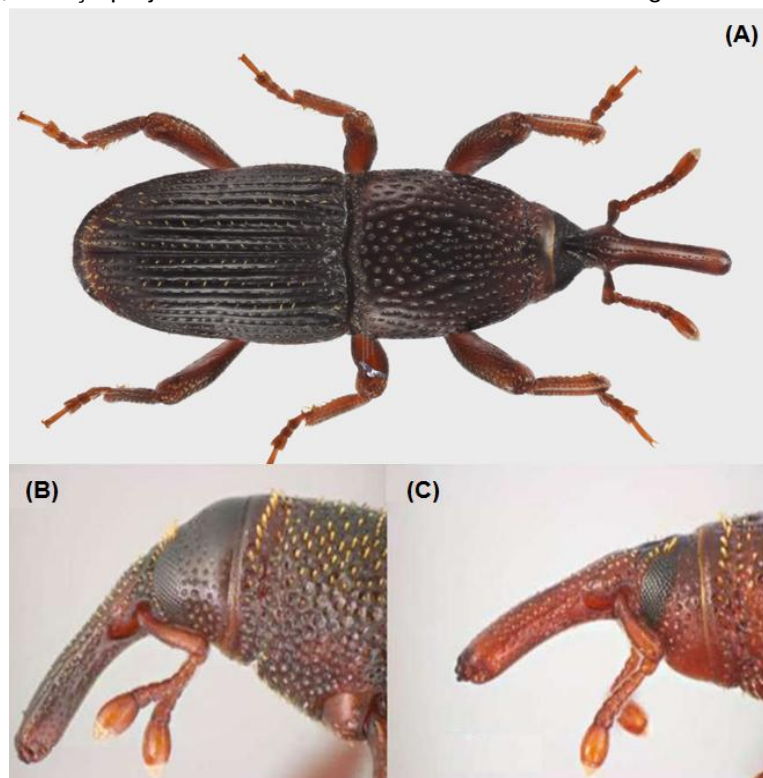
Os insetos por sua vez também podem ser considerados praga agrícola quando atingem um determinado índice de dano econômico para a cultura plantada. Os danos causados por esses insetos-pragas variam e podem ser observados em todos os órgãos vegetais. Dependendo da espécie, do tamanho populacional da praga, da

fase de desenvolvimento, estrutura vegetal atacada e da duração do ataque, pode haver maior ou menor prejuízo, em quantidade e em qualidade da cultura (ROSSETTO; SANTIAGO, 2017).

Insetos são, portanto, capazes de causar danos diretos, quando atacam o produto a ser comercializados, ou indiretos, quando atacam estruturas vegetais que não serão comercializados (folhas e raízes, por exemplo), mas que alteram os processos fisiológicos, provocando reflexos negativos na produção. Além disso, podem atuar indiretamente transmitindo fitopatógenos (vírus, bactérias e fungos) ou substâncias toxicogênicas durante o processo alimentar (GALLO et al., 2002; GULLAN; CRANSTON, 2007). Cerca de um milhão de espécies de insetos são descritas, das quais cerca de 10% são caracterizadas como pragas (GALLO et al., 2002).

Dentre os insetos-pragas de culturas de importância agrícola, podemos citar o *Sitophilus zeamais*, conhecido como gorgulho do milho, pertencente à ordem Coleoptera e família Curculionidae. São insetos cosmopolitas ao longo das regiões tropicais que infestam grãos de milho além de serem capazes de se alimentar de outros produtos como, pêssego, maçã, uva, marmelo e ameixa e de produtos processados como macarrão e biscoitos (BOTTON 2005, FAZOLIN et al. 2010). *S. zeamais* adultos são pequenos besouros com comprimento variando de 2,5 a 4 mm, possuem manchas avermelhadas nos élitros e cabeça projetada para frente na forma de rostro, o qual é mais curto e grosso nos machos e mais longo e afilado nas fêmeas (Figura 1) (ANTUNES; DIONELLO, 2010).

Figura 1 - *Sitophilus zeamais* (A) inseto adulto. Diferenciação física entre (B) fêmea, rosto longo e afilado; (C) macho, cabeça projetada à frente em forma de rosto curto e grosso



Fonte: McCaffrey, Sarah (2011).

Os ovos são depositados nos grãos através de um orifício feito pela mandíbula das fêmeas, que em seguida selam as perfurações com uma secreção produzida por glândulas associadas ao sistema ovipositor. As fêmeas podem viver em média até 140 dias, 104 destes correspondendo ao período de oviposição com um número médio de ovos por fêmea de 282; já os machos possuem uma longevidade de em média 142 dias (BOTTON et al., 2005). Após a eclosão dos ovos, as larvas se desenvolvem, passando por quatro estágios, até alcançar o estágio de pupa. Após completado o desenvolvimento do adulto dentro do grão, ele emerge e cresce até atingir a maturidade, reiniciando o ciclo biológico (ANTUNES; DIONELLO, 2010). Tendo o milho como hospedeiro, o ciclo biológico do ovo até a emergência do adulto dura em média 34 dias (BOTTON et al., 2005).

Por serem capazes de voar os gorgulhos conseguem rapidamente infestar as espigas no campo e nos locais de armazenamento, ocasionando perdas consideradas definitivas e irreversíveis. Os cuidados no armazenamento do milho irão manter a qualidade do produto colhido durante todo período que for armazenado (EMBRAPA, 2011). O *S. zeamais* não ataca somente a cultura do milho

como também as fruteiras temperadas. Foi relatado por Botton et al. (2005) a ocorrência desta praga na cultura da videira no Rio Grande do Sul, atacando as bagas em fase de maturação e por Giacobbo et al. (2005) em pessegueiros e macieiras também em fase de maturação.

Os insetos do gênero *Sitophilus* estão entre as pragas mais destrutivas no armazenamento. Considerando os danos quantitativos e qualitativos, *S. zeamais*, juntamente com outras pragas de grãos estocados, pode gerar perdas estimadas de 20 a 30% da produção de milho (TEFERA et al., 2011). De acordo com Caneppele et al. (2003) e Lorini (2003), essas perdas são classificadas em: redução no teor de massa seca dos grãos, desvalorização do valor comercial e nutricional do produto, perda do poder germinativo das sementes, contaminação por ácaros e fungos, entre outros o que acarreta graves quedas na classificação comercial dos grãos, consequentemente, na redução do valor de mercado ou até mesmo na condenação de lotes de sementes e/ou grãos para processamento ou consumo. O valor do grão está diretamente relacionado com o nível de contaminação por insetos. Na comercialização de um lote de grãos armazenados se for encontrado algum inseto este é desprezado para consumo humano e passa a ser designado apenas para o consumo animal (VILARINHO, 2012). Estima-se que no Brasil 20% da produção anual de grãos, que está em torno de 120 milhões de toneladas, se perde entre a colheita e o armazenamento, e que metade dessas perdas é devido ao ataque de pragas durante o armazenamento (Figura 2) (SOUZA; SILVA; SANTOS, 2012).

Outra praga bastante popular é o *Tetranychus urticae* (Kock), conhecido no Brasil como ácaro-rajado. Possui dois nomes na língua inglesa, “*red spider mite*” ou “*two-spotted spider mite*”, referente à coloração apresentada pelas fêmeas sob diferentes condições ambientais (MORAES; FLECTMANN, 2008). Pertencente à subclasse Acari e família Tetranychidae, esse ácaro é uma praga importante em muitas culturas e tem uma gama de hospedeiros com mais de 1.100 espécies de plantas (GRBIC et al., 2011). Esta praga cosmopolita alimenta-se de várias espécies de vegetais, incluindo cultivos com importância econômica como: culturas agrícolas (soja, feijão, algodão), hortícolas (tomate, morangueiro, berinjela), ornamentais (roseira) e frutíferas (pessegueiro, macieira, mamoeiro) (GALLO et al., 2002; MIGEON; DORKELD, 2006; GERSON; WEINTRAUB, 2012).

Figura 2- Danos em grãos de milho causados por *Sitophilus zeamais*.

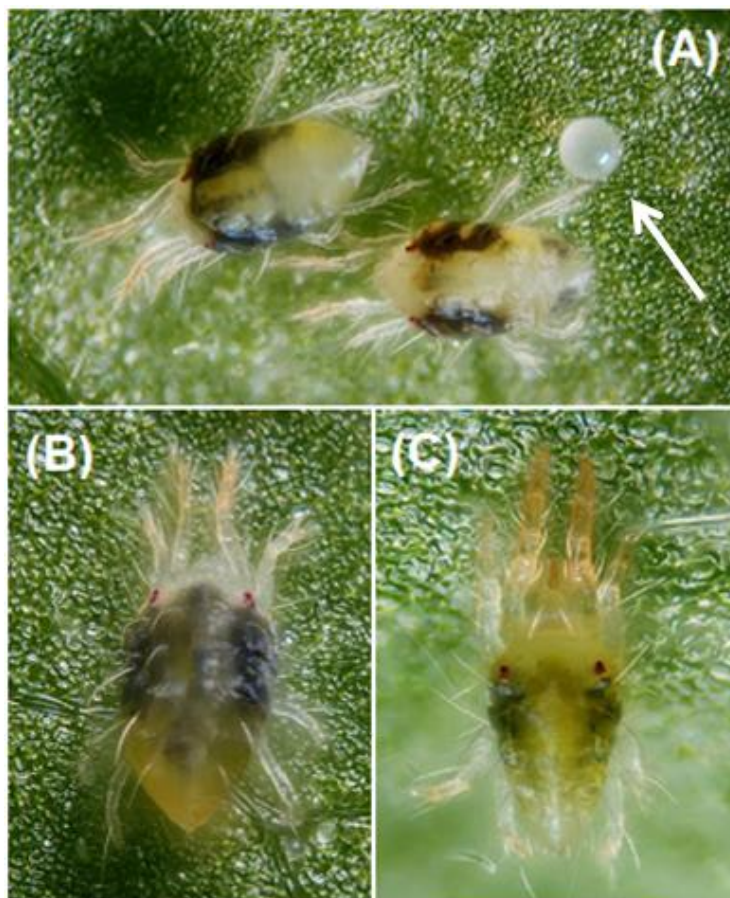


Fonte: A. P. Afonso/ Embrapa, (2003).

Tetranychus urticae quando adulto possui corpo com coloração amarelo-esverdeada, oito pernas e três marcas escuras em cada lado do dorso. Muitos pelos longos ou cerdas também estão presentes na superfície superior do seu corpo (BERNARDI et al., 2010). Existe um acentuado dimorfismo sexual em relação ao tamanho dos indivíduos: os machos são menores, mais estreitos, tem um abdômen cônico e medem aproximadamente cerca de 0,25 mm de comprimento, diferindo das fêmeas, que são largas, ovais e maiores (0,46 mm), com quase o dobro do tamanho dos machos (Figura 3) (FADINI et al., 2006; MORAES; FLECHTMANN, 2008).

O ácaro rajado se aloja na parte inferior das folhas, em colônias com grande número de indivíduos. Para proteção das colônias, os ácaros tecem finos fios de teia que sob altas infestações, podem se estender até os ramos (GALLO et al., 2002). Essa teia serve de proteção contra chuvas, predadores, para dispersão dos ácaros e para marcar território, entre outras funções (MORAES; FLECHTMANN, 2008). Os ovos são depositados isoladamente nesses fios ou diretamente nas folhas, próximos à nervura, são esféricos, translúcidos e relativamente grandes (0,15 mm de diâmetro).

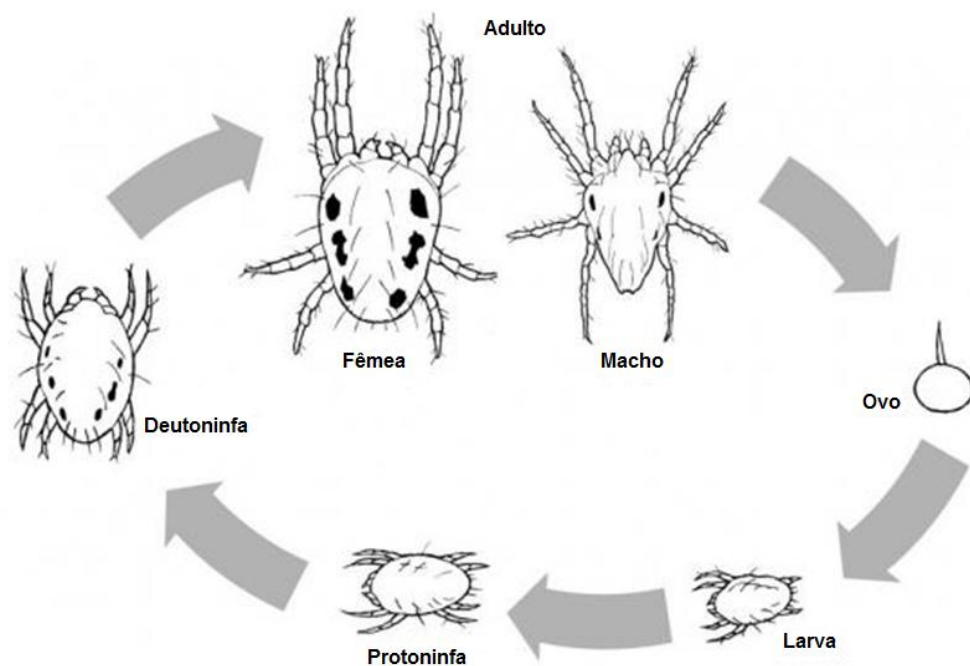
Figura 3 - *Tetranychus urticae* (A) inseto adulto e ovo (seta). Diferenciação física entre (B) fêmea, corpo oval maior que o dos machos e (C) macho corpo menor e mais estreito



Fonte: Martin, (2010).

O ciclo de vida pode variar de acordo com as condições climáticas da região, por isso pode oscilar entre cinco a vinte e um dias (25°C), sendo que em elevadas temperaturas e baixa umidade relativa o tempo de desenvolvimeto dessa praga é reduzido para aproximadamente sete dias (GALLO et al., 2002). Após a eclosão, os ácaros se desenvolvem e passam pelas fases larvais, protoninfa, deutoninfa até chegarem à fase adulta (Figura 4). É uma espécie haplo-diplóide, na qual os machos são gerados por partenogênese arrenótoca (ovos não são fertilizados) e as fêmeas por meio de reprodução sexuada (SILVA; CARVALHO, 2004; MORAES; FLECHTMANN, 2008).

Figura 4 - Ciclo de vida do *Tetranychus urticae*



Fonte: Adaptado de Learmonth, (2016).

Seu aparelho bucal sugador, rompe as células foliares liberando o líquido celular do qual se alimentam. As folhas, como consequência, ficam com várias pontuações claras ficando com um aspecto amarelado (EMBRAPA, 2017). Posteriormente, estas áreas ficam necrosadas, ocorrendo redução da fotossíntese, queda prematura das folhas, necrose dos tecidos, ou até mesmo a morte da planta, refletindo assim em uma perda acentuada na produção e na qualidade dos produtos (SATO et al., 2002). Segundo Moraes e Flechtmann (2008), o ataque dessa praga nos frutos pode levar à diminuição do seu tamanho e à sua maturação precoce.

É muito elevada a capacidade reprodutiva dos ácaros, variando entre 20 e 25 gerações por ano. Logo, a fim de manter o nível populacional do ácaro abaixo do nível de dano econômico o controle desse artrópode deve ser realizado com bastante eficiência (MARUYAMA et al., 2002; MARUYAMA; TOSCANO, 2003). Sendo a principal forma de controle utilizada atualmente, o uso de acaricidas, no entanto, mesmo quando são realizadas pulverizações regulares, existem muitos casos em que o controle do ácaro-rajado se torna ineficiente, pois os indivíduos dessa espécie apresentam grande capacidade de desenvolver resistência a esses produtos químicos aplicados (SATO et al., 2007).

2.2 USO DE METABÓLITOS DE PLANTAS COMO DEFENSIVOS NATURAIS

Nos anos 20, pouco se conhecia a respeito dos efeitos toxicológicos dos agrotóxicos para a saúde humana. Apesar disso, durante a segunda guerra mundial os agrotóxicos foram utilizados como armas químicas, sua produção foi expandida mundialmente pelas indústrias para cerca de duas mil toneladas por ano.

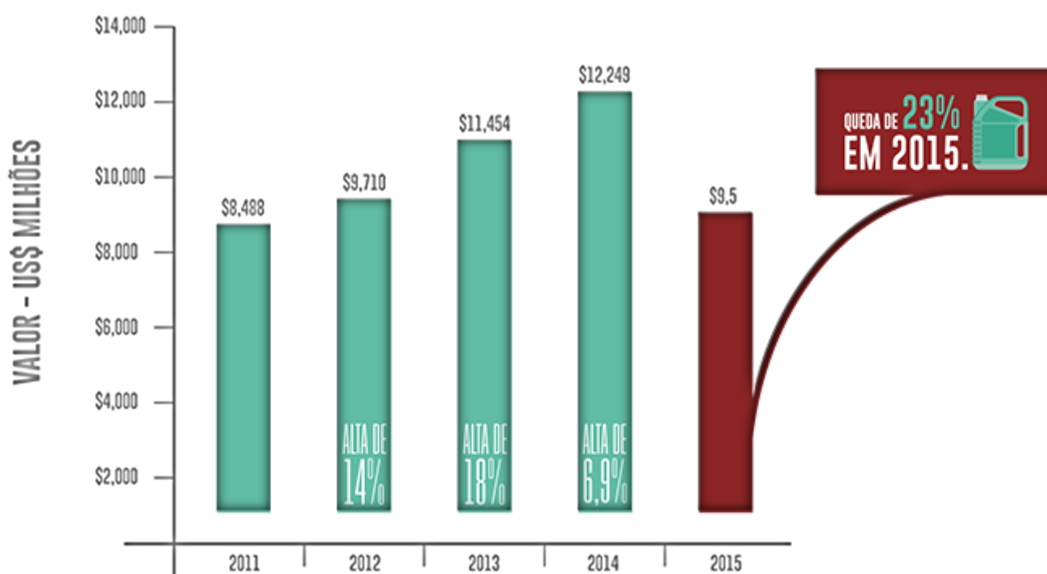
No Brasil, o uso inicial de agrotóxico se deu através de programas de saúde pública, que visavam o combate de insetos transmissores de agente patogênicos, conforme os registros da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS, 1997). Foi em 1960 que houve o aumento da utilização de agrotóxicos na agricultura, devido à implantação de políticas governamentais voltadas para o desenvolvimento agrícola do país (SILVA et al., 2005), que visava a expansão das áreas cultivadas, causando um aumento significativo no número de pragas (LEITE et al., 2006). No entanto, o aumento na utilização desses produtos vem sendo questionado pela sociedade, pois embora possam gerar alguns benefícios, muitos são os males que podem acarretar ao meio ambiente e aos seres humanos (JAMAL et al., 2008).

O consumo de agrotóxico gera um círculo vicioso: onde o aumento do uso gera maiores desequilíbrios ambientais provocados uma maior a necessidade de uso, em doses mais elevadas, e com formulações cada vez mais tóxicas. O uso inadequado e excessivo de defensivos agrícolas durante várias décadas é resultado de uma visão equivocada do processo agrícola, que gera como consequência, a crescente resistência de pragas, micro-organismos fitopatogênicos e ervas daninha aos produtos sintéticos, aumentando a dependência de insumos químicos por parte de produtores (COUTINHO, 1996). Causando também contaminação dos alimentos, solo, água, animais, intoxicação de produtores rurais, além de causar doenças iatrogênicas, o interrompimento do sistema de controle biológico por inimigos naturais, ocasionando surtos de insetos-praga, desequilíbrio biológico, eliminação de organismos benéficos e a redução da biodiversidade (MENEZES, 2005; BETTIOL; MORANDI, 2009).

Segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal (SINDIVEG), nem com a crescente inovação tecnológica de desenvolvimento de sementes geneticamente modificadas, que substitui o uso de agrotóxicos no cultivo

das lavouras, se conseguiu evitar, nos últimos anos, o crescente aumento na utilização de produtos químicos pelos agricultores brasileiros. Anualmente, são usados no mundo aproximadamente 2,5 milhões de toneladas de agrotóxicos. No Brasil o consumo anual tem sido superior a 300 mil toneladas. De acordo com o IBGE, a utilização de produtos químicos para o controle de pragas, doenças e ervas daninhas mais que dobrou em dez anos (EMBRAPA, 2016). As vendas de agrotóxicos aumentaram entre 2004 e 2014, passando de 463.604 toneladas para mais de 914 toneladas. Em 2015, houve uma redução na venda desses produtos, que passou de 914.220 toneladas para 887.872 (Figura 5). O balanço oficial anual do setor registrou redução de 23% em relação a 2014. Os principais motivos dessa queda estão associados à desvalorização do real, o contrabando que atinge níveis cada vez mais expressivos e a dificuldade para obtenção de linhas de crédito rural (SINDIVEG, 2016).

Figura 5 - Vendas de Defensivos Agrícolas no Brasil (2011- 2015)



Fonte: SINDIVEG (2016).

A redução ou eliminação do uso de produtos químicos é uma necessidade atual, econômica e ambiental. Com o aumento dos danos e o surgimento de populações de pragas cada vez mais resistentes aos diversos defensivos agrícolas, os produtores buscam métodos alternativos de controle que, se utilizados

corretamente, podem manter a população da praga em níveis abaixo daqueles que causariam danos econômicos (FERNANDES; CARNEIRO, 2006).

Segundo Fernandes e Carneiro (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. Dentre esses métodos alternativos encontra-se o uso de produtos oriundos de plantas, que apresentam em sua composição substâncias com diversas propriedades biológicas, podendo ser uma alternativa viável, seja do ponto de vista econômico ou ambiental (RODRIGUES et al., 2006).

As principais vantagens relacionadas ao uso de produtos de origem natural na proteção de plantas, quando comparados ao emprego de produtos químicos, deve-se ao fato de serem menos tóxicos, serem degradados com facilidade pelo ambiente, serem oriundos de recursos renováveis e por possuírem um amplo modo de ação (FERRAZ, 2008). Por não apresentarem resíduos químicos, não persistem no meio ambiente, minimizando assim, problemas apresentados pelos produtos sintéticos no que diz respeito aos efeitos ambientais e à saúde humana, tornando o produto mais seguro e saudável ao consumidor final, podendo ser apresentado como importante forma de controle a ser adotado, principalmente pelos pequenos agricultores (TAVARES, 2002; PRATES; VIANA; WAQUIL, 2003).

Porém, esses produtos de origem naturais apresentam algumas limitações, como a rápida degradação (por luz e/ou calor), período curto de viabilidade, disponibilidade de matéria prima e a falta de regulamentação que estabeleça a sua utilização (POTENZA, 2004). A baixa estabilidade dos compostos orgânicos presentes nas soluções e o não monitoramento de possíveis substâncias tóxicas presentes nas plantas ou resultantes da decomposição dos produtos durante sua manipulação também são algumas limitações encontradas nesses produtos (SILVA et al., 2005). Apesar disso, o uso de produtos botânicos surge como uma opção de manejo de pragas e patógenos que, associada a outras práticas, pode contribuir para a redução de doses e aplicações de produtos químicos sintéticos (MACHADO et al., 2007).

A diversidade de substâncias ativas em plantas como os metabólitos secundários, tem motivado o desenvolvimento de pesquisas no intuito de explorar

suas propriedades. O isolamento e a determinação estrutural desses metabólitos são de grande interesse para o desenvolvimento científico da própria química de produtos naturais e contribuem para o avanço de outras atividades científicas e tecnológicas no país (FILHO, 2010).

Na literatura tem-se verificado o registro da eficiência de substâncias naturais, como os metabólitos secundários e óleos essenciais que frequentemente são obtidos de diferentes espécies botânicas e recebem atenção especial pelas diversas atividades que apresentam, sendo alternativas potenciais de uso como herbicida (ASLANI et al., 2016; BALI et al., 2016), inseticida (ABDELGALEIL et al., 2016; DIOUF et al., 2016; POLATO~GLU et al., 2017), acaricida (PAVELA et al., 2016; RIBEIRO et al., 2016), bactericida e fungicida (SILVA et al., 2016). A nicotina, extraída do fumo, *Nicotiana tabacum* (Solanaceae), a piretrina, extraída do piretro, *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Asteraceae), a rotenona extraída de *Derri* sp. e *Lonchocarpus* spp. (Fabaceae), a sabadina e outros alcalóides extraídos da sabadila, *Schoenocaulon officinale* (Liliaceae), e a rianodina extraída de *Rhyania speciosa* (Flacuortiaceae) são exemplos dos primeiros inseticidas botânicos (DEQUECH et al., 2008). Outro exemplo são os herbicidas naturais como alcaloides flindersina e N-metil-flindersina, que apresentam ação semelhante ao herbicida comercial DCMU (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia) (BURGER et al., 2012).

2.3 A CAATINGA E SUAS CARACTERÍSTICAS

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 estações 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 que começaram a estudar a caatinga. Dentre os nascidos no Brasil, exploraram os sertões do Nordeste homens

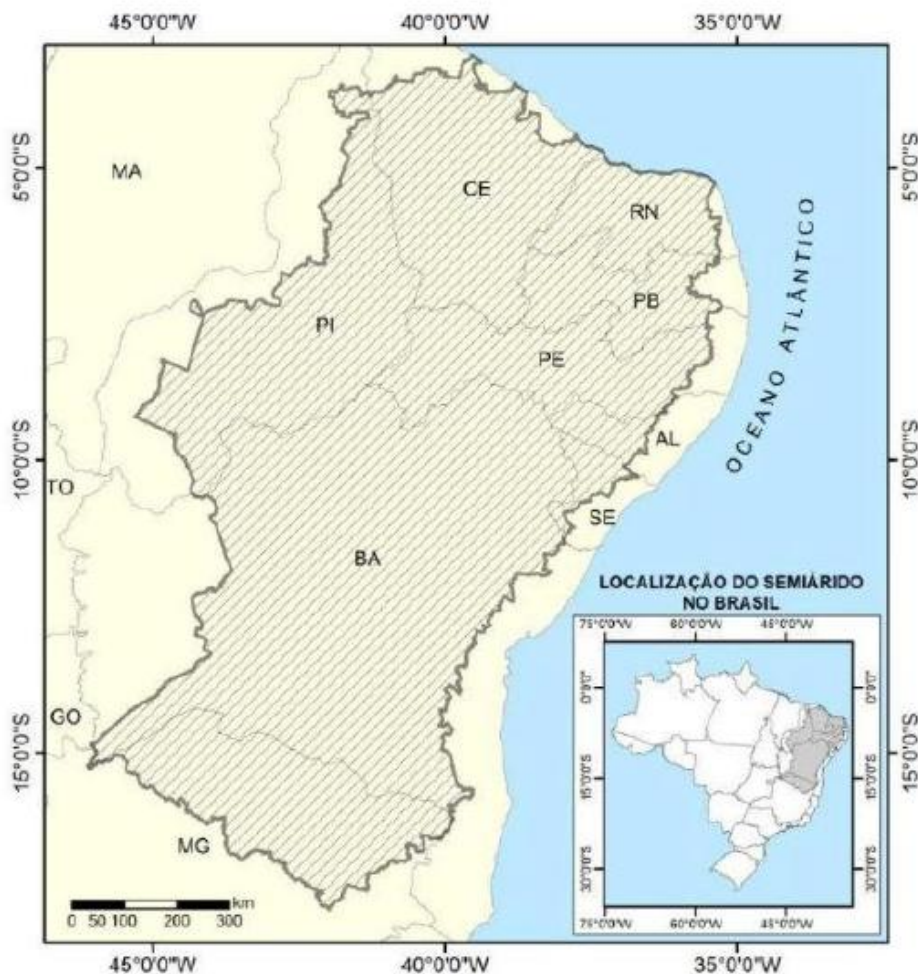
da ciência como Manuel Arruda da Câmara, Francisco Freire Allemão, possivelmente o maior botânico do século XIX, e Theodoro Sampaio (FREIRE, 1998).

Nos limites do vasto território Brasileiro, abriga uma diversidade florística e faunística, que se deve a sua 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 país (SIQUEIRA-FILHO, 2012). Além disso, abriga a flora mais megabiodiversa do mundo (FORZZA et al., 2012), sendo a Caatinga um domínio vegetacional exclusivamente brasileiro insuficientemente conhecido em termos botânicos (GIULIETTI et al., 2005).

O nome Caatinga é de origem tupi-guarani e significa mata branca que caracteriza o aspecto da vegetação durante a seca quando a maioria das árvores perdem as folhas (ALBUQUERQUE et al., 2010). A Caatinga ocupa uma área de 850.000 km², cerca de 11% do território nacional, altamente ameaçada e que engloba de forma contínua parte dos estados do Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia (região Nordeste do Brasil) e parte do norte de Minas Gerais (região Sudeste do Brasil) (IHU, 2012; MMA, 2017) como mostra a Figura 6. Por situar-se entre o equador e o trópico de Capricórnio dispõe de abundante intensidade luminosa, em todo seu território, durante todo o ano.

Esse domínio apresenta uma grande diversidade de espécies vegetais, caracterizadas por distintas fisionomias e das quais muitas são endêmicas, por isso, são totalmente adaptadas às mudanças climáticas observadas no semiárido, caracterizado por apresentar dois períodos bem distintos: um período chuvoso, “inverno”, que está concentrado em um curto período do ano geralmente corresponde, no máximo, a um terço do ciclo anual, dependendo da região e, um período de estiagem, “verão”, que geralmente corresponde à maior parte do ano (FRANCISCO et al., 2012). O clima é quente, com temperatura média anual de 23°C a 27°C, precipitações escassas e irregulares (AGEITEC, 2016). Grande parte do patrimônio biológico dessa região não é encontrada em nenhum outro lugar do mundo além do nordeste do Brasil (TABARELLI, 2003).

Figura 6 - Distribuição do semiárido Brasileiro



Fonte: Araújo Filho, (2011).

A Caatinga possui a maior parte de seu território ocupado por uma vegetação xerófila (PRADO, 2003). Sua vegetação apresenta três estratos distintos, arbóreo, arbustivo e herbáceo, havendo predominância de plantas caducifólias (PEREIRA FILHO et al., 2007). As espécies que a caracterizam são, em geral, lenhosas, herbáceas, além das cactáceas e bromeliáceas (RAMALHO et al., 2009). A vegetação da Caatinga é bastante diversificada, sendo representada por aproximadamente 4.547 espécies, distribuídas em 1.141 gêneros pertencentes a 159 famílias (FORZZA et al., 2012). As famílias com maior número de espécies endêmicas são Leguminosae (80) e Cactaceae (41). Dessas, várias estão em sob risco de extinção (MMA, 2010).

Segundo o Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2016) a biodiversidade da Caatinga além de apresentar uma grande importância biológica, possui diversas

atividades econômicas voltadas para fins agrosilvopastoris e industriais. Além disso, algumas espécies podem ser utilizadas no ramo farmacêutico, cosmético, medicinal e de alimentos. A expansão das ações voltadas para a bioprospecção de metabólitos secundários oriundos de plantas da Caatinga é extremamente importante, uma vez que as plantas tropicais têm sido fonte de materiais para a descoberta de novos medicamentos. Logo, se torna potencial na busca de novas alternativas para a agricultura (SOUZA; FELFILI, 2006; ARCOVERDE et al., 2014).

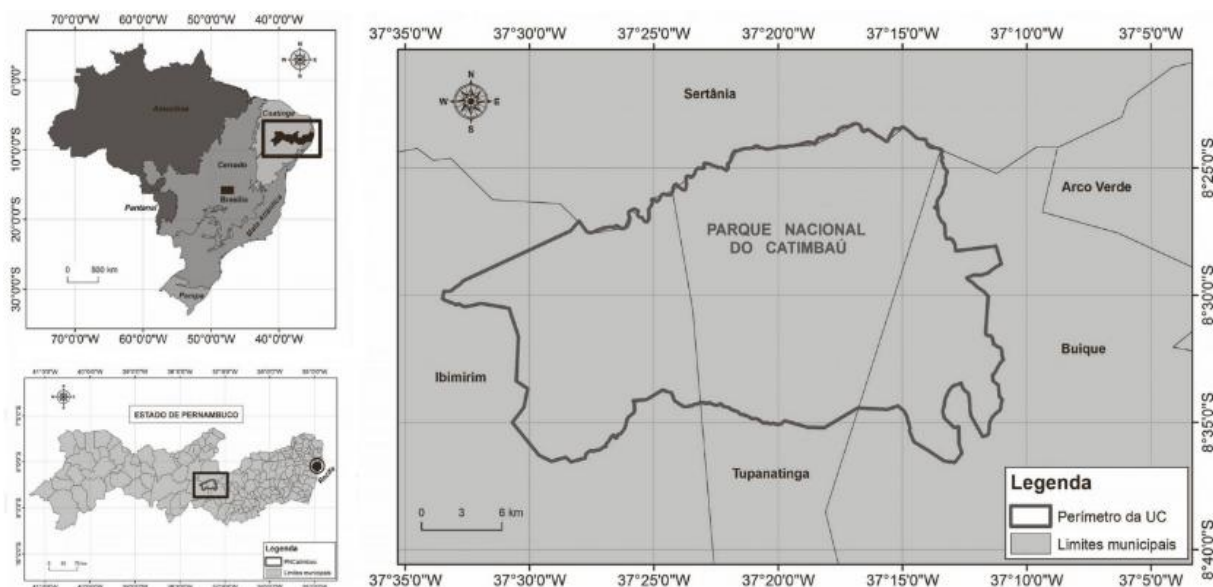
Apesar da sua importância, a vegetação da Caatinga é uma das que mais sofre com a interferência humana no Brasil e vem sendo desmatada de forma acelerada principalmente nos últimos anos (MMA, 2016). Essa situação agrava-se ainda mais pelo número reduzido de publicações relativas à catalogação da flora nativa, em que muitas espécies medicinais estão ameaçadas de extinção sem que tenham sido devidamente estudadas (RÊGO JUNIOR et al., 2011). Segundo Riegelhaupt e Pareyn (2010) a degradação desse domínio é decorrente da necessidade energética da população e do crescimento populacional nas últimas décadas.

O grupo de geoprocessamento do Centro Regional do Nordeste (CRN) do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), em Natal (RN), apresentou resultados preliminares do monitoramento por satélite da Caatinga. Foi mapeada uma área de aproximadamente 90 mil Km², o que representa 14% dos seis Estados e 9,15% do total da Caatinga. O monitoramento até o momento revela que 40% da Caatinga encontra-se preservada e 45% degradada, sendo os demais 7,2% de solo exposto, 6,5% de lavoura e 0,7% de corpos d'água (INPE, 2016).

Diante da velocidade do fenômeno de devastação deste domínio, torna-se mais urgente intensificar os investimentos nessa área (LOIOLA et al., 2012). De acordo com Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (2016), na Caatinga existem cerca de 30 unidades de conservação com variados regimes de gerenciamento, com o menor número e extensão de áreas protegidas. Cerca de 7% dela encontra-se em unidades de conservação e menos de 1% em unidades de proteção integral (como parques, reservas biológicas e estações ecológicas), que são as mais restritivas à intervenção humana. Estas unidades sofrem com sérios problemas de implementação relacionados à proteção da sua biodiversidade (MMA, 2016).

Dentre essas unidades encontramos o Parque Nacional do Catimbau (PARNA Catimbau), criado em 13 de dezembro de 2002 com o objetivo de preservar os ecossistemas naturais existentes, possibilitando a realização de pesquisas científicas e o desenvolvimento de atividades de educação ambiental e turismo ecológico (ICMBIO, 2016). Encontra-se localizado entre as coordenadas geográficas: 8°24'00" e 8°36'35" S e 37°09'30" e 37°14'40" W, com uma área de 62.300 km², no estado de Pernambuco e abrange 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, semiárido Pernambucano (Figura 7) (RODRIGUES, 2006). A região apresenta o clima quente e seco (PEEL, 2007). O relevo do PARNA do Catimbau é marcado pela presença de vales, serras e vertentes, com altitude variando entre 400 e 1000 metros acima do nível do mar (Figura 8) (SNE, 2002).

Figura 7 - Localização do Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco



Fonte: DE Melo, (2012)

Figura 8 - Ilustrações do relevo do Parque Nacional do Catimbau. (A) e (B) Pedra do cachorro; (C) Morro do elefante; (D) Igrejinha; (E) Formações rochosas; (F) Paredão de arenito



Fonte: Acervo do autor

2.4 FABACEAE: ASPECTOS TAXONÔMICOS E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

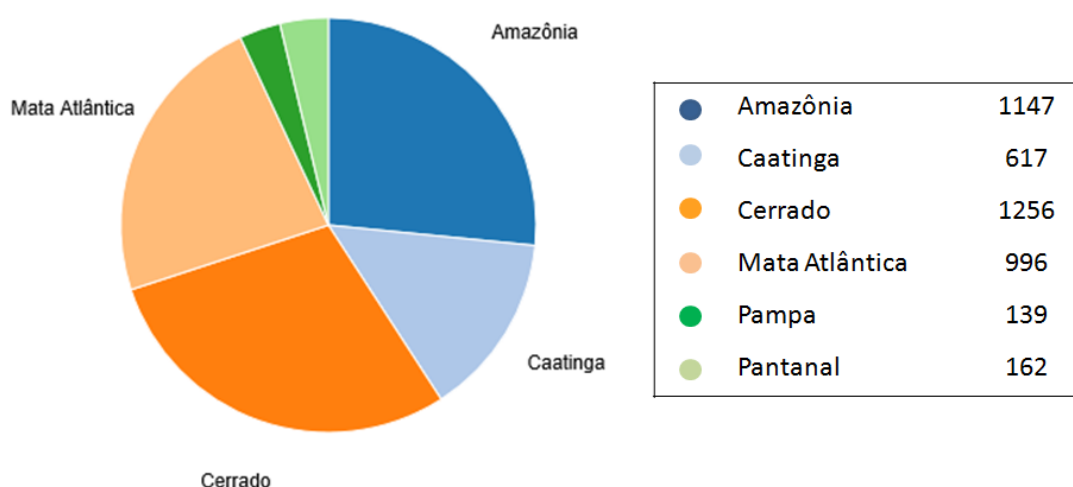
Fabaceae é a terceira maior família de Angiospermas, tanto em número de gêneros e espécies quanto em importância econômica. Segundo Lewis et al. (2005), em relação a origem das plantas pertencentes a essa família ainda existem muitas controvérsias, embora alguns registros fósseis encontrados na América do Norte, Europa, África e Ásia indicam o surgimento das “leguminosas” há pelo menos 60

milhões de anos, com uma rápida diversificação pelo globo, sendo encontradas em praticamente todas as formações vegetais do planeta.

A família Fabaceae encontra-se entre um dos grupos botânicos mais avaliados tanto do ponto de vista químico como farmacológico. Nos sistemas de classificação (APG II 2003; APG III 2009), Fabaceae está inserida juntamente com Polygalaceae, Surinaceae e Quillajaceae na ordem Fabales. Tradicionalmente foi reconhecida como uma única família, estando subdividida em três subfamílias; Papilionoideae ou Faboideae, Caesalpinioideae e Mimosoideae (BENTHAM, 1865; POLHILL et al., 1981), anteriormente tratadas como famílias distintas (Fabaceae, Caesalpinaceae e Mimosaceae, respectivamente) por serem muito diversas entre si (QUEIROZ, 2009; LEWIS et al., 2005; VALLE et al., 2006). A subfamília Faboideae é a maior, com 476 gêneros e aproximadamente 14.000 espécies (LEWIS et al., 2005); Mimosoideae possui 77 gêneros e aproximadamente 3.000 espécies (APG II, 2003; LUCKOW, 2005); Caesalpinioideae agrupa 170 gêneros e cerca de 3.000 espécies (DOYLE et al., 2000).

Essa família possui uma grande diversidade morfológica e taxonômica e uma ampla distribuição entre os ecossistemas mundiais (MORIM, 2006). No Brasil, foram registrados 222 gêneros (16 endêmicos) e 2.824 espécies, sendo abundantes em quase todos os seus biomas e ecossistemas (Figura 9) (Flora do Brasil 2017).

Figura 9 - Nomes aceitos de espécies por domínio fitogeográfico no Brasil



Fonte: Fabaceae *in* Flora do Brasil, (2017).

Dentre as famílias encontradas na Caatinga, Fabaceae é a mais representativa com 603 espécies distribuídas em 120 gêneros (LIMA et al., 2014). Compõe uma das famílias botânicas de maior importância econômica como recurso alimentar para o sustento das famílias sertanejas que as consomem e as utilizam em diversas outras atividades como na medicina popular (QUEIROZ, 2009). Há muitas de suas espécies úteis e inúmeras delas são cultivadas desde a antiguidade devido principalmente ao seu potencial alimentício e medicinal, embora existam várias outras utilidades diretas: forrageira, melífera, ornamental, madeireira, fornecedoras de celulose, óleos, adubo verde, carvão, lenha, resinas, tintas, vernizes e cortiça (MIOTTO; LÜDTKE; OLIVEIRA, 2008; MARTINS, 2009; SOUZA;SOUZA, 2011).

2.4.1 Subfamília Mimosoideae

A Mimosoideae é a segunda maior subfamília de Fabaceae (LEWIS et al., 2005). Espécies dessa subfamília são distribuídas nos trópicos, subtrópicos e regiões de clima temperado, sendo a América Tropical, África e Ásia-Austrália os atuais centros de grande diversidade do grupo, com gêneros e espécies representativas na Caatinga, no nordeste brasileiro (DA SILVA; BARBOSA, 2000). No Brasil, foram encontradas 580 espécies nativas em 26 gêneros (BARROSO et al., 1999).

Morfológicamente, essa subfamília pode se distinguir das demais por apresentar folhas bipinadas, com folíolos frequentemente numerosos; corola com prefloração valvar, flores pequenas, actinomorfas e agrupadas de diversos modos, principalmente espiciforme e capituliforme (SOUZA, 2007). Os frutos são bem variados, podendo ser de diversos tipos: deiscentes, sendo os tipos mais frequentes os folículos e os legumes, ou indeiscentes, como os legumes bacoides, nucoides e samaroides. As sementes possuem hilo diminuto, com ou sem um pleurograma distinto e embrião com eixo radícula hipocótilo reto, e no que se refere às raízes, em geral, apresentam nódulos (BARROSO et al. 1999; DOYLE et al., 2000; LEWIS et al., 2005).

Mimosoideae, ao contrário das outras subfamílias, destaca-se por apresentar políades como principal tipo de unidade de dispersão, sendo comum a

heterogeneidade no tamanho dos grãos de pólen, no tipo apertural que pode ser porado ou colporado, e nos padrões de ornamentação (GUINET, 1981).

2.4.1.1 *Anadenanthera colubrina*

O gênero *Anadenanthera* foi estabelecido em 1955 por J. P. M. Brenan, como parte do gênero *Pipitadenia*, compreendendo cinco espécies. Brenan fez uma revisão do gênero *Piptadenia* e utilizando critérios com a estrutura das sementes, dividiu este gênero em oito gêneros, dentre eles o *Anadenanthera*. Em 1964 o pesquisador Siri Von Reis Altschul em sua revisão taxonômica estabeleceu que *Anadenanthera* é um gênero endêmico da América Latina e do Caribe e é composto por duas espécies e quatro variedades:

- *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg. (nomes populares: angico, angico preto, angico de casca, angico do cerrado, yopo ou cohoba): variedade *peregrina*, que ocorre no noroeste do Brasil, Guiana, Colômbia, Venezuela e nas Antilhas; e variedade *falcata* (Benth.) Altschul, que é encontrada no sul do Brasil e Paraguai.

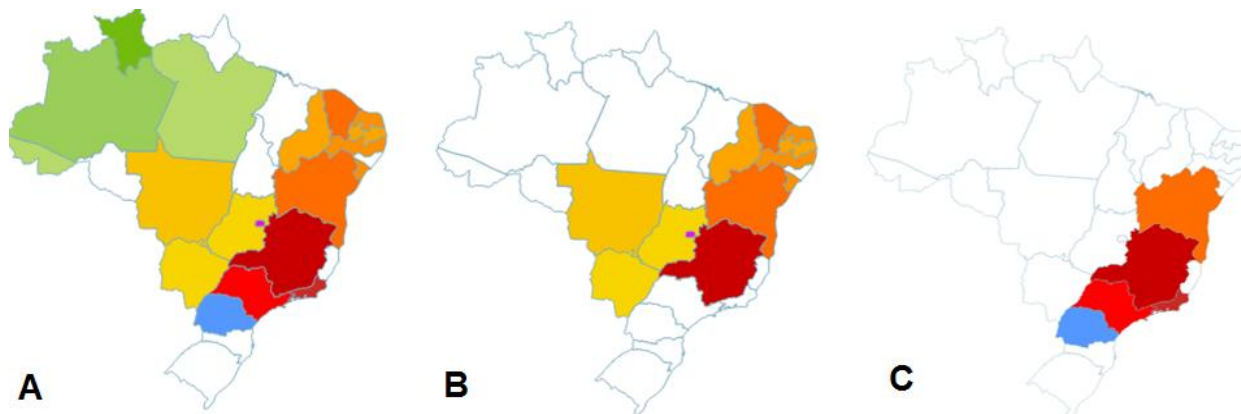
- *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (nomes populares: angico, angico vermelho, angico branco, curupay): variedade *colubrina*, que cresce no nordeste da Argentina e sudeste do Brasil; variedade *cebil* (Griseb.) Altschul (cebil ou Vilca), que ocorre no norte da Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Peru.

A *Anadenanthera colubrina* possui a maior abrangência geográfica do gênero, ocorrendo desde o sul da Bolívia até o norte da Argentina (MORIM, 2016). No Brasil (Figura 10A) sua distribuição geográfica encontra-se no norte, nordeste, centro-oeste, sudeste e sul, estando presente nos domínios fitogeográficos Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica. De acordo com Morim (2016), as distribuições de suas duas variedades são:

- Var. *cebil* – Figura 10 B: Regiões nordeste (Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe), centro-oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso) e sudeste (Minas Gerais);

- Var. *colubrina* – Figura 10 C: Regiões nordeste (Bahia), sudeste (Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro) e sul (Paraná).

Figura 10 - Ocorrência natural de (A) *Anadenanthera colubrina* e suas variedades (B) *cebil* e (C) *colubrina* no Brasil



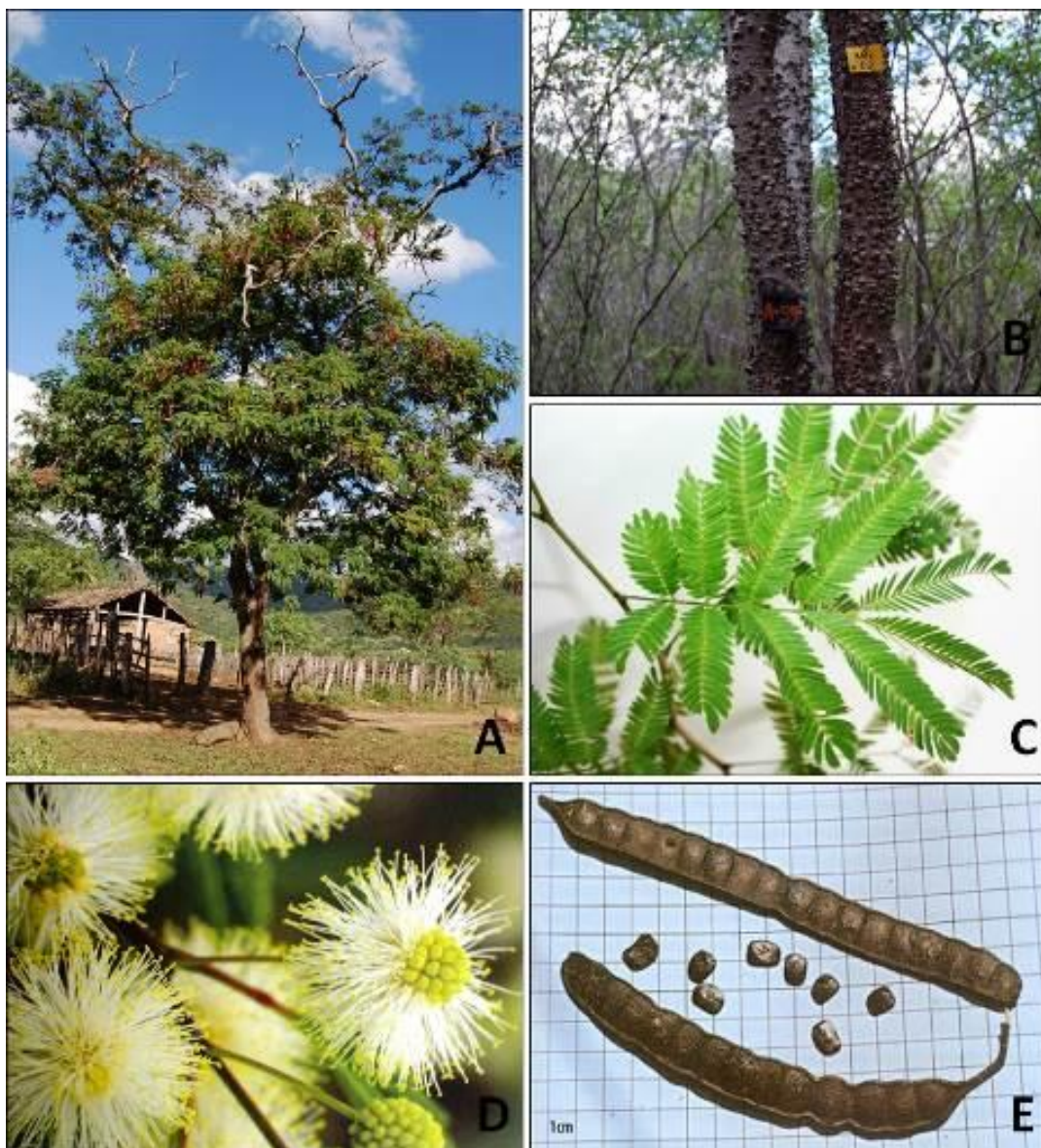
Fonte: Retirado de Morim, (2016).

Etimologicamente, o nome *Anadenanthera* significa antera sem glândula, *colubrina* vem do latim *coluber*, em alusão à cobra e *cebil* é uma palavra de origem espanhola, comum às leguminosas (CARVALHO, 2003). Essa espécie apresenta diversos nomes popularmente tais como: angico, em Pernambuco, na Bahia, em Minas Gerais, no Paraná, nos estados do Rio de Janeiro e de São Paulo; angico-branco-liso, curupaí e curupaíba, em São Paulo; angico-cambuí, no estado de São Paulo e no Paraná; angico-côco; angico-escuro; angico-liso; angico-vermelho, no Paraná e no Estado do Rio de Janeiro; aperta-ruão; cambuí, cambuí-branco e cambuí-vermelho, no Estado do Rio de Janeiro; cambuí-angico; cauvi; jurema-preta; monjoleiro, no Paraná, angico-decarço, (ALTSCHUL, 1964; LORENZI, 2000; CARVALHO, 2002).

É uma árvore perenifólia a semicaducifólia, podendo atingir de 10 a 35 m de altura e 30 a 120 cm de diâmetro a altura do peito (DAP) (CARVALHO, 2002). Na Caatinga, apresenta altura entre 3 a 15 m, enquanto em outros ecossistemas atinge de 20 a 30 m, com diâmetro de até mais de um metro (Figura 11A) (MAIA, 2004), o que justifica o uso comum dessa planta para construção, energia, fabricação de móveis e artefatos (CARVALHO, 2002; DE MATTOS; SEITZ, 2005; MONTEIRO et al., 2006).

Possui caule reto ou tortuoso e mais ou menos cilíndrico, fuste com até 13 m de comprimento (Figura 11B). Ramificação cirnosa, dicotômica, tortuosa e irregular, com copa umbeliforme e bastante ramificada (CARVALHO, 2002). Casca com espessura de até 30 mm apresentando casca externa de cor grisácea e com muitas variações em sua morfologia, podendo ser: a) completamente coberta de acúleos, escura, profundamente gretada, áspera, apresentando arestas salientes; b) possuir poucos acúleos; c) podendo ser lisa, totalmente desprovida de acúleos e ter fissuras longitudinais pouco profundas. Casca interna é fibrosa, marrom-clara e levemente avermelhada (REITZ et al., 1988; CARVALHO, 2003). Suas folhas são compostas com raque apresentando de 15 a 20 cm de comprimento (Figura 11C); folíolo linear, assimétrico na base, obtuso; há presença de glândulas: uma glândula cônica séssil próxima ao pulvínulo (na base do pecíolo) e uma a quatro glândulas verde-avermelhadas nos últimos pares de folíolos (CÂNDIDO; GOMES, 1992; LORENZI, 2002). Suas flores são diminutas, de coloração branca arredondada e estão agrupadas em inflorescências terminais globosas, exalando leve aroma quando abertas (Figura 11D) (MAIA, 2004). Os frutos são alongados do tipo vagem podendo chegar até 32 cm de comprimento e de 10 a 15 mm de largura, pericarpo lenhoso e pouco espesso mais ou menos achatado, uniloculares de cor marrom escura quando maduros (ALTSCHUL, 1964; OLIVEIRA, 1997; CARVALHO, 2002). Cada fruto contém de 8 a 15 sementes que são escuras, brilhantes, orbiculares, achatadas, com ala estreita e sem pleurograma, com até 15 mm de comprimento (Figura 11E) (CARVALHO, 2002).

Figura 11 - *A. colubrina*; (A) Porte da planta; (B) Detalhe do Tronco; (C) Folhas; (D) Flores; (E) Fruto e Sementes



Fonte: adaptado de <http://avisospsicodelicos.blogspot.com.br/2008/02/angico-anadenanthera-colubrina.html>, 2013; Castro e Cavalcante, (2010).

2.5 METABÓLITOS DE PLANTAS

Chamamos de metabolismo o conjunto de reações químicas que continuamente está ocorrendo nas células de todos os seres vivos com o objetivo que o organismo permaneça vivo, promovendo a sua renovação e manutenção celular. A direção dessas reações se dá através de enzimas específicas,

estabelecendo o que conhecemos como rotas metabólicas (VIZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010). Os compostos químicos que são formados, degradados ou transformados são chamados de metabólitos (SIMÕES et al., 2010), e as reações enzimáticas envolvidas, são designadas como anabólicas, catabólicas ou de biotransformação (SIMÕES et al, 2004).

Todas as plantas produzem constituintes químicos, que fazem parte de suas atividades metabólicas normais. Estes podem ser divididos em metabólitos primários e metabólitos secundários (WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008). De acordo com a teoria evolucionista todos os seres vivos derivaram de um precursor comum, o que explica, por exemplo, porque as principais macromoléculas (carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos) são essencialmente as mesmas, quer num organismo vegetal ou animal (SIMÕES et al., 2010). Essas moléculas por participarem de processos essenciais à vida e comuns aos seres vivos têm sido definidas como integrantes do metabolismo primário, que compreende varias reações químicas envolvidas na transformação de moléculas em unidades constitutivas essenciais das células (SANTOS, 1999), reações essas que se encontram envolvidas na manutenção fundamental da sobrevivência e do desenvolvimento celular (DIXON, 2001).

Segundo Santos (1999), vegetais, micro-organismos e em menor escala animais, apresentam um metabolismo diferenciado (enzimas, coenzimas e organelas) capaz de produzir, transformar e acumular outras substâncias não necessariamente relacionadas de forma direta à manutenção da vida do organismo produtor. Nesse grupo, encontram-se substâncias cuja produção e acumulação estão restritas a um número limitado de organismos, caracterizando-se como elementos de diferenciação e especialização. Este conjunto metabólico costuma ser definido como metabolismo secundário, cujos produtos, embora não necessariamente essenciais para o organismo produtor, garantem vantagens para sua sobrevivência e para a perpetuação da espécie, em seu ecossistema. Os metabólitos secundários são compostos derivados biologicamente dos metabólitos primários. Eles são frequentemente armazenados pelas plantas em quantidades menores do que os metabólitos primários, sendo às vezes sintetizados em estágios de desenvolvimento distintos da planta (CHAGAS, 2004).

Durante muito tempo, acreditou-se que os metabólitos secundários eram produzidos sem nenhuma função específica, considerados produtos descartáveis pelas plantas, sem valor ou mesmo como resultado de algum erro metabólico, servindo como uma forma de desintoxicação das plantas (TAIZ; ZEIGER 2009). No entanto a partir de 1950 com um maior conhecimento e com a descoberta de novos metabólitos foi descobrindo-se a real importância dessas substâncias para a vida das plantas cuja função e variedade de compostos estão relacionadas diretamente à defesa da planta. Um dos principais componentes do meio externo cuja interação é mediada por compostos do metabolismo secundário são os fatores bióticos. Desse modo, os metabólitos secundários são úteis na defesa da própria espécie (OJALA, 2001), proporcionando ao vegetal, defesa ou proteção contra outras plantas, insetos, herbívoros, ataque de patógenos, micro-organismos e causadores de infecções (PINTO et al., 2002; SANTOS, 2004; FUMAGALI et al., 2008). Assim, os metabólitos secundários relacionados à defesa contra patógeno podem ser divididos em dois tipos, fitoanticipinas quando são produzidos e estocados constitutivamente pela planta ou fitoalexinas caso sejam sintetizados somente após o reconhecimento da presença do patógeno (PIASECKA; JEDRZEJCZAK-REY; BEDNAREK, 2015).

Além disso, também estão envolvidos com a atração de organismos benéficos como polinizadores, animais dispersores de sementes, bem como micro-organismos simbiotes. A produção desses metabólitos também protege o vegetal de alguns fatores abióticos, como aqueles associados com mudança de temperatura, umidade, níveis de luz, exposição a UV e deficiência de nutrientes minerais (UEFUJI et al., 2003; PERES, 2004; SIMÕES et al., 2010).

Devido a sua grande utilidade e diversidade, os metabólitos secundários despertam o interesse de pesquisadores que vislumbram neles uma fonte promissora de novas moléculas úteis ao homem. As indústrias agrônoma, alimentícia, farmacêutica e cosmética têm grande interesse na descoberta dessas moléculas, pois estas, devido a suas propriedades, possuem uma elevada importância comercial. (SANTOS, 2002; OKUNADE; ELVIN-LEWIS; LEWIS, 2004; HAIDA et al., 2007; GAMBETA, 2008).

2.5.1 Fatores que influenciam a produção de metabólitos secundários

Os metabólitos secundários representam uma interface química entre a planta e o ambiente. Assim, conforme a natureza e a magnitude do estímulo ambiental vegetal poderá sintetizar compostos diferentes devido às condições ambientais. Dentre os diversos fatores que influenciam a síntese de metabólitos secundários, a sazonalidade é um dos mais expressivos com relação às variações na quantidade e natureza dos constituintes ativos das plantas. A época em que um vegetal é coletado é de grande importância, visto que a quantidade e a natureza dos constituintes ativos não são constantes durante todo ano. São relatadas, por exemplo, variações sazonais no conteúdo de praticamente todas as classes de metabólitos secundários, como óleos essenciais, lactonas sesquiterpênicas, ácidos fenólicos, flavonóides, cumarina, saponinas, alcalóides, taninos, graxas epicuticulares, iridóides, glucosinolatos e glicosídeos cianogênicos. 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 (Gobbo Neto, Lopes 2007; Hall, 2007).

A idade e o desenvolvimento das plantas também podem modificar as proporções relativas dos princípios ativos (MORAIS, 2009). Bertolucci et al. (2013) em seus estudos mostram que de acordo com a época do ano, existe uma variação na concentração de cumarinas em *Mikania laevigata*. No verão a concentração de cumarina existente nessa planta foi aumentada, enquanto que no inverno foi reduzida. Passari, Scarminio e Bruns (2014), também encontraram maiores concentrações de cumarina no verão do que no outono e inverno nessa mesma espécie.

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). Um dos fatores que exerce maior influência em seu desenvolvimento é a faixa em que ocorrem as variações diárias, mensais e anuais de temperatura, afetando, portanto, a produção dos metabólitos secundários. 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). Segundo Almeida et al. (2017), sazonalidade, luz, temperatura e irrigação influenciaram nos conteúdos de cumarina, clorogênio e ácidos dicaffeoylquinicos existente nas espécies de *M. laevigata* e *M. glomerata*.

O efeito da seca na concentração de metabólitos, às vezes, depende do grau de estresse e do período em que ocorre, como no caso de climas do semiáridos (KOEPPPE, 2013), por vez os efeitos a curto prazo parecem levar a uma produção aumentada, enquanto que a longo prazo é observado um efeito oposto. A chuva é outro fator que pode ocasionar a perda de substâncias hidrossolúveis das folhas e raízes por lixiviação, aplicando-se isso a algumas plantas produtoras de alcalóides, glicosídeos e até mesmo óleos voláteis (Gobbo Neto, Lopes 2007).

Alterações fisiológicas nas plantas tais como fotossíntese, crescimento, mobilização de reserva e expansão foliar, podem ser modificadas por estresse hídrico alterando assim 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). Gershenzon (2010) afirma que conforme mencionado, o estresse hídrico frequentemente tem consequências 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.

Outro fator de grande importancia é a radiação UV devido ao fato 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.

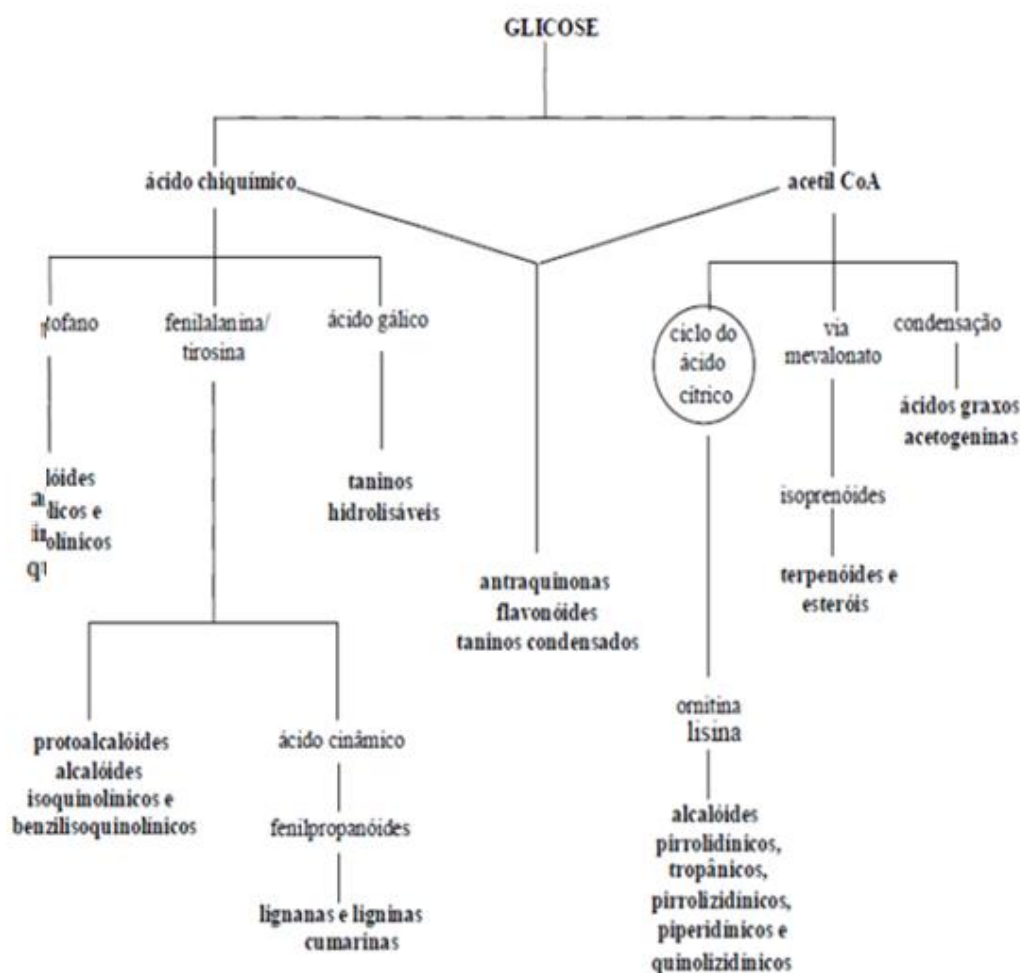
O fator nutricional pode influenciar diretamente não somente o metabolismo primário, bem como a síntese de metabólitos secundários em plantas (GOBBONETTO; LOPES, 2007). Para o desenvolvimento e manutenção das funções vitais das plantas, são conhecidos dezessete elementos essenciais como os macronutrientes: nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre; os micronutrientes: boro, cloro, cobre, cobalto, ferro, manganês, molibdênio, zinco e, o carbono, o oxigênio e o hidrogênio, provenientes do ar e da água (MORAIS, 2009), onde a diminuição ou o excesso desses nutrientes podem acarretar em maior ou menor produção de princípios ativos nas plantas (MARTINS et al., 1995). As proporções relativas dos princípios ativos, bem como a quantidade total dos compostos metabólitos pode ser influenciados também pela idade e o desenvolvimento da planta (MORAIS, 2009).

2.5.2 Metabólitos Secundários de Vegetais

Praticamente a origem de todos os metabólitos primários e secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose. Esta é convertida em moléculas de ácido pirúvico que podem seguir duas vias principais. Na primeira, moléculas de piruvato entram na via do ácido chiquímico que, por sua vez, origina os aminoácidos aromáticos precursores da maioria dos metabólitos secundários aromáticos (alcalóides indólicos, quinolínicos, isoquinolínicos, ligninas e lignanas, cumarinas e taninos hidrossolúveis). Na segunda, o piruvato continua sendo oxidado

até a formação de moléculas de acetilcoenzima A (acetil-coA). Estas podem seguir três vias metabólicas diferentes: via ciclo do ácido cítrico onde serão formados os alcalóides pirrolidínicos, tropânicos, pirrolizidínicos, piperidínicos e quinolizidínicos, via do mevalonato que originará terpenoides e esteróis e a via da condensação do acetato, formando os chamados derivados do acetato (acetogeninas). Alguns metabólitos derivam não apenas de um desses intermediários, mas sim da combinação de uma unidade do ácido chiquímico e uma ou mais unidades do acetato ou derivados destes, podendo resultar na produção de antraquinonas, flavonoides e dos taninos condensados (Figura 12) (SANTOS 2004; SIMÕES et al., 2010).

Figura 12 - Ciclo biossintético dos metabólitos secundários



Fonte: Simões, (2010).

Além disso, ampliando ainda mais a variedade dos metabólitos secundários, estes podem estar ligados a uma ou mais moléculas de açúcar formando os

chamados heterosídeos; ou podem ser encontrados na forma livre denominados de agliconas (SIMÕES et al., 2010).

Os metabólitos secundários podem sofrer interferência em sua produção biológica. Dentre os fatores associados a alterações qualitativas e quantitativas na produção de metabólitos secundários, destacam-se as interações bióticas (planta/micro-organismos, planta/insetos, planta/planta), idade, estágio de desenvolvimento, ritmo circadiano e os fatores abióticos: luminosidade, temperatura, pluviosidade, nutrientes, sazonalidade, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, composição atmosférica e altitude (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; MORAIS, 2009). Por isso, como e quando um vegetal é coletado é um dos fatores de maior importância para o estudo desses metabólitos, visto que, variações podem coordenar ou alterar a produção desses compostos (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2000). Existem três grandes grupos de metabólitos secundários de acordo com suas origens biossintéticas: terpenoides (25.000 tipos, 55%), alcaloides (12.000 tipos, 27%) e compostos fenólicos (8000 tipos, 18%) (TAIZ; ZEIGER, 2009; DEVAPPA et al., 2011; PINO; SANCHEZ; ROJAS, 2013).

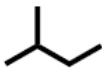
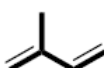
2.5.2.1 Terpenos

Os terpenos são produzidos a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto), conhecidos também como terpenoides ou isoprenoides, compreendem, do ponto de vista estrutural, a mais diversificada classe de metabolitos secundários de plantas (PHILLIPS et al., 2008; DEVAPPA et al., 2011), com mais de 40.000 membros identificados, sendo alguns exemplos os óleos essenciais, saponinas, carotenoides e a maioria dos fitoreguladores (ALVES, 2001; PERES, 2004; DZUBAK et al., 2006). Apresentam funções variadas nos vegetais e de modo geral possuem diversas atividades farmacológicas (NIERO; MALHEIROS, 2007). São substâncias hidrofóbicas, armazenadas em canais de resina, células de óleos essenciais ou mesmo tricomas glandulares, contendo ou não oxigênio que são classificados em função do número de subunidades isoprenoides com 5 átomos de carbono (RATTAN, 2010).

As unidades bioquímicas a partir das quais são sintetizados todos os terpenos são pirofosfato de isopentenilo (IPP) e pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP) que, por sua vez são constituintes da via do mevalonato (MVA). Todos os terpenoides são formados por estruturas básicas de isopreno, constituídas por uma cadeia acíclica de cinco carbonos (C₅ H₈) (AJIKUMAR et al., 2008; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Existe um amplo espectro de diferentes tipos de terpenos, classificados de acordo com o número de unidades de isopreno que vão se ligando entre si, orientados em sentido inverso (cabeça-cauda) (DUBEY et al., 2003; DZUBAK et al., 2006; PERES, 2008) A classificação desses terpenos pode ser vista na Tabela 2 (NIERO; MALHEIROS, 2012).

Tabela 2 - Classificação dos terpenos com base no número de subunidades isoprenoides.

 Unidade Isoprênica (C₅)  Isopreno		
Nº de unidades de isopreno	Nº total de átomos C	Classe
1	5	Hemiterpenos
2	10	Monoterpenos
3	15	Sesquiterpenos
4	20	Diterpenos
5	25	Sesterpenos
6	30	Triterpenos
8	40	Tetraterpenos
10 ou >10	50 ou > 50	Politerpenos

Fonte: Rattan, (2010).

Os hemiterpenoides (C₅) são o menor grupo dos terpenos, sendo que o seu representante mais conhecido e estudado é o isopreno, um produto volátil liberado de tecidos fotossinteticamente ativos (CROTEAU et al., 2000). O precursor para a formação de monoterpenos é o geranyl difosfato (GPP), que é gerado a partir da adição de uma unidade de IPP a uma de DMAPP. Esses monoterpenos fazem parte da classe mais simples dos terpenoides, sendo compostos por duas unidades de isopreno, ou seja, 10 átomos de carbono (VRANOVÁ et al., 2012). Por possuir baixo

peso molecular, costumam ser voláteis, portanto são geralmente componentes majoritários dos óleos essenciais e das essências voláteis.

Os monoterpenos são altamente hidrofóbicos e seus efeitos biológicos estão relacionados à função de defesa contra patógenos como fungos e bactérias. Estes metabólitos podem ser isolados através de destilação ou extração e são conhecidos mais de 1.000 monoterpenoides naturais (OLIVEIRA et al., 2003; TURINA et al., 2006). Segundo Niero e Malheiros (2007) o maior interesse nestes compostos é o seu uso na fabricação de sabões, detergentes, cosméticos e perfumaria.

A junção de uma unidade de IPP ao GPP forma o farnesil difosfato (FPP), precursor para a síntese dos sesquiterpenos. Sua estrutura compreende 15 átomos de carbono (3 unidades de isopreno) (AHARONI et al., 2006; VRANOVÁ et al., 2012). A maioria dos sesquiterpenos, em geral, apresentam propriedades biológicas contra fungos, bactérias e efeito anti-herbivoria (NIERO; MALHEIROS, 2007). Existe um grande número de sesquiterpenos que possuem atividades farmacológicas, como anti-inflamatória, antimicrobiana, antitumoral e citotóxica (CHEN et al., 2011; HOG et al., 2012).

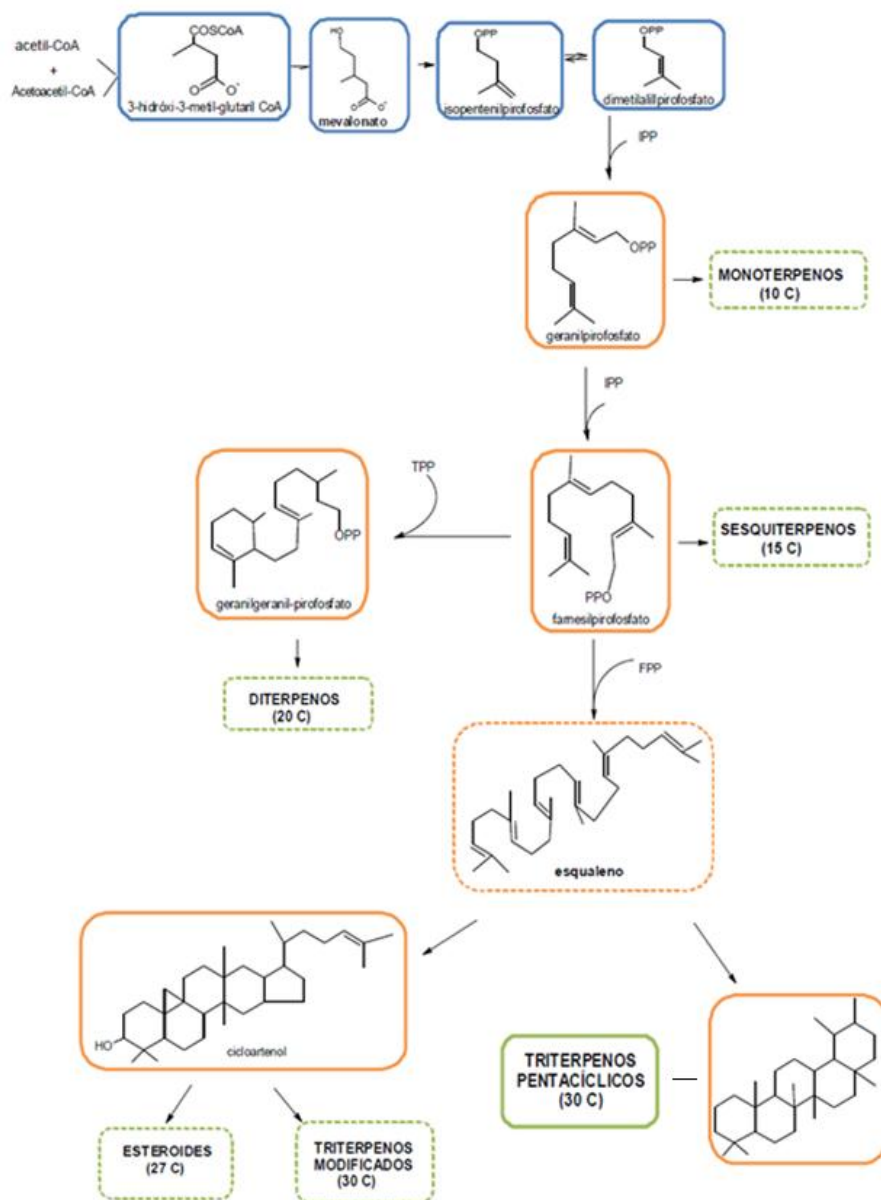
Os diterpenos compreendem um grande grupo de compostos não voláteis e são uma classe heterogênea de compostos naturais com base num esqueleto com 20 átomos de carbono. Amplamente distribuídos na natureza, tanto em organismos terrestres como marinhos, esses compostos resultam da condensação de quatro unidades de isopreno (LANZOTTI, 2013). A adição de uma unidade de IPP ao FPP, por sua vez, forma o geranylgeranyl difosfato (GGPP), precursor dos diterpenos. Estas estruturas são posteriormente modificadas por enzimas (hidroxilases, desidrogenases, redutases e glicosil, metil e acil transferases), que juntas geram uma série de compostos diferentes (AHARONI et al., 2006; VRANOVÁ et al., 2012). Os diterpenoides constituem múltiplas propriedades biológicas, dentre as principais encontramos, antineoplásica contra câncer de ovário, mama e pulmão além das atividades anti-inflamatória, antimicrobiana (GHOSH et al., 2013; MIN, 2011; YANG et al., 2012; FIGUEIREDO et al., 2014) e antioxidante (RIJO et al., 2009).

Os triterpenos, com 30 átomos de carbonos, são formados pelas ligações entre duas moléculas de farnesil difosfato (C15) que originam o esqualeno, precursor dos triterpenos e dos esteroides (SIMÕES et al., 2010; VRANOVÁ et al., 2012). A

Figura 13 mostra um resumo da biossíntese de alguns terpenoides. Os triterpenos podem apresentar esqueleto de carbono acíclico ou conter estruturas mono-, bi-, tri-, tetra- ou pentacíclicas (DEWICK, 2002; XU et al., 2004). Os triterpenoides podem ser encontrados na forma livre ou conjugada com açúcares sob a forma de glicosídeos, formando saponinas triterpênicas (SCHMIDT et al., 2012). Os triterpenoides e seus derivados esteroidais, além de compreender um grande grupo de classe dos terpenos, possuem diversas atividades biológicas, devido sua variedade estrutural, entre as quais destacam-se: anti-inflamatória, antitumoral, antimicrobiana, antiviral, antinociceptiva, hepatoprotetora, antialérgica, gastroprotetora, antimicótica, cardioprotetora, imunomodulatória e inseticida NIERO; MALHEIROS, 2007; MUFFLER et al., 2011; RHOURLI-FRIH et al., 2013 MATOS et al., 2013; SILVA; DUARTE; VIEIRA FILHO, 2014).

Os tetraterpenos (C40) são constituídos pela condensação cabeça-cabeça de duas moléculas de geranyl-PP (C20) levando a formação de tetraterpenos (C40) tais como carotenoides, que são pigmentos intimamente ligados aos processos fotossintéticos (caroteno, licopeno), e xantofilas (luteína, xantinas). A estrutura básica acíclica C40 pode ser modificada por hidrogenação, desidrogenação, ciclização ou oxidação. (OLIVER; PALOU, 2000). Existe ainda um grupo complexo de terpenos cujas moléculas são resultantes da síntese de mais de oito unidades de isoprenoides e contém mais de 40 carbonos na sua estrutura, sendo chamados politerpenoides, grupo que contém compostos como ubiquinonas, poliprenoides e polímeros longos localizados, por exemplo, no látex (CROTEAU et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2003).

Figura 13 - Resumo da biossíntese dos terpenoides



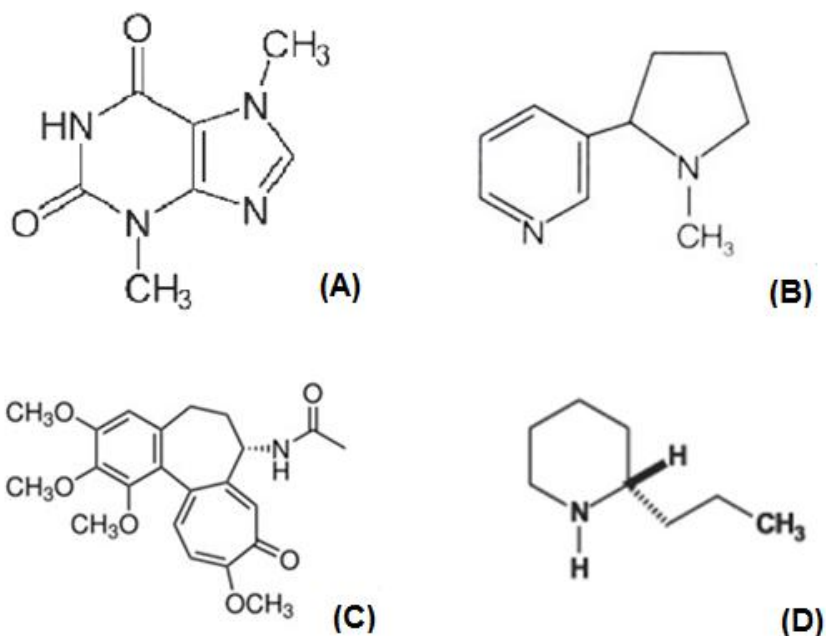
Fonte: Adaptado de Simões et al., (2010).

2.5.2.2 Alcaloides

Os alcaloides são provenientes de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico e de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina) (ALVES, 2001; PERES, 2004). São compostos nitrogenados na maioria das vezes farmacologicamente ativo, encontrados predominantemente nas

angiospermas (HENRIQUES et al., 2004). Basicamente são constituídos por um átomo de nitrogênio, oriundos dos aminoácidos e um anel heterocíclico. Podem ser classificados em alcaloides verdadeiros quando são formados pelo átomo de nitrogênio pertencente ao anel heterocíclico, protoalcaloides são aqueles onde o nitrogênio não pertence ao anel heterocíclico, e os pseudoalcaloides são aqueles que apresentam todas as características dos alcaloides verdadeiros, mas não são derivados dos aminoácidos, mas sim de outras substâncias como os terpenos e esteroides (Figura 14) (HENRIQUES et al., 2004; SIMÕES, 2010).

Figura 14 - Exemplo dos tipos de alcaloides; (A) Estrutura química de um alcaloide (Teobromina); (B) Alcaloide verdadeiro (Nicotina); (C) Protoalcaloide (Colchicina) e (D) Pseudoalcaloide (coniina)



Fonte: Altimari et al., (2006); Gobbo-Neto, (2007); Sertox, (2017).

Quase a totalidade dos alcaloides é derivada de aminoácidos e sintetizada a partir das vias do piruvato e chiquimato. Foram isolados e identificados mais de 12.000 representantes dessa classe, como por exemplo, a morfina, um dos alcalóides mais empregados pelo homem no alívio de dores e desconfortos intensos (VISOTTO et al., 2015).

Apesar da existência de algumas características em comum, particularidades da bioquímica, biologia celular e molecular comprovam as diferenças entre as subclasses de alcaloides. As reações envolvidas na biossíntese dos alcaloides são catalisadas por enzimas estereoespecíficas (formação de somente um isômero, em

detrimento de outro arranjo espacial), regioespecíficas (formação de somente um de dois produtos possíveis), com ação determinada sobre substratos específicos. Os principais aminoácidos envolvidos nestes processos são lisina, ornitina e triptofano. Sozinhos ou combinados com moléculas de secoiridoide, esteroide ou terpenoide, permitem a formação de diversas classes de alcaloides, algumas citadas na Tabela 3 (FACCHINI; DE LUCA, 1998; YANG; STÖCKIGT, 2010).

Tabela 3 - Principais classes de alcaloides sintetizados pelas plantas

Classe	Aminoácido precursor	Exemplos
Piperidínicos	Lisina	Coniina, cassina, espectralina.
Indólicos	Triptofano	Quinina, vimblastina, vincristina.
Isoquinolínicos	Tirosina	Morfina, codeína, mescalina.
Tropânicos	Ornitina	Atropina, hioscina, escopolamina.
Pirrolidínicos	Ornitina	Nicotina, higrina

Fonte: Adaptado de Facchini; DE Luca, (1998).

Os alcaloides são encontrados em diversas partes de um vegetal, como tecidos com crescimento ativo, células epidérmicas e hipodérmicas, bainhas vasculares e vasos lactíferos. Constituem-se num vasto grupo de metabólitos com uma grande diversidade estrutural representando cerca de 20% das substâncias naturais descritas. Devido a essa heterogeneidade química e ao seu grande potencial bioativo, pesquisadores passaram a ter grandes interesses nesses metabólitos (SIMÕES et al., 2010). Muitos desses compostos possuem acentuado efeito no sistema nervoso, como a cafeína, nicotina, cocaína e a morfina, outros são utilizados como venenos ou alucinógenos. Nas plantas, a função principal é a defesa contra animais e insetos devido a sua toxicidade ou ao fato de possuírem gosto amargo (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010; PERES, 2017).

2.5.2.3 Compostos Fenólicos

Compostos fenólicos são biossintetizados nas plantas por meio da rota do ácido chiquímico e do ácido mevalônico e desempenham um importante papel na natureza, auxiliando na maturação dos frutos, na proteção contra organismos patógenos (bactérias e insetos), regeneração do vegetal e radiação ultravioleta. Diversas são as formas antioxidantes que os compostos fenólicos podem atuar, entre elas estão agentes redutores, sequestrantes de radicais livres, quelantes de metais de transição, como o Fe^{2+} e o Cu^{+} , e desativadores do oxigênio singlete (NACZK; SHAHIDI, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2009; PAZ et al., 2015)

Os compostos fenólicos fazem parte de uma classe de compostos de grande diversidade de estruturas, simples e complexas, que possuem pelo menos um anel aromático onde ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (-OH) (BRAVO, 1998; SIMÕES et al., 2010). Sua estrutura pode variar desde moléculas simples a moléculas com alto grau de polimerização (BALASUNDRAM; SUNDARAM; SAMMAN, 2006), estando presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (BRAVO, 1998). Esses metabólitos estão distribuídos nas plantas de forma desuniforme, onde compostos fenólicos hidrofílicos são armazenados nos vacúolos, enquanto que os lipofílicos são armazenados em canais de resina, laticíferos, tricomas, células de óleo, ou na cutícula (WINCK, 2010).

Os compostos fenólicos podem ser classificados de acordo com sua origem, função, efeito e estrutura. Na classificação com base na estrutura, são divididos em: fenóis simples, compostos que possuem apenas um anel aromático ligado a um ou mais grupamentos hidroxílicos ou polifenóis, os quais possuem mais de um anel aromático (SILVA et al., 2007; PEREIRA et al., 2009). Esses fenóis podem ser divididos em várias classes de acordo com o tipo e número de anéis fenólicos, e em subclasses de acordo com as substituições específicas na estrutura básica, associações com carboidratos e formas polimerizadas (Tabela 4) (FARAH; DONANGELO, 2006; D'ARCHIVIO et al., 2010; SIMÕES et al., 2010).

Os principais grupos de compostos fenólicos são: ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzóicos e ácidos hidroxicinâmicos), flavonoides (flavonois, flavanonas,

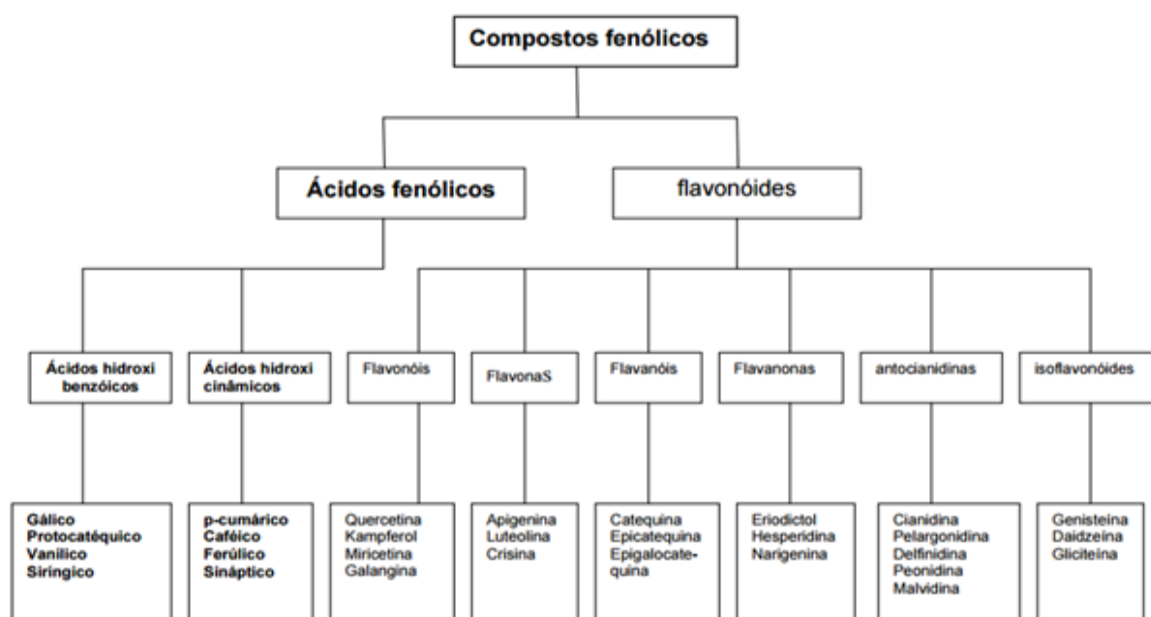
isoflavonas, flavanois, flavonas e antocianidinas), estilbenos, ligninas e taninos (Figura 15). A variedade desses compostos é devido ao extenso número de grupos funcionais que podem ser ligados à cadeia principal (D'ARCHIVIO et al., 2010).

Tabela 4 - Classe de compostos fenólicos em plantas

Classe	Estrutura
Fenólicos simples, benzoquinonas.	C_6
Ácidos hidroxibenzoico	$C_6 - C_1$
Acetofenol, ácidos fenilacéticos	$C_6 - C_2$
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanoides.	$C_6 - C_3$
Nafitoquinonas	$C_6 - C_4$
Xantonas	$C_6 - C_1 - C_6$
Estilbenos, antoquinonas	$C_6 - C_2 - C_6$
Flavonoides, isoflavonoides	$C_6 - C_3 - C_6$
Lignanas, neolignanas	$(C_6 - C_3)_2$
Biflavonoides	$(C_6 - C_3 - C_6)_2$
Ligninas	$(C_6 - C_3)_n$
Taninos condensados	$(C_6 - C_3 - C_6)_N$

Fonte: Simões et al., (2010).

Figura 15 - Principais grupos de compostos fenólicos e suas variedades



Fonte: Karakaya, (2004).

2.5.2.3.1 Ácidos Fenólicos

Os ácidos fenólicos, também conhecido como não flavonoides caracterizam-se por terem em sua estrutura o anel aromático um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula. Em função do número de anéis fenólicos que possuam e dos elementos estruturais que se ligam a esses anéis e entre eles, podem ser divididos em dois grupos principais o dos ácidos hidroxibenzoicos, com sete átomos de carbono (C6–C1), e os ácidos hidroxicinâmicos, compostos aromáticos com nove átomos de carbono (C6-C3), ambos derivados de ácidos não fenólicos: benzóico e cinâmico, respectivamente (Figura 16) (ÂNGELO; JORGE, 2007; GIADA, 2013; HELENO et al., 2015).

Figura 16 - Estrutura química dos ácidos hidroxibenzoicos (A) e hidroxicinâmicos (B)

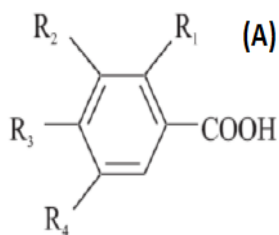


Fonte: Ângelo e Jorge (2007).

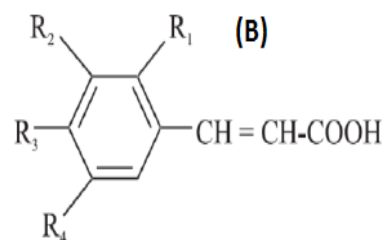
Os ácidos hidroxibenzoicos são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza sendo os principais: gálico, p-hidroxibenzoico, protocatequínico, vanílico, sirínico, gentísico e salicílico. Entre os ácidos hidroxicinâmicos mais comuns na natureza são: p-cumárico, ferúlico, caféico e sinápico (GIADA, 2013). Esses ácidos e seus derivados estão largamente distribuídos em vegetais comestíveis (frutas, hortaliças e grãos) de forma não homogênea e nas diversas estruturas das plantas como sementes, raízes, caules e folhas. Pequenas frações desses ácidos se encontram na forma livre, mas normalmente estes estão ligados na forma de éster, éter e acetal a polifenóis (flavonoides) ou a estruturas insolúveis mais complexas (SANDHAR et al., 2011; ACOSTA-ESTRADA et al., 2014). A estrutura química dos principais ácidos benzoicos e cinâmicos podem ser observadas na Figura 17.

Nos vegetais, estes ácidos são importantes ao desempenho de diversas funções, estão associados às propriedades sensoriais de cor (absorção de nutrientes, atividade enzimática e fotossíntese), flavor, adstringência, à síntese de proteínas, de componentes estruturais, atividade enzimáticas, fotossíntese, alelopatia e na captação de nutrientes (qualidade nutricional) (MATTILA; KUMPULAINEN, 2002; ROBBINS, 2003). O consumo de alimentos ricos nestas substâncias tem agregado função antioxidante, prevenindo o surgimento de doenças crônico-degenerativas. (YANG et al., 2012; DU et al., 2013; KILCI; GOCMEN, 2014; ZHANG et al., 2014).

Figura 17 - Estrutura dos ácidos Benzóicos (A); Cinâmicos(B) e seus derivados



Ácido salicílico: $R_1 = \text{OH}$; $R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$
 Ácido gentísico: $R_1 = R_4 = \text{OH}$; $R_2 = R_3 = \text{H}$
 Ácido *p*-hidroxibenzoico: $R_1 = R_2 = R_4 = \text{H}$; $R_3 = \text{OH}$
 Ácido protocatequínico: $R_1 = R_4 = \text{H}$; $R_2 = R_3 = \text{OH}$
 Ácido vanílico: $R_1 = R_4 = \text{H}$; $R_2 = \text{OCH}_3$; $R_3 = \text{OH}$
 Ácido gálico: $R_1 = \text{H}$; $R_2 = R_3 = R_4 = \text{OH}$
 Ácido siringico: $R_1 = \text{H}$; $R_2 = R_4 = \text{OCH}_3$; $R_3 = \text{OH}$



Ácido cinâmico: $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$
 Ácido *o*-cumárico: $R_1 = \text{OH}$; $R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$
 Ácido *m*-cumárico: $R_1 = R_3 = R_4 = \text{H}$; $R_2 = \text{OH}$
 Ácido *p*-cumárico: $R_1 = R_2 = R_4 = \text{H}$; $R_3 = \text{OH}$
 Ácido caféico: $R_1 = R_4 = \text{H}$; $R_2 = R_3 = \text{OH}$
 Ácido ferúlico: $R_1 = R_4 = \text{H}$; $R_2 = \text{OCH}_3$; $R_3 = \text{OH}$
 Ácido sinápico: $R_1 = \text{H}$; $R_2 = R_4 = \text{OCH}_3$; $R_3 = \text{OH}$

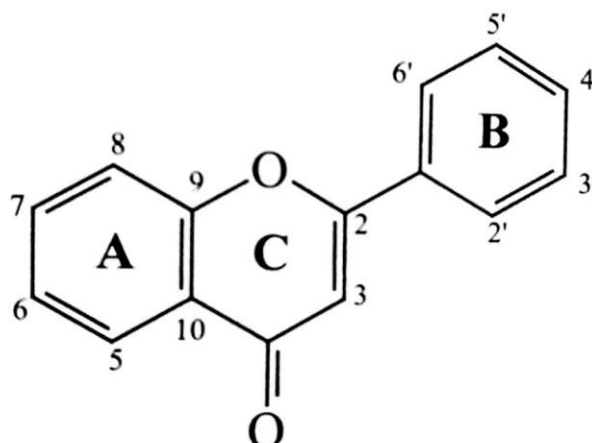
Fonte: Ramalho e Jorge, (2006).

2.5.2.3.2 Flavonoides

Os flavonoides, biossintetizados a partir da via dos fenilpropanoides, constituem um dos grupos fenólicos (classe de polifenóis) mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural, estando amplamente distribuídos no reino Plantae, principalmente entre as angiospermas (SIMÕES et al., 2010). Esses compostos podem apresentar diferentes concentrações, dependendo do órgão vegetal em que se encontram devido à influência de diversos fatores tais como: espécie; variedade; clima; radiação solar; grau de maturação pós-colheita e armazenagem (KYLE; DUTHIE, 2006).

A maioria dos flavonoides possui baixo peso molecular e os esqueletos básicos são formados por substâncias aromáticas com quinze átomos de carbono, na formação C6-C3-C6, que consiste de dois anéis aromáticos (A e B) ligados por três carbonos e um átomo de oxigênio formando um anel heterocíclico oxigenado (C) (Figura 18) (GOUVÊA, 2010; SANDHAR et al., 2011).

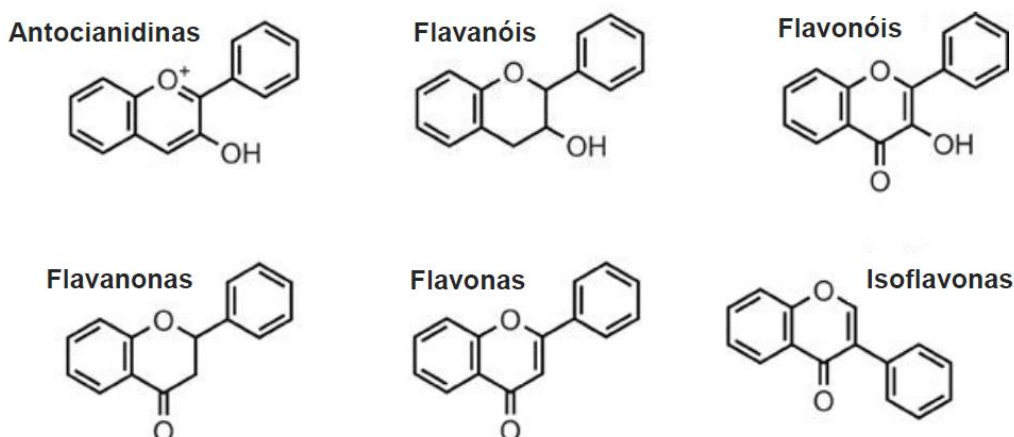
Figura 18 -: Estrutura geral dos flavonoides



Fonte: Simões et al., (2010).

Os flavonoides são oriundos da rota biossintética mista na qual uma parte do esqueleto flavonoídico é derivado do ácido chiquímico e a outra do acetato, via ácido malônico (QUIDEAU et al., 2011). Diversas formas estruturais de flavonoides podem ser encontradas, dependendo do grau de hidrogenação e da substituição do heterociclo, sendo classificados em: flavanóis, flavonas, flavonóis, flavononas, antocianidinas e isoflavonoides (Figura 19). As diferenças individuais presentes em cada grupo são resultado da variação no número e no arranjo dos grupos hidroxilas (OLIVEIRA et al., 2010). As principais classes e características dos flavonoides estão descritas na Tabela 5 (DI CARLO, et al., 1999; YANG *et al.*, 2001; MARCHAND, 2002; BHAGWAT, S., 2011; SANDHAR et al, 2011).

Figura 19 - Estrutura dos principais tipos de flavonoides



Fonte: IGNAT; VOLF; POPA (2011).

Tabela 5 - Principais subclasses e características dos flavonoides

Subclasses de Flavonoides	Ligação do anel B ao anel C	Grupos funcionais no anel C	Exemplos	Presença nos alimentos
Flavonóis	2	3 – Hidroxi 4 – Oxo	Quercetina Mircetina Rutina Campferol	Vegetais, maioria dos frutos.
Flavonas	2	4 – Oxo	Luteolina Apigenina	Especiarias, cereais, frutos.
Flavanonas	2	4 – Oxo	Hesperidina Naringenina	Frutos cítricos.
Flavanas	2	3 – Hidroxi	Catequina Epicatequina Teaflavina	Chás, uvas e vinho tinto.
Isoflavonoides	3	4 – Oxo	Daidzeína Genisteína	Maioria dos legumes, principalmente soja.
Antocianinas	2	3 – Hidroxi	Cianidina Delfinidina Peonidina	Frutos Vermelhos

Os flavonoides de origem natural podem ocorrer na sua forma livre (agliconas ou genina), conjugado com açúcares (glicosidos/heterosidos) ou ainda como derivados metilados (SANDHAR et al., 2011). Quando eles estão na forma conjugada, também conhecida como heterosideo, eles podem ser O-heterosídeos, quando a ligação é por intermédio de uma hidroxila ou C-hetrosídeos, quando a ligação se dá com um átomo de carbono (SIMÕES, 2010).

Nas plantas, diversas funções são atribuídas aos flavonoides. São importantes agentes de defesa contra insetos e micro-organismos fitopatogênicos, atuando como defensores naturais das plantas na forma de resposta química à invasão de patógenos. (ZUANAZZI, 2000; YAO-LAN et al., 2002). Além de proteger os vegetais contra incidências de raios ultravioletas e atrair animais com finalidade de polinização, esses compostos estão associados com a longevidade e redução na

incidência de doenças cardiovasculares, devido suas propriedades benéficas à saúde humana, tais como atividade antioxidante, antiinflamatória, antitumoral, anticoagulante, antiviral, antibacteriana, efeitos no tratamento de doenças neurodegenerativas e ação vasodilatadora (VOLP et al., 2008, SIMÕES, 2010; ASIF; KHODADADI, 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Contribuir com os estudos das plantas da Caatinga em busca de compostos bioativos contra microorganismos fitopatógenos e insetos-pragas de importância agrícola.

3.2 ESPECÍFICOS

- Realizar o screening da atividade antimicrobiana dos extratos aquosos de doze espécies coletadas da região da Caatinga, selecionando aquela(s) que apresentem potencial aplicação;
- Obter extratos com solventes orgânicos de diferentes polaridades (ciclohexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol) a partir de folhas de *A. colubrina* var. *cebil* coletadas nas estações seca e chuvosa;
- Realizar o screening fitoquímico dos extratos orgânicos;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos, através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida/fungicida mínima (CBM/CFM);
- Analisar o extrato mais ativo por cromatografia líquida de alta performance (HPLC);
- Separar o extrato orgânico mais ativo por Cromatografia Flash (Biotage™) e avaliar a atividade antimicrobiana das frações obtidas;
- Analisar e separar por CLAE-Preparativo, a fração ativa obtida pela Cromatografia Flash e avaliar a atividade antibacteriana das subfrações originadas;
- Analisar por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET), células microbianas na presença extrato mais ativo, a fim de observar possíveis alterações;

- Avaliar a toxicidade por ingestão de dieta artificial de *Sitophilus zeamais* sob o efeito dos extratos ativos;
- Determinar o índice de deterrência alimentar para as dietas contendo os extratos CHXd, CHXr, EAd e EAr;
- Calcular os parâmetros nutricionais taxa de crescimento relativo e taxa de consumo relativo de *Sitophilus zeamais* sob o efeito dos extratos em ciclohexano (CHXd/CHXr) e acetato de etila (EAd/EAr) de folhas de *Anadenanthera colubrina*;
- Avaliar o potencial acaricida sobre *Tetranychus urticae* através de efeitos letais do extrato em ciclohexano da estação seca (CHXd) e do extrato em acetato de etila da estação chuvosa (EAr).

4 RESULTADOS

MANUSCRITO PUBLICADO NO PERIÓDICO: AFRICAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY RESEARCH EM MAIO DE 2016

4.1 ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SEVERAL BRAZILIAN MEDICINAL PLANTS AGAINST PHYTOPATHOGENIC BACTERIA

Vol. 10(17), pp. 578-583, 7 May, 2016

DOI: 10.5897/AJMR2014.6999

Article Number: 9EFAF0258262

ISSN 1996-0808

Copyright © 2016

Author(s) retain the copyright of this article

<http://www.academicjournals.org/AJMR>

African Journal of Microbiology Research

Full Length Research Paper

Antimicrobial activity of several Brazilian medicinal plants against phytopathogenic bacteria

Cibele Maria Alves da Silva^{1,2}, Bruna Mirely da Silva Costa¹, Alexandre Gomes da Silva^{3*}, Elineide Barbosa de Souza⁴, Márcia Vanusa da Silva^{3,5}, Maria Tereza dos Santos Correia^{1,3}, da Silva Ana Paula Sant'Anna⁵ and Lima Vera Lúcia de Menezes⁵

¹Laboratório de Química de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, 1235, 50.670-901, Recife - PE, Brazil.

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, 1235, 50.670-901, Recife - PE, Brazil.

³Núcleo de Bioprospecção e Conservação da Caatinga, Instituto Nacional do Semiárido/Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação – INSA/MCTI, Av. Francisco Lopes de Almeida, s/n, 58.429-970, Campina Grande - PB, Brazil.

⁴Departamento de Biologia, Área de Microbiologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife - PE, Brazil.

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

Received 8 July, 2014; Accepted 29 March, 2016

What is currently raised as a new approach in the management of plant diseases is the development and formulation of plant based biopesticides. The objective of present study is to evaluate the antibacterial activity of aqueous extracts of twelve species belonging to seven families collected from the Northeast of Brazil against four economically important phytopathogenic bacteria. Antibacterial activities of the aqueous extracts were studied by minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). Twelve aqueous extracts of twelve species were evaluated. Only three extracts were not active against *Ralstonia solanacearum* and other three extracts were not active against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*, *Croton pedicellatus* and *Eugenia brejoensis* presented a broad spectrum of the inhibitory effect (MIC 3.12 to 12.5 mg/mL). According to these results, we conclude that the flora in the northeast of Brazil can be regarded as a rich source of plants with antibacterial activity. Therefore, further screening of other plant species, identifying active fractions or metabolites and *in vivo* application of active extracts are warranted.

Key words: Caatinga, Atlantic Forest, antibacterial activity, aqueous extract, anti-phytopathogenic activity.

INTRODUCTION

The plant kingdom represents an enormous reservoir of biologically active compounds with various chemical structures and disease preventing properties (Kavitha and Satish, 2013). The use of

plant compounds to treat infection is an ancient practice in a large part of the world, especially in developing countries, where there is dependence on traditional medicine for a variety of diseases

(Gangoue-pieboji et al., 2006). According to World best source to obtain a variety of drugs. In recent years, attention has been given to natural systems of an increasing interest in plant uses and in the detection of their antibacterial activity (Harvey, 2008). Some phytopathogenic bacteria were reported to be severe phytopathogens, causing damage to carrot, potato, tomato, leafy greens, onion, green pepper, squash and other cucurbits. Furthermore, these phytopathogens cause disease in any plant tissue they invade (Ahameethunisa and Hopper, 2010).

Pesticides have been universally considered for long as the most efficient solution to control crop diseases. However, synthetic pesticides may enter the food chain and the resistance developed by plant pathogens has rendered some of them ineffective. This has highlighted the need for the use of alternatives compounds that are environmentally friendly and safe to humans.

There has been a growing interest in the research of the possible use of the plant-derived natural pesticides such as plant extracts, which can be relatively ecofriendly for disease control in agriculture (Choi et al., 2008). Besides, the plants or plant extracts have long been recognized to provide a potential source of chemical compounds or more commonly products known as phytochemicals with potent antifungal efficacy (Choi et al., 2008). Research focused on plant-derived fungicides and their possible applications in agriculture are being intensified as these are having enormous potential to inspire and influence modern agrochemical research (Duke, 1990).

Plant secondary metabolites, such as essential oils and plant extracts are known to possess insecticidal, antifungal, acaricidal, antibacterial and cytotoxic activities (Tepe et al., 2004). Therefore, they have been intensively screened and applied in pharmacology, pharmaceutical botany, medical and clinical microbiology, plant pathology and food preservation (Daferera et al., 2000). Some plant extracts (Davidson et al., 1989) and essential oils (Bakkali et al., 2008) show activity against a wide range of bacteria.

Biopesticides have been suggested as an effective substitute for chemicals (Kapoor, 2001). Reports are available on the use of several plant by-products, which possess antimicrobial properties, on several pathogenic bacteria and fungi (Bylka et al., 2004; Kilani, 2006). Here, we evaluate the potential of several plant extracts for antibacterial activity against important phytopathogenic bacteria.

Brazil is a country rich in biodiversity. To date, 44,813 species are recognized for Brazilian flora: 4,594 algae, 32,391 angiosperms, 1,529 bryophytes, 5,028 fungi, 30 gymnosperms and 1,241 ferns and lycophytes. Brazil is a country rich in biodiversity. To date, 46,096 species are recognized for Brazilian

Health Organization, medicinal plants would be the treatment for protection and management against pathogens. Already for some decades there has been flora: 4,747 algae, 32,817 angiosperms, 1,525 bryophytes, 5,711 fungi, 30 gymnosperms and 1,266 ferns and lycophytes (Brazilian Flora, 2016). The aim of this work was to investigate the antibacterial activity of twelve species belonging to seven botanical families, collected at Parque Nacional do Catimbau (PNC) and Reserva de Floresta Urbana Mata de Camaçari (RFUMC), located in the Northeastern Brazil (State of Pernambuco, Brazil) against phytopathogenic bacteria.

MATERIALS AND METHODS

Collection of plant material

Twelve species of plant, belonging to seven families, were collected from the various phytophysiology at the PNC and RFUMC in Northeastern Brazil (Pernambuco, Brazil) (Table 1). The species were collected based on their popular use by the local community, giving priority to species that had reproductive organs to facilitate their identification. As a part of a wider screening program, plants were randomly collected to increase the chance of finding plants with bioactive extracts. The plants were identified at the Herbarium from Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) and the scientific names were checked in the International Plant Names Index (<http://www.ipni.org/ipni/plantnamesearchpage.do>) and Brazilian Flora Checklist (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/ConsultaPublicaUC.do>). Each collected plant sample was oven dried at 45°C with forced air for 72 h. The dry materials were ground to a fine powder.

Preparation of aqueous plant extracts

Extracts were prepared from dried plants' parts according to methods described by Azmir et al. (2013). The powdered plant materials were extracted at room temperature using water by maceration successively. Aqueous extraction was achieved by adding 100 ml distilled water to 10 g of plant powder and boiled for 72 h. The extract was then lyophilized. A sample of extract at 100 mg/mL was bioassayed, as described in bioassay section.

Test microorganisms

Plant pathogenic bacteria such as *Acidovorax citrulli*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Ralstonia solanacearum* and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* were sampled from the culture collection of Departamento de genômica, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brazil. All the tested bacterial species were maintained on nutrient agar media.

Determination of minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations

Micro-dilution susceptibility assay was performed using the Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC)

Table 1 - Plants employed in this study and their ethnobotanical information

Family/Species	Voucher	Common name	Distribution	Traditional uses of plants
Anacardiaceae				
<i>Anacardium humile</i> A.St.-Hil.	IPA 84049	Caju do sertão	Atlantic Forest, Caatinga and Cerrado	The fruit in nature are used as food against anemia and as tonic. The juice of pseudo fruit is indicated against anemia and diabetes (Agra et al., 2007, 2008). The external use against burnings and ulcers (Agra et al. 2007, 2008). The decoction of stem-bark is used as bath against vaginal and external ulcers. The internal use is indicated against diarrheas (Agra et al., 2007, 2008). The topical use of resin is indicated against warts coughs and wounds (Agra et al., 2007, 2008)
Apocynaceae				
<i>Allamanda blanchetii</i> A.DC.*	IPA 84112	Quatro-patacas-roxa, leiteiro	Caatinga	The latex is used as laxative, emetic, cathartic and vermifuge. One teaspoon of the latex in a cup of water. It is drunk after meals. It is referred to as poisonous (Agra et al., 2007, 2008)
<i>Aspidosperma pyrifolium</i> Mart.*	IPA 85734	Pereiro	Caatinga and Cerrado	The stem-bark is used against inflammations of urinary tract. A decoction of a teaspoon in a cup of water. It is used as tea until the symptoms disappear. The same recipe as above. It is used in baths. Entire plant is referred as poisonous (Agra et al., 2007, 2008)
Burseraceae				
<i>Commiphora leptophloea</i> (Mart.) J.B.Gillett	IPA 84037	Umburana	Caatinga and Cerrado	The stem-bark is used in treatment of gripes, coughs, bronchitis, treat urinary and liver diseases (Agra et al., 2007, 2008). A decoction of a handful in a liter of water and made with sugar as syrup. A spoonful is drunk 5-6 times a day. The external use against ulcers in washes or baths against vaginal ulcers (Agra et al., 2007, 2008)
Fabaceae				
<i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i> (Griseb.) Altschul*	IPA 84039	Angico, angico de caroço	Caatinga and Cerrado	The stem-bark is used against coughs, whooping coughs and bronchitis. A maceration of a handful in a liter of wine or "cachaça". It is drunk until three times a day until the symptoms disappear (Agra et al., 2007, 2008). The fruits are used as narcotic and poison. In maceration or infusion of a handful in a liter of water. It drunk before sleep (Agra et al., 2007, 2008)
<i>Stryphnodendron pulcherrimum</i> (Willd.) Hochr.	IPA 85968	Barbatimão	Amazonic Forest and Atlantic Forest	The decoction is used against inflammations of uterus and for wash external ulcers (Oral communication)
<i>Crotalaria holosericea</i> Nees & Mart.*		-	Caatinga	Used in agriculture as a green manure. In the dry period is given to cattle as food (Oral communication)
Euphrobiaceae				
<i>Croton pedicellatus</i> Kunth.	IPA 85734	Alecrim	Caatinga and Cerrado	A decoction of leaves is used as antiseptic against dermatitis (Oral communication)
<i>Jatropha mutabilis</i> (Pohl)Baill.Δ	IPA 84054	Pinhão-bravo, pinhão manso	Caatinga and Cerrado	The latex is used to treat snake bites (Agra et al., 2007, 2008)

Table 1. Contd.

Myrtaceae					
<i>Algrizea minor</i> Sobral et al.*	IPA 84346	Murta	Caatinga and Cerrado		Used in folk by practitioners the infusion of the fleshy leaves for the treatment of pain and fever (Oral communication)
<i>Eugenia brejoensis</i> Mazine *	IPA 84033	Cutia	Atlantic Forest		Used in folk by practitioners the infusion of the fleshy leaves for the treatment of pain and fever (Oral communication)
Turneraceae					
<i>Turnera cearensis</i> Urb.*	IPA 85143	-	Atlantic Caatinga	Forest and	Against amenorrhea and dysmenorrheal. A decoction of a handful in a liter of water (Oral communication)

* = Endemic specie of Brazilian flora. Δ = Unknown endemism.

determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) (CLSI, 2009). Bacteria were cultured overnight at 30°C. The test samples of the extracts were dissolved in 10% DMSO. Dilutions were prepared in a 96-well microtiter plates to get final concentrations ranging from 0 to 50 mg/ml. Finally, 20 µl of inoculum (10^6 to 10^7 CFU/ml) was inoculated onto the microplates and the tests were performed in a volume of 200 µl. Plates were incubated at 30°C for 24 h. The standard reference drug, chloramphenicol, was used as a positive control for the tested plant pathogenic bacteria. The lowest concentrations of tested samples, which did not show any visual growth after macroscopic evaluation, were determined as MICs, which were expressed in mg/mL. Using the results of the MIC assay, the concentrations showing complete absence of visual growth of bacteria were identified; 50 µl of each culture broth was transferred to the agar plates and incubated for the specified time and temperature as mentioned above. The complete absence of growth on the agar surface in the lowest concentration of sample was defined as the MBC. Each assay in this experiment was replicated three times.

RESULTS AND DISCUSSION

The minimum inhibitory concentrations (MICs) of 12 aqueous extracts obtained by microdilution

technique against the four phytopathogenic bacteria are shown in Table 2. The antibacterial activity of the aqueous extracts showed varying magnitudes. All four bacterial strains tested were sensitive to all aqueous extracts, with the MIC values ranging from 3.12 to 25 mg/mL. The MIC values of *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*, *Croton pedicellatus* and *Eugenia brejoensis* ranged from 3.12 to 12.5 mg/mL (Table 2). The comparison of MICs and MBCs values allows a better evaluation of antibacterial effect of bioactive compounds. According to Biyiti et al. (2004), a substance is bactericidal when the ratio $MBC/MIC \leq 2$, and bacteriostatic if the ratio $MBC/MIC > 2$. Based on these data, the 12 extracts exert bactericidal effects against all bacteria evaluated.

Phytopathogenic bacterial infections are of great concern in agricultural practices, given that some strains are responsible for severe sickness and losses in appropriate climatic conditions. *Acidovorax*, *Pectobacterium*, *Ralstonia* and *Xanthomonas* are among the main phytopathogenic bacterial genera. Plants and plant products have shown to be useful candidates for prevention and control of phytopathogenic bacteria. Several studies have shown that the crude extracts and purified components of plants possess inhibitory activity against plant pathogenic bacteria (Iwu et al., 1999;

Mohana and Raveesha, 2006; Kumaran and Karunakaran, 2007; Parekh and Chanda, 2007). Plant extracts are rich in many phytochemicals which are the cause of their bioactivities. The mechanism of action of many antimicrobials is complex and may not be the consequence of their action on a single target. In addition, the phenomenon of membrane bleeding has been observed with several antimicrobial agents (Epand et al., 2008). For example, phenolic compounds make their actions through different mechanism, which includes membrane disruption, proteins binding, inhibition of proteins synthesis, enzyme inhibition, production of cell wall complexes, formation of disulfide bridges and intercalation with cell wall and/or DNA, among others (Bozdogan and Appelbaum, 2004). In the same manner, the antimicrobial action of alkaloids could be throughout intercalation with cell wall and/or DNA constituents; while, terpenoids display their action through membrane disruption mechanisms (Cowan, 1999). The antimicrobial activity evaluated in this work could be attributed to the presence of different phytochemicals in variable amounts in plant extracts. The assayed antimicrobial activity from the plant species depends on the botanical species, age, part of the plant studied as well as the solvent used for the extraction procedures (Mahida and Mohan, 2006).

Table 2 - Minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of aqueous extracts of medicinal plants of Caatinga against the growth of plant pathogenic bacteria.

Species	Phytopathogenic bacteria											
	<i>Acidovorax citrulli</i>			<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>			<i>Ralstonia solanacearum</i>			<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>		
	MIC	MBC	MBC/MIC	MIC	MBC	MBC/MIC	MIC	MBC	MBC/MIC	MIC	MBC	MBC/MIC
<i>Algrizea minor</i>	25	50	2	25	50	2	12.5	25	2	-	-	-
<i>Allamanda blanchetii</i>	12.5	12.5	1	12.5	25	2	-	-	-	6.25	6.25	1
<i>Anacardium humile</i>	12.5	12.5	1	12.5	12.5	1	-	-	-	-	-	-
<i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i>	6.25	12.5	2	12.5	12.5	1	3.12	3.12	1	6.25	6.25	1
<i>Aspidosperma pyrifolium</i>	12.5	12.5		25	25	1	12.5	12.5	1	25	25	1
<i>Commiphora leptophloes</i>	12.5	25	2	25	25	1	12.5	12.5	1	-	-	-
<i>Crotaria holosericea</i>	12.5	12.5	1	12.5	25	2	6.25	12.5	2	12.5	25	2
<i>Croton corchoropsis</i>	12.5	12.5	1	25	25	1	3.12	6.25	2	12.5	12.5	1
<i>Eugenia brejoensis</i>	12.5	25	2	12.5	25	2	3.12	6.25	2	6.25	6.25	1
<i>Jatropha mutabilis</i>	12.5	12.5	1	12.5	25	2	-	-	-	12.5	25	2
<i>Stryphnodendron pulcherrimum</i>	12.5	25	2	25	25	1	6.25	6.25	1	6.25	6.25	1
<i>Turnera cearensis</i>	12.5	12.5	1	12.5	12.5	1	6.25	12.5	2	12.5	25	2
Chloramphenicol	0.39	0.39	1	0.39	0.39	1	0.19	0.39	2	0.39	0.39	1

Results indicate the presence of antibacterial compounds in aqueous plant extracts, which was in agreement with the results reported by authors who tested the aqueous plant extracts on different plant pathogens (Bahraminejad et al., 2011, 2012). The broad spectra of the inhibitory effect of *A. colubrina* var. *cebil* indicated that the extract of this species is potent antibacterial plants with possible potential for the control of different bacterial diseases in plants. Therefore, more research on the activity of this plant against the other plant pathogenic bacteria and fungi would be of great value.

All plants used in this study have not been tested before as inhibitor of phytopathogenic bacteria. Therefore, this is a new report. The results of the present investigation are successful in identifying the antibacterial activity of selected medicinal plants which will help in further identifying the nature of the bioactive principle and its solubility, isolation and

characterization of the active principle responsible for the activity.

Field existences of antibiotic resistant phytopathogenic bacteria are increasing in recent years. The World Health Organization (WHO) banned many agriculturally important pesticides due to wide range of toxicity against non-target organisms including humans which are known to cause pollution problem (Barnard et al., 1997). Some of the developing countries are still using these pesticides despite their harmful effects. Exploitation of naturally available chemicals from plants, which retard the reproduction of undesirable microorganism, would be a more realistic and ecological method for plant protection and it will have a prominent role in the development of future commercial pesticides (Verma and Dubey, 1998; Gottlieb et al., 2002). Many reports of antibacterial activity of plants extract against human pathogens and their pharmaceutical application are available

(Cowan, 1999; Gibbons, 2005), but not much has been done on the antibacterial activity of plants extract against plant pathogens (Satish et al., 1999). This is mainly due to lack of information on the screening/evaluation of diverse plants for their antibacterial potential.

Considering the rich diversity of Brazilian flora, it is expected that screening and scientific evaluation of plant extracts for their antimicrobial activity may provide new antimicrobial substances; hence in the present investigation the antibacterial investigation of all plants has been demonstrated for the first time against phytopathogenic bacteria. Thus the present study reveals that *A. colubrina* var. *cebil*, *C. pedicellatus* *E. brejoensis* is a potential

candidate plant that could be successfully exploited for management of the diseases caused by different phytopathogens which are known to cause many diseases in wide variety of crops.

causing considerable losses in yield and quality in an eco-friendly way.

These results and the encouraging percentage of plants with antibacterial activity (85% in this research) confirmed that plant extracts originated from Northeast in from Brazil can be used directly to develop new and effective classes of natural bactericide to control severe bacterial diseases. These findings persuaded us to continue screening more plant species.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors have not declared any conflict of interests.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to acknowledge MCT/CNPq and NANOBIOTEC-Brasil from CAPES for financial support. They are very grateful to the curator of the Herbarium IPA, Dra. Rita Pereira, for allowing access to the collection and to the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) for authorizing collections in PNC (Sisbio 16.806).

REFERENCES

- Agra MF, Freitas PF, Barbosa-Filho JM (2007). Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev. Bras. Farmacogn.* 17:114-140.
- Agra MF, Silva KN, Basílio IJLD, França PF, Barbosa-Filho JM (2008). Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev. Bras. Farmacogn.* 18:472-508.
- Ahameethunisa AR, Hopper W (2010). Antibacterial activity of *Artemisia nilagirica* leaf extracts against clinical and phytopathogenic bacteria, *BMC Complement. Altern. Med.* 10(6):1-6.
- Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, Jajurul MHA, Ghafoor K, Norulaini NAN, Omar AKM (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials. A review. *J. Food Eng.* 117:426-436.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M (2008). Biological effects of essential oils. *Rev. Food Chem. Toxicol.* 46(2):446-475.
- Bahraminejad S, Abbasi S, Fazlali M (2011). In vitro antifungal activity of 63 Iranian plant species against three different plant pathogenic fungi. *Afr J Biotechnol* 10(72):16193-16201.
- Bahraminejad S, Abbasi S, Maassoumi SM, Tabein S (2012). Evaluation of inhibitory effects of extracts of plants from western Iran against *Phytophthora drechsleri*. *Aust. J. Crop Sci.* 6(2):255-260.
- Barnard C, Padgett M, Uri ND (1997). Pesticide use and its measurement. *Int. Pest Control* 39:161-164.
- Biyiti LF, Meko DJL, AmvamZollo PH (2004). Recherche de l'activité antibactérienne de quatre plantes médicinales Camerounaises. *Pharmacologie et Medecine Traditionnelle en Afrique* 13:11-20.
- Bozdoğan B, Appelbaum PC (2004). Oxazolidinones: activity, mode of action, and mechanism of resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents* 23:113-119.
- Brazilian Flora (2016). Rio de Janeiro Botanical Garden. Available in: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Access on: 20 Abr. 2016.
- Bylka W, Szafer-Hajdrych M, Matalawska I, Goslinka O (2004). Antimicrobial activity of isocytiside and extracts of *Aquilegia vulgaris* L. *Lett. Appl. Microbiol.* 39:93-97.
- Choi NH, Choi GJ, Jang KS, Choi YH, Lee SO, Choi JE, Kim JC (2008). Antifungal activity of the methanol extract of *Myristica malabarica* fruit rinds and the active ingredients malabaricones against phytopathogenic fungi. *Plant. Pathol. J.* 24:317-321.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. In: Approved Standard, 8th ed. CLSI Publication M07-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Cowan MM (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:564-582.
- Daferera DJ, Ziogas BN, Polissiou MG (2000). Analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *J. Agric. Food Chem.* 48:2576-2581.
- Davidson PM, Parish ME (1989). Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technol-Chicago.* 43:148-155.
- Duke SO (1990). Natural pesticides from plants. In: Nanick J, Simon JE *Advances in new crops*. Timber Press, Portland. USA. pp. 511-517.
- Epand RM, Epand RF, Savage PB (2008). Ceragenins (cationic steroid compounds), a novel class of antimicrobial agents. *Drug News Perspect.* 21:307-311.
- Gangoue-pieboji J, Pegnyemb DE, Niyitegeka D (2006). The *in-vitro* antimicrobial activities of some medicinal plants from Cameroon. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 100:273-243.
- Gibbons, S. (2005). Plants as a source of bacterial resistance modulators and anti-infective agents. *Phytochemistry* 4:63-78.
- Gottlieb, O.R., Borin, M.R. and Brito, N.R. (2002). Integration of ethnobotany and phytochemistry: dream or reality? *Phytochemistry* 60:145-152.
- Harvey AL (2008). Natural products in drug discovery. *Drug Discov. Today.* 13(19-20):894-901.
- Iwu MM, Duncan AR, Okunji CO (1999). New antimicrobials of plant origin. In: J. Janick (Ed.), *Prospective on New Crops and New Uses*, (pp 457-462), ASHS Press, Alexandria, VA.
- Kapoor A (2001). Neem: The wonder plant. *Pesticides Information.* 27:33-34.
- Kavitha KS, Satish S (2013). Antibacterial activity of *Callistemon lanceolatus* DC. Against human and phytopathogenic bacteria. *J. Pharm. Res.* 7:235-240.
- Kilani AM (2006). Antibacterial assessment of whole stem bark of *Vitex doniana* against some Enterobacteriaceae. *Afr. J. Biotechnol.* 5:958-959.
- Kumaran A, Karunakaran RJ (2007). *In vitro* antioxidant activities of methanol extracts of *Phyllanthus* species from India. *Lebens-Wiss Technologie* 40:344-352.
- Mahida Y, Mohan JSS (2006). Screening of Indian plant extracts for antibacterial activity. *Pharm. Biol.* 44:627-631.
- Mohana DC, Raveesha KA (2006). Anti-bacterial activity of *Caesalpinia coriaria* (Jacq.) Willd. against plant pathogenic *Xanthomonas* pathogens: an eco-friendly approach. *J. Agric. Technol.* 2:317-327.
- Parekh J, Chanda S (2007). Antibacterial and phytochemical studies on twelve species of Indian medicinal plants. *Afr. J. Biomed. Res.* 10:175-181.
- Satish S, Raveesha KA, Janardhana GR (1999). Antibacterial activity of plant extracts on phytopathogenic *Xanthomonas campestris* pathovar. *Lett. Appl. Microbiol.* 28:145-147.
- Tepe B, Donmez E, Unlu M, Candan F, Daferera D, Vardar-Unlu G (2004). Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). *Food Chem.* 84:519-525.
- Verma J, Dubey NK (1998). Prospectives of botanical and microbial products as pesticides of tomorrow. *Curr. Sci.* 76:172-179.

Manuscrito a ser submetido no Periódico: Journal of Applied Microbiology.

4.2 ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF *ANADENANTHERA COLUBRINA* VAR. *CEBIL* EXTRACTS AGAINST PHYTOPATHOGENIC BACTERIA AND FUNGI

Cibele Maria Alves da Silva Bessa^a, Carolina Barbosa Malafaia^{b*}, Paula Fernanda Figueiredo das Mercês^a, Daniel Rodrigo de Araújo Cavalcanti^a, Bárbara de Azevedo Ramos^a, Clovis Macêdo Bezerra Filho^a, Priscilla Barbosa Sales de Albuquerque^b, Elineide Barbosa de Souza^c, Márcia Vanusa da Silva^a, Maria Tereza dos Santos Correia^a, Maria Luiza Vilela Oliva^d

^aDepartamento de Bioquímica, Laboratório de Produtos Naturais, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil.

^bLaboratório de Bioprocessos, Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE, Av. Professor Luiz Freire, n 01, Cidade Universitária, 50740-540, Recife, Pernambuco, Brasil.

^cDepartamento de Agronomia, Laboratório de Fitobacteriologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

^dDepartamento de Bioquímica – Universidade federal de São Paulo, Rua 3 de Maio, n 100, 04021-001, São Paulo, São Paulo, Brasil.

Corresponding author: cibealeaves2@gmail.com (CMAS, Bessa), Avenida Av. Professor Luiz Freire, 01, Cidade Universitária, 50740-540, Recife, Pernambuco, Brasil. Tel/fax: +55 (081) 21268541

Running head: *Anadenanthera colubrina* extract impairs bacterial and fungal activity

Abstract

Aims

To evaluate the antibacterial and antifungal activity of the organic extracts of leaves from *Anadenanthera colubrina* var. collected in the Catimbau Valley National Park during the dry and rainy seasons. In addition to isolating the major compound of interest and observing its biological potential

Methods and Results

Extracts from leaf extracts were obtained in Soxhlet apparatus following an elutropic series using cyclohexane (CHX), chloroform (CF), ethyl acetate (EA) and methanol (MET). Phytochemical analysis by Thin Layer Chromatography (TLC) revealed the presence of terpenes, Flavanoids, triterpenes, tannins, coumarins and reducing sugars. The antimicrobial activity was carried out using the broth microdilution method to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal/fungicidal concentration (MBC/MFC). It was used six phytopathogenic bacteria: *Acidovorax citrulli* (Acc), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc), *Ralstonia solanacearum* (Rsol), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), *X. campestris* pv. *malvacearum* (Xcm) and *X. campestris* pv. *viticola* (Xcv) and six phytopathogenic fungi: *Aspergillus flavus* (Af), *Fusarium moniliforme* (Fm), *F. oxysporum* (Fo), *F. solani* (Fs), *Rhizopus sotolonifer* (Rs) and *Verticillium lecanii* (Vl) against economically important phytopathogens. All organic extracts were active against all evaluated bacteria and fungi. The extract of CHX from the dry season presented of the MIC ranging from 0.78 to 6.25 mg/mL and MBC ranging from 1.56 to 6.25 mg/mL, in the rainy season, the ethyl acetate extract (EAr) presented lower MIC values (0.78 - 3.12 mg/mL) and MBC (1.56 to 3.12 mg/mL) compared to other extracts for the bacteria tested. All extracts presented fungal activity with MIC ranging from 6.25 to 50 mg/mL. Although EA and CHX extracts presented significant antibacterial activity, only the EA extract followed for HPLC analysis due to the higher content of phenolic compounds visualized and their compatibility with the C18 chromatographic column. The major compound present in the EA rainy season EA was isolated and showed MBC 0.5 mg/mL for Xcc and MIC 0.5 mg/ml for Ac, thus increasing the antimicrobial activity and could be used as a

natural bactericide. In addition, *Xcc* treated with extracts of CHX from the dry season was observed by scanning and transmission electron microscopy and loss of cell viability and death due to the formation of intracellular vacuoles was observed.

Conclusions

In this work, it was possible to reveal that the rainfall levels have influence on the antimicrobial activity and chemical diversity of leaves of *A. colubrina* and isolated phenolic compounds present in this plant increase the activity against phytopathogenic microorganisms of agricultural importance.

Keywords: *Anadenanthera colubrina*; antibacterial activity; antifungal activity; Phenolic compounds.

1 Introduction

A major problem in the loss of productivity of crops has been a high incidence of plant diseases caused by various pathogenic organisms such as viruses, bacteria, fungi, protozoa, nematodes and plant parasites (Kotan *et al.*, 2010). The most common method of control used for these pathogens is the use of pesticides, however the indiscriminate application of these chemicals has been causing problems primarily related to damage to human health and animals, in addition to environmental contamination accumulation (Pandy 2003; Kumar *et al.*, 2007).

In order to minimize the impact caused by pesticides use and reduce the impact of microorganisms in agriculture, alternative methods of biological control have been adopted, such as the use of plant extracts that have been deemed safe to health and the environment, as well as economically advantageous due to the low cost (Mazzonetto and Vendramim 2003; Kim *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2010). Plants secondary metabolites are natural sources of substances with antimicrobial properties and cytotoxic insecticide, which can be used as an alternative to replacement of synthetic ones (Venturoso *et al.*, 2011). They also reduce the possibility of causing microbial resistance, because they are complex mixtures, making the adaptation of microorganisms (Tintino *et al.*, 2015).

Caatinga region has a great biodiversity and represents an exclusive Brazilian ecosystem, with several studies involving antimicrobials (Silva *et al.*, 2013), thus demonstrating potential for research in order to develop naturally occurring pesticides, specially Fabaceae family species (Júnior *et al.*, 2014). Studies of various plant species extracts, including species of this family, shown potential toxicity to insects, ranging from changes in eating behavior until the death of the same (Govindarajan 2009; Lombardo *et al.*, 2009; Vinayaka *et al.*, 2009; Chukwuemeka and Anthonia 2010). Other studies have provided a number of metabolites that demonstrate an antimicrobial effect against various fungal diseases of fruit (Baños *et al.*, 2002; Barrera-Necha *et al.*, 2003; Barrera-Necha *et al.*, 2004; Baños *et al.*, 2008). *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb.) Altschul, popularly known as mimosa, representative of the Fabaceae family, is related to the antimicrobial properties of its leaves, being very well used in folk medicine (Palmeira *et al.*, 2010).

The screening of antimicrobial activity of aqueous extracts of Caatinga plants studied by Silva *et al.*, 2016 indicate that *A. colubrina* var. *cebil* has potential as an alternative to fight plant pathogens, especially for biotech advancement and the development of new management systems and applications in various industries to agriculture and environment. Therefore, the objective of this study was to investigate the efficacy of different organic extracts of *A. columbrina* var. *cebil* leaves against bacteria and pathogenic fungi, as well as then observe morphological changes by scanning electron microscopy and transmission, in addition to identify the class of bioactive compounds of these plant extracts.

2 Materials and methods

2.1 Collection of plant materials

Leaves of *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*, free from diseases, were collected at Catimbau National Park, Northeastern of Brazil, in January and June (dry season and rainy season, respectively). A voucher specimen was deposited in the Herbarium of the Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA). Collected leaves were oven dried at 45°C with forced air for 72h. Dry materials were ground to a fine powder. The plant powder was stored in air tight container and maintained at 4°C until use.

2.2 Organic extracts

A. colubrina var. *cebil* leaves was subjected to Soxhlet extraction in eluotropic series using the following solvents: cyclohexane (CHX), chloroform (CF), ethyl acetate (EA) and methanol (MET). Hundred grams from powdered samples were packed in muslin cloth and used for extraction in Soxhlet apparatus at temperature below boiling temperature in solvents. All samples were refluxed until saturation for 24h. Then, the extracts were filtered using Whatman filter paper No: 1. In all cases, solvents were pulled out and organic extracts were separately concentrated to dryness in a rotary evaporator at 45°C under reduced pressure and were stored at room temperature. All the extracts was stored at 4°C to fruther activity study.

2.3 Test microorganisms

The organic extracts were tested against 12 phytopatogens, being six of bacteria and six fungi. The phyto bacteria *Acidovorax citrulli* (Aac), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc), *Ralstonia solanacearum* (Rsol),

Xanthomonas campestris pv. *campestris* (Xcc), *X. campestris* pv. *malvacearum* (Xcm) and *X. campestris* pv. *viticola* (Xcv) were obtained by the Culture Collection of the Phytobacteriology Laboratory of the Agronomic Department of the Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Brazil, and were grown in nutrient yeast dextrose medium - NYDA (5 g/L yeast extract; 3 g/L meat extract; 5 g/L peptone; 10 g/L dextrose; 18 g/L agar) during 24h, at 30 °C. The phytofungi *Aspergillus flavus* (Af), *Fusarium moniliforme* (Fm), *F. oxysporum* (Fo), *F. solani* (Fs), *Rhizopus sotoionifer* (Rs) and *Verticillium lecanii* (Vl), were obtained from mycology collection of Micoteca-URM of the Mycology Department of the Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brazil, and were grown in Potato Dextrose Agar medium - PDA (4 g/L potato extract; 15 g/L dextrose; 18 g/L agar) during 48h, at 30 °C.

2.4 Phytochemical screening

Organic extracts were evaluated by the presence of major secondary metabolites: alkaloids, coumarins, anthracenic derivatives, derivatives of cinnamic acid, flavonoids, hydrolysable tannins, catechin tannins, triterpenoids and reducing sugars, performed by thin layer chromatography using a silica gel plate (Merck), employing various mobile phases and specific developers as described in table 1.

(insert table 1)

2.5 Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentrations (MBC)

Susceptibility MIC and MBC assay concentrations were determined by the broth microdilution method (CLSI, 2014) with modifications. Bacteria were cultured at 30°C for 24h. Tested samples were dissolved in dimethylsulfoxide (10%v/v) and then autoclaved distilled water was added, until a final volume of 1 mL. The extract was sterilized by filtration using 0.22 µm micro filter (Type GV- Millipore). Hundred microlitres medium-NYD was added in all 96 wells. Then 100µL of the extracts was

deposited only on the third row of the microplates and a serial dilution was proceeded. Final concentrations ranged from 0.195 to 50 mg/mL for EAR extract; 5.8 to 0.022 mg/mL for Flash Chromatography fractions and 0.5 to 0.001 mg/mL for the interesting purified compound. Finally, 15 μ L of the inoculum ($OD_{600} = 0.15 \pm 0.05$) was placed in the microplates and then incubated at 30°C for 24 h. Plates were readed at 600 nm before and after incubation time. After incubate period 30 μ L of the solution from each inhibited well was collected and transferred to NYD-agar plates and re-incubated as described above para comprovar se houve crescimento bacteriano. The complete absence of growth on the agar surface with the lowest concentration of the sample was defined as the MBC. Chloramphenicol, was used as a positive control for the tested plant pathogenic bacteria and sterile DMSO aqueous solution (10%) was used as negative control. Each assay in this experiment was replicated three times.

2.6 Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC)

For the determination of the MIC and MFC the broth microdilution method was used (CLSI, 2014) with modifications, as described in item 2.5. The isolates were grown in Potato Dextrose Agar medium – PDA, at 30°C. Tested microorganisms were standardized by the Mcfarland turbidity corresponding to a concentration of approximately 4×10^3 a 5×10^4 UFC/mL. Cercobin was used as positive control and sterile DMSO aqueous solution (10%) was used as negative control. The microplates were incubated for 48 h at 30°C and all experiments were done in triplicate.

2.7 Electron microscopy

The sample which showed the best activity was subjected to analysis by SEM and TEM. *X. campestris* pv. *campestris* cells after incubation (6 h at 30°C) were fixed (2.5% glutaraldehyde; 4% paraformaldehyde in 0.1 mol/L phosphate buffer, pH 7.2),

pos-fixed (1% osmium tetroxide; 0.8% potassium ferricyanide; 5 mmol/L CaCl_2 in 0.1 mmol/L cacodylate buffer), dehydrated (graded acetone series) and embedded using an epoxy-embedding medium kit (Fluka, Switzerland). Ultrathin sections were stained with lead citrate and uranyl acetate and observed by TEM. For SEM, bacterial cells were processed as describe above and allowed to adhere onto a poly-L-lysine-coated coverslip for 5 min at room temperature. The cells were dehydrated (graded acetone), critical-point dried, attached to aluminum mounting stubs, sputter coated with 20 nmol/L gold and imaged with a Quanta 200 F (FEI company).

2.8 Fractionation

Ethyl acetate from rainy season (EAr) was fractionated through the equipment Biotage Isolera One™ (Flash Chromatography). A Biotage® SNAP Column KP-SIL 50g was used with a mobile phase gradient n-hexane-EtOAc, 30:70, v / v (1 CV); N-hexane-EtOAc, 30:70 to 0: 100, v / v (6 hr); MeOH-EtOAc, 0: 100 to 20:80 v / v (6 hr); MeOH-EtOAc, 20:80 to 80:20 v / v (3 CV). The mobile phase was 70ml/min having a maximum volume of 18ml per tube. The solvents used were Hexane, Ethyl Acetate and Methanol. Equipment worked in 200-800 nm. We obtained 38 fractions that were grouped into 6 final fractions.

2.9 High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis

EA extracts, Flash Chromatography fractions and interesting purified compound were analysed for HPLC (1260 Infinity LC System – DAD, software Agilent OpenLAB CDS (EZChrom Edition), Vers. A.04.05 Agilent Technologies). The samples were dissolved in 100% MeOH and used in 0.22µm membrane, it was obtained 5mg/mL. It was used a Zorbax® (Agilent), SB-C18, 5µm; 4.6 x 250mm com pré coluna Zorbax ® (Agilent) SB-C18 5µm and 4.6 x12.5mm column and solvents werewater (A) e acetonitrila (B) (LiChrosolv®,Merck) and temperature was 30°C.

Chromatography conditions for exploratory analysis followed a linear gradient from 95 (A) to 40(A)%, between to (0-28min), with a flow rate of 2.4 mL/min. The complete scanning detection varied from 190 to 400 nm with a working chromatogram of 256nm. The recorded peaks were integrated by the method: Threshold 3e + 006 (1.5-30min); Width 0.2 (1.5-30 min).

Fractions and purified compounds were compared with commercial standards following a linear gradient from 92 (A) to 65 (A)%, between to 15 min, with a flow rate of 2.4 mL/ min and working chromatogram of 256 nm (Araújo et al 2017) with some modifications. Peaks identified had retention time and ultraviolet spectrum (UV) that was compared with references such as gallic acid, p-coumaric acid, caffeic acid, catechin, trans-ferulic acid, quercetin 3 β D-glucoside, chlorogenic acid, quercetin, rutin and ellagic acid.

2.10 Preparative Analysis

Fraction was analysed by Flash Chromatography and the major compound isolated from AutoPurification HPLC System TM (modelo: 2767 Sample Manager, 2545 Binary Gradient Module, System Fluidics Organizer, 2489 UV/Vis Detector, MassLynx Software with the FractionLynx Application Manager and Detector ACQUITY QDa - Waters). Sample were prepared using final concentration 15mg/mL (MeOH 100%) e em seguidas foram filtradas em membrana 0.22 μ m. The preparative column XBridge Prep C18 5 μ m 10x100mm was used at room temperature (25°C) using as the mobile phase: Water (A) and Acetonitrile (B) (LiChrosolv®, Merck) under chromatographic conditions followed by gradient from 0-9 min (94 - 65% A), 9-10 min (65 - 0% A), 10 - 14 min (0% A), 16 - 20 min (0% - 94%). The wave lenght were 256nm, 500 μ l injection and 9 mL/min flow with 190-400nm scan.

3 Results

After the extraction, the material collected in the dry season obtained 21.97 % of yield, which was higher than that obtained in the rainy season with a yield of 15.71% from the initial dry mass (Table 2). Methanol (MET and chloroform CF) extracts presented the highest and the lowest yield, respectively, in both seasons (Table 2). The phytochemical screening (Table 3) demonstrated that all the tested extracts had flavonoids and reducing sugars. Catechin tannins are present in CHXd and EA, MET extracts in both seasons. According to Paes *et al.*, (2010), the tannins are present in all tissues of *A. colubrina* var. *cebil*, however, they are present in higher amounts in the stem bark, roots and fruit pulp. Triterpenes were detected in the extracts of CHX, CF and EA of both stations, and coumarins only in the cyclohexane extract of the rainy season (CHXr).

The antimicrobial activity of the organic extracts from leaves of *A. colubrina* are presented in Tables 4. Overall, all extracts from leaves exhibited antimicrobial activity with broad spectrum, as they inhibited all tested bacteria. At the dry season, the cyclohexane extract (CHXd) presented lower values and MIC ranging from 0.78 to 6.25 mg/mL and MBC ranging from 1.56 to 6.25 mg/mL. In the rainy season, the ethyl acetate extract (EAr) presented lower MIC values (0.78 - 3.12 mg/mL) and MBC (1.56 to 3.12 mg/mL) compared to other extracts. The CHXd extract showed to be effective against species of the *Xcc*, *Xcv* and *Ac*. The extract EA was more efficient for the bacteria *Ac* and *Xcc*. DMSO did not affect bacterial growth in the highest tested concentration. No significant differences were observed between the results for Chd and EAr extracts. DMSO did not affect bacterial growth in the highest tested concentration. No significant differences were observed between the results for Chd and EAr extracts.

Antifungal activity of extracts against fungi pathogens is shown in Table 5. The cyclohexane extracts from the two stations presented MIC and MFC ranging from 6.25 to 50 mg/mL. All of the extracts from the rainy season presented MIC and CFM for the fungi *A. flavus*, *F. oxysporum* and *R. solanacearum*. Among all the tested fungi, *F. solani* showed higher sensitivity to all extracts of the dry season.

Analysis by thin layer chromatography (TLC) did not show qualitative differences between the dry and rainy periods of the EA extract; due to this fact, EA was submitted to high performance liquid chromatography (HPLC). It was visualized 46 compounds in the extracts referring to the dry period and 41 compounds referring to the rainy season. Six compounds were found to be the main ones in both periods: Rt 4.6min (peak 6), 6.44min (peak 9), 10min (peak 18), 10.2min (peak 19), 10.9min (peak 21), and 15min (peak 34) (± 0.2). CLAE demonstrated that, besides UV absorption, the area of the peaks 9, 18, 19 and 21 increased 11, 3.7, 4 and 1.2% in the rainy season, respectively, indicating that this collection period presents a higher content of these compounds. Compound nº 34 was identified as quercetin because it had the same retention time and UV absorption spectrum. None of the other compounds were identified by the reference standards (caffeic acid, chlorogenic acid, elargic acid, gallic acid, p-coumaric acid, transferulic acid, kaempferol, luteolin, quercetin, quercetin 3- β -D-glucoside, catechin and rutin), however UV absorption spectra indicate that peak 9 is associated to p-hydroxybenzoic compound (Kowalski and Wolski 2003), while the peaks 18, 19 and 21 derived from quercetin (Fig. 1). EA extract was submitted to Flash Chromatography (Biotage™) due to an increase in the area of the peaks; in addition, its six fractions were tested against **Acc** and **Xcc** bacteria. The results demonstrated that only the fractions 3 and 4 were able to inhibit bacterial growth. Fraction 3 was considered more efficient than the others due to the better results for MIC (0.72 and 1.45 mg/mL, respectively for Xcc and Acc) and MBC (1.45 mg/mL for both bacteria) (please see Table 6). In this way fraction 3 was analyzed by CLAE-Preparative, in which it gave rise to six more fractions, these in turn were also tested against the bacteria Acc and Xcc. Only fraction 3 gave result and was shown by HPLC be a pure compound (Fig. 2), and its spectrum indicates that this fraction is the p-hydroxybenzoic acid in which the MIC presented concentration of 0.5 mg/mL for Acc and Xcc and MBC of 0.5 mg/mL for Xcc (Table 7). This compound is shown to be the major in EA extracts and has been screened via its UV absorption spectrum using flash chromatography (Biotage™) and HPLC-Preparative (Autopurification System™).

The transmission electron microscopy (TEM) of *X. campestris* pv. *campestris* cells treated with cyclohexane extract at 1.56 mg/ml concentration showed morphological variations when compared with the untreated cells, which presented

homogeneous cytoplasm, intact cell walls and characteristic morphology, also preserved. Treated cells showed significant morphological variations, besides the appearance of intracellular spaces where the cytoplasm presents voids (Fig. 3). The TEM for untreated samples demonstrated large cell cluster and those with preserved morphology were rod-shaped. Agglomerated bacteria were rarely observed in cultures treated with CHX and atypical morphology was also observed (Fig. 4).

4 DISCUSSION

There are many reports on variations in plant secondary metabolite production according to the environment and plant age, as well as reports about different concentrations of many substances in various plant parts (Campos et al., 2013). Although the yields of extracts from leaves collected in the dry season were higher than those observed obtained in the rainy season, the concentrations of substances in the latter extracts were usually higher. Angico leaves are known to present in their composition flavonoids, which are important agents in plant defense against insects and pathogenic microorganisms such as viruses, bacteria and fungi (Zuanazzi et al., 2000). It was observed in all leaves extracts from angico the presence of these compounds which turn can a great potential to combat these microorganisms. Thus, the presence of these compounds in all extracts of *A. colubrina*, as well as tannins present only in CHXd, EAd and EAr extracts, suggest a potential antimicrobial activity, being the first record for plant pathogens observed in this study. Several authors reported that the antimicrobial activity can be found in vegetables from its rich chemicals, such as tannins, alkaloids, saponins and terpenes (Scalbert 1991; Harborne and Williams 2000; Bylka et al., 2004; Veluri et al., 2004; Kuete et al., 2006). Compounds also found in extracts of *A. colubrina*.

In this study we can observe the potential of the extracts of *Anadenanthera colubrina* collected in different stations against phytopathogenic microorganisms, since there are no reports in the literature about that. In previous studies with extracts from leaves and fruits of *A. colubrina*, it was observed that both extracts presented antimicrobial activity against *Alternaria alternata* (Campos et al., 2013). In other studies, *A. colubrina* showed activity against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* (Barreto et al., 2016), multidrug-resistant strains of *S. aureus* and *Escherichia coli* (Silva et al., 2013), and *Streptococcus mutans*, *S. sanguinis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* (Araújo et al., 2014; Lima et al., 2014). These studies show that extracts of *Anadenanthera colubrina*, which are rich in secondary compounds have a broad antimicrobial potential.

The ethyl acetate extract was submitted to fractionation to isolate the possible active substances and the major phenolic compound was isolated, representing about 48% of the sample. This compound is equivalent to p-hydroxybenzoic because it exhibits the same UV absorption spectrum as the standard exhibited by Kowalski and Wolski (2013). This compound once it was isolated, showed a more efficient. It is already widely known that plant phenolic compounds may have antibacterial properties (Fратиanni et al., 2016). It is possible to consider an antagonistic effect among the substances presented in the fractions, since the compound has been isolated with an increase in its antimicrobial activity.

Regarding microscopy made with *Xanthomonas* cells treated with cyclohexane extract, it was found dead cells with irregular structures and with damaged intracellular spaces. Similar results were observed when extracts from *A. colubrina* were tested against *S. aureus* (Silva et al., 2013).

5 Conclusions

The obtained results demonstrate that the precipitation levels could influence the activities and the chemical diversity of the leaves of *A. colubrina*. The activity of extracts of *A. colubrina* against bacteria and fungi phytopathogenic was confirmed and could be attributed to the main isolated compound, in this case the one responsible for the increase in antimicrobial activity. It can be considered a natural bactericidal compound against several phytopathogens with economic importance.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the agencies and companies in Brazil that have supported this research: Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), for research Grants and NANOBIOTEC-Brasil from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Ministério de Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicações (MCTI), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) and Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). We are very grateful to the curator of the Herbarium IPA for allowing access to the collection and the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) for authorizing collections in PARNA do Catimbau (Sisbio 16.806).

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

6 References

- Araújo, D.R.C., Silva, L.C.N., Silva, A.G., Araújo, J.M., Macêdo, A.J., Correia, M.T.S. and Silva, M.V. (2014) Comparative analysis of anti-*Staphylococcus aureus* action of leaves and fruits of *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschul. *Afr J Microbiol Res*28, 2690-2696.
- Baños, S.B., Necha, L.L.B., Lauzardo, A.N.H., Valle, M.G.V.D., Tejacal, I.A. and Sánchez, D.G. (2008) Powders, extracts and fractions of leaves of *Cestrum nocturnum* L. and their antifungal activity over two isolations of *Fusarium* spp. *Rev UDO Agric*8, 42-51.
- Baños, S.B., Necha, L.L.B., Luna, L.B. and Torres, K.B. (2002) Antifungal activity of leaf and stem extracts from various plant species on the incidence of *Colletotrichum gloeosporioides* of papaya and mango fruit after storage. *Mex J Phytopathol*20, 8-12.
- Barrera-Necha, L.L., Bautista-Baños, S., Bravo-Luna, L., Bermúdez-Torres, K., Jiménez-Estrada, M. and Reyes-Chilpa, R. (2003) Antifungal activity against postharvest fungi by extracts and compounds of *Pithecellobium dulce* seeds (Huamuchil). *Acta Hort*628, 761-766.
- Barrera-Necha, L.L., Bautista-Baños, S., Bravo-Luna, L., García-Suárez, F.J., Alavéz-Solano, D. and Reyes-Chilpa, R. (2004) Antifungal activity of seed powders, extracts and secondary metabolites of *Pachyrhizus erosus* (L.) Urban (Fabaceae) against three postharvest fungi. *Mex J Phytopathol*22, 356-361.
- Barreto, H.M., Coelho, K.M.R.N, Ferreira, J.H.L., Santos, B.H.C., Abreu, A.P.L., Coutinhod, H.D.M., Silva, R.A., Sousa, T.O., Citó, A.M. and Lopes, J.A. (2016) Enhancement of the antibiotic activity of aminoglycosides by extracts from *Anadenanthera colubrine* (Vell.) Brenan var. *cebil* against multi-drug resistant bacteria. *Nat Prod Res*30, 1289-1292.
- Bylka, W., Matlawska, I. and Pilewski, N.A. (2004) Natural flavonoids as antimicrobial agents. *JANA*7, 24-31.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI (2014) document

M100-S25. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA 34(1): 240.

Chukwuemeka, N.O. and Anthonia, A.B. (2010) Antifungal effects of pawpaw seed extracts and papain on post harvest *Carica papaya* L. fruit rot. *Afr J Agric Res*5, 1531- 1535.

Govindarajan, M. (2009) Bioefficacy of *Cassia fistula* Linn. (Leguminosae) leaf extract against chikungunya vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Eur Rev Med Pharmacol Sci*13, 99-103.

Fратиanni, F., Ombra, M.N., Cozzolino, A., Riccardi, R., Spigno, P., Tremonte, P., Coppola, R., Nazzaro, F. (2016) Constituintes fenólicos, atividades antioxidantes, antimicrobianas e antiproliferativas de diferentes variedades endêmicas italianas de alho (*Allium sativum* L.). *J. Funct. Foods*21, 240-248.

Harborne, J.B. (1998) Phytochemical Methods. *Chapman Hall* 60–66.

Harborne, J.B. and Williams, C.A. (2000) Advances in flavonoids research since 1992. *Phytochemistry*55, 481-504.

Júnior, L.R.P., Andrade, A.P., Araújo, K.D., Barbosa, A.S. and Barbosa, F.M. (2014) Espécies da Caatinga como Alternativa para o Desenvolvimento de Novos Fitofármacos. *Floresta e Ambiente*21, 509-520.

Kim, Y.M., Lee, C.H. and Kim, H.G. (2004) Anthraquinones isolated from *Cassia tora* Leguminosae seed show an antifungal property against phytopathogenic fungi. *J Agric Food Chem*52, 6096–6100.

Kotan, R., Cakir, A., Dadasoglu, F., Aydin, T., Cakmakci, R. and Ozer, H. (2010) Antibacterial activities of essential oils and extracts of *Turkish achillea*, *Satureja* and *Thymus* species against plant pathogenic bacteria. *J Sci Food Agric*90, 145–160.

Kuete, V., Tangmouo, J.G., Beng, V.P., Ngounou, F.N. and Lontsi, D. (2006) Antimicrobial activity of the methanolic extract from the stem bark of *Tridesmostemon omphalocarpoides* (Sapotaceae). *J Ethnopharmacol*104, 5-11.

Kumar, D., Chand, R., Prasad, L. and Joshi, A.K. (2007) A new technique for monosporic culture of the most aggressive isolate in a given population of *Bipolaris*

sorokiniana, cause of foliar spot blotch in wheat and barley. *World J Microbiol Biotechnol*23, 1647-1651.

Lima, R.F., Alves, E.P., Rosalen, P.L., Ruiz, A.L.T.G., Duarte, M.C.T., Góes, V.F.F., Medeiros, A.C.D., Pereira, J.V., Godoy, G.P. and Costa, E.M.M.B. (2014) Antimicrobial and antiproliferative potential of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. *Evid Based Complement Alternat Med*2014, 1-7.

Lombardo, M., Kiyota, S. and Kaneko, T.M. (2009) Aspectos étnicos, biológicos e químicos de *Senna occidentalis* (Fabaceae). *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*30, 9-17.

Mazzonetto, F. and Vendramim, J.D. (2003) Effect of powders from vegetal species on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae) in stored bean. *Neotrop Entomol*32, 145-149.

Munier, R. and Macheboeuf, M. (1951) Paper partition microchromatography of alkaloids and of various biological nitrogenous bases. III. Examples of the separation of various alkaloids by the acid solvent phase technic (atropine, cocaine, nicotine, sparteine, strychnine and corynanthine families). *Bull Soc Chim Biol*33, 846-856.

Paes, J.B., Santana, G.M., Azevedo, T.K.B., Morais, R.M. and Júnior, J.T.C. (2010) Tannic substances present in several parts of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. var. *cebil* (Gris.) Alts.) tree. *Sci For*38, 441-447.

Palmeira, J.D., Ferreira, S.B., Souza, J.H., Almeida, J.M., Figueiredo, M.C. and Pequeno, L.S. (2010) Evolution of the antimicrobial activity *in vitro* and determination of minimum the inhibitory concentration (MIC) of hidroalcoholic extracts of angico in strains *Staphylococcus aureus*. *Rev Bras Anal Clin*42, 33-37.

Pandy, R. Pesticides and sterility. (2003) *Everyman's Sci*38, 84–86.

Robertson, E.H., Cartwright, R.A. and Wood, D.J.M. (1957) The flavones of tea. *J Sci Food Agr*07, 637-640.

Russell, C.R. and Morris, D.A. (1982) Invertase activity, soluble carbohydrates and inflorescence development in the tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Ann Bot*49, 89–98.

Scalbert, A. (1991) Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*30, 3875-3883.

- Silva, C.M.A., Costa, B.M.S., Silva, A.G., Souza, E.B., Silva, M.V., Correia, M.T.S., Silva, A.P.S. and Lima, V.L.M. (2016) Antimicrobial activity of several Brazilian medicinal plants against phytopathogenic bacteria. *Afr J Microbiol Res*10, 578-583.
- Silva, L.C.N., Sandes, J.M., Paiva, M.M., Araújo, J.M. and Figueiredo, R.C.B.Q. (2013) Anti-*Staphylococcus aureus* action of three Caatinga fruits evaluated by electron microscopy. *Nat Prod Res*27, 1492-1496.
- Tintino, S.R., Neto, A.A.C., Menezes, I.R.A., Oliveira, C.D.M. and Coutinho, H.D.M. (2015) Atividade antimicrobiana e efeito combinado sobre drogas antifúngicas e antibacterianas do fruto de *Morinda citrifolia*L. *Acta Boil Colomb*20, 193-200.
- Veluri, R., Weir, T.L., Bais, H.P., Stermitz, F.R. and Vivanco, J.M. (2004) Phytotoxic and Antimicrobial Activities of Catechin Derivatives. *J Agric Food Chem*52, 1077-1082.
- Venturoso, L.R., Bacchi, L.M.A. and Gavassoni, W.L. (2011) Antifungal activity of plant extracts on the development of plant pathogens. *Summa Phytopathol*37, 18-23.
- Vinayaka, K.S., Swarnalatha, S.P., Preethi, H.R., Surabhi, K.S., Kekuda, T.P. and Sudharshan, S.J. (2009) Studies on In vitro Antioxidant, Antibacterial and Insecticidal Activity of Methanolic Extract of *Abrus pulchellus* Wall (Fabaceae). *AJBAS*5, 110-116.
- Wagner, H. and Bladt, S. (2009) Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas, in Wagner H, Ulrich-Merzenich, Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine Stuttgart*. 97–110.
- Yang, X., Ma, X., Yang, L., Yu, D., Qian, Y. and Ni, H. (2010) Efficacy of *Rheum officinale* liquid formulation on cucumber powdery mildew. *Crop Prot*522, 167–173.
- Zuanazzi, J.S.S., Flavonóides, in Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A. and Petrovick, P.R. (2000) Farmacognosia: da planta ao medicamento, Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. da UFSC, Florianópolis. pp 489-515.

Table 1 - Chromatographic and revealing systems used for the phytochemical screening of the leaves extracts of *Anadenanthera colubrina*.

Class of compounds	mobile phase	developer	Reference
Alkaloids	A-A-A-A	Dragendorff	
Coumarins	T-E-A	UV-KOH 5%	(Wagner et al., 2009)
Antracenic derivatives	A-A-A	UV-KOH 10%	
Derivatives of cinnamic acid	A-A-A-A		
Flavonoids	A-A-A-A	UV-NEU	
Hydrolysable tannins	B-A-A		
Catechin tannins	A-A-A-A	Vanilina Clorídrica	(Robertson et al., 1957)
Triterpenoids	T-A (10%)	Liebermann- Burchard	(Harborne 1998)
Reducing sugars	A-B-T	TTZ	(Russell and Morris 1982)

A-A-A-A – AcOEt-OHCOOH-AcOH-H₂O (100:11:11:26), T-E-A – Toluene-Et₂O (1:1: sat ACOH 10%), T-A (3%) – Toluene- ethyl acetate (3%) (97:3), T-A (10%) – Toluene- ethyl acetate (10%) (90:10), A-B-T – (Me₂CO-n-BuOH-Phosphate Buffer pH 5,0) (5:4:1), B-A-A (n-BuOH-H₂O-AcOH) (4:5:1), A-A-A (AcOH-MeOH-H₂O) (100:13,5:10), NEU – (1% difenilboriloxietilamina solution MeOH), UV – 365 nm, TTZ – Triphenyltetrazolium chloride (4% in MeOH), Dragendorff – According Munier and Machebolerf (Munier and Macheboeuf 1951).

Table 2 - Yield organic extracts of *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* harvest at dry and rain season.

Organic Extracts	Yield (%)	
	Dry	Rainy
Cyclohexane	4.57	2.9
Chloroform	1.46	2.12
Ethyl Acetate	7.14	2.85
Methanol	8.80	7.84

Table 3 - Phytochemical screening of *A. colubrina* var. *cebil* extracts harvest at Catimbau National Park at dry and rainy season.

Class of compounds	Extracts							
	Cyclohexane		Chloroform		Ethyl Acetate		Methanol	
	dry	rainy	dry	rainy	Dry	rainy	dry	rainy
Alkaloids	–	–	–	–	–	–	–	–
Coumarins	–	+	–	–	–	–	–	–
Antracenic derivatives	–	–	–	–	–	–	–	–
Derivatives of cinnamic acid	–	–	–	–	–	–	–	–
Flavonoids	+	+	+	+	+	+	+	+
Hydrolysable tannins	–	–	–	–	–	–	–	–
Catechin tannins	+	–	–	–	+	+	+	+
Triterpenoids	+	+	+	+	+	+	–	–
Reducing sugars	+	+	+	+	+	+	+	+

Table 4 - Antibacterial activity, Minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of organics extracts from *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* harvest at dry and rain season against selected plant pathogenic bacterial.

Extracts		<i>Acc</i>		<i>Pcc</i>		<i>Rsol</i>		<i>Xcc</i>		<i>Xcm</i>		<i>Xcv</i>	
		dry	rain	dry	rain	dry	rain	dry	rain	dry	rain	dry	rain
CHX	MIC	0.78	6.25	3.12	12.5	1.56	6.25	0.78	3.12	1.56	3.12	0.78	3.12
	MBC	3.12	6.25	6.25	25	1.56	12.5	1.56	6.25	1.56	6.25	1.56	6.25
CF	MIC	6.25	3.12	6.25	6.25	1.56	1.56	12.5	1.56	3.12	3.12	3.12	3.12
	MBC	6.25	6.25	12.5	12.5	3.12	3.12	6.25	1.56	6.25	3.12	3.12	6.25
EA	MIC	1.56	1.56	3.12	3.12	3.12	1.56	1.56	0.78	1.56	3.12	1.56	1.56
	MBC	1.56	1.56	12.5	3.12	3.12	3.12	1.56	1.56	1.56	3.12	3.12	3.12
MET	MIC	1.56	1.56	6.25	6.25	1.56	3.12	1.56	1.56	1.56	3.12	3.12	12.5
	MBC	3.12	3.12	12.5	6.25	3.12	3.12	3.12	3.12	1.56	6.25	6.25	12.5
Chloramphenicol	MIC	0.009		0.039		0.078		0.019		0.039		0.004	
	MBC	0.009		0.078		0.156		0.019		0.039		0.004	

Acc - *Acidovorax citrulli*; *Pcc* - *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*; *Rsol* - *Ralstonia solanacearum*; *Xcc* - *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xcm* - *X. campestris* pv. *malvacearum*; *Xcv* - *X. campestris* pv. *viticola*; CH – cyclohexane; CF – chloroform; EA - ethyl acetate; MET – methanol.

Table 5 - Antifungal activity, Minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of organics extracts from *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* harvest at dry and rainy season against selected plant pathogenic fungal.

Extracts		<i>Af</i>		<i>Fm</i>		<i>Fo</i>		<i>Fs</i>		<i>Rs</i>		<i>VI</i>	
		dry	rainy	dry	rainy	dry	rainy	dry	rainy	dry	rainy	dry	rainy
CHX	MIC	6.25	12.5	12.5	25	25	50	6.25	6.25	6.25	12.5	6.25	6.25
	MBC	6.25	12.5	12.5	50	50	50	12.5	12.5	6.25	12.5	6.25	12.5
CF	MIC	12.5	12.5	12.5	25	50	50	6.25	12.5	12.5	12.5	6.25	12.5
	MBC	12.5	12.5	25	25	50	50	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
EA	MIC	12.5	12.5	12.5	50	25	50	6.25	12.5	12.5	12.5	6.25	12.5
	MBC	12.5	12.5	12.5	50	25	50	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
MET	MIC	12.5	12.5	25	50	50	50	6.25	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
	MBC	12.5	12.5	25	50	50	50	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
Cercobin	MIC		0.12		0.12		0.5		0.25		0.12		0.12
	MBC		0.12		0.25		0.5		0.25		0.25		0.25

Af - *Aspergillus flavus*; *Fm* - *Fusarium moniliforme*; *Fm* - *Fusarium oxysporum*; *Fs* - *Fusarium solani*; *Rs* - *Rhizopus sotolonifer*; *VI* - *Verticillium lecanii*; CH – cyclohexane; CF – chloroform; EA - etyl acetate; MET – methanol.

Figure 1 - HPLC-UV chromatograms of ethyl acetate extracts from the rainy season of *A. colubrina* leaves. Detection at 256 nm. UV spectra analysis of the main peaks. Peak 9: is associated to p-hydroxybenzoic compound; peaks 18 e 21: quercetin derivatives; peaks 34: is associated to quercetin (UV 190- 400nm).

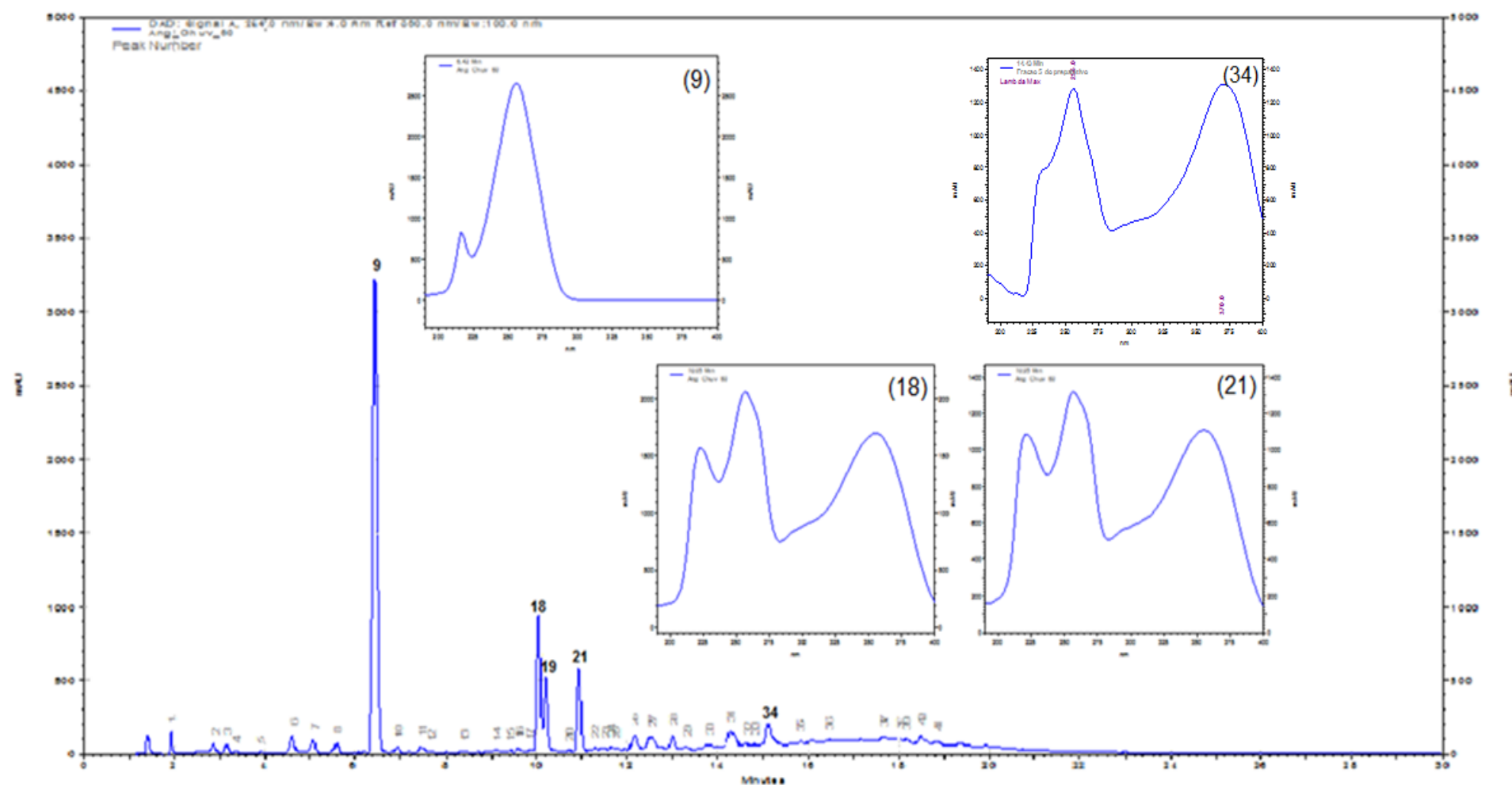


Table 6 - Antibacterial activity, Minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of Flash Chromatography fractions of EAr extract against selected plant pathogenic bacterial.

Extracts		<i>Acc</i>	<i>Xcc</i>
Flash Fractions 1	MIC	>5.8	>5.8
	MBC	>5.8	>5.8
Flash Fractions 2	MIC	>5.8	>5.8
	MBC	>5.8	>5.8
Flash Fractions 3	MIC	1.45	0.72
	MBC	1.45	1.45
Flash Fractions 4	MIC	5.8	5.8
	MBC	5.8	5.8
Flash Fractions 5	MIC	>5.8	>5.8
	MBC	>5.8	>5.8
Flash Fractions 6	MIC	>5.8	>5.8
	MBC	>5.8	>5.8

Acc - *Acidovorax citrulli*; *Xcc* - *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

Table 7 - Antibacterial activity, Minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of preparative fractions against selected plant pathogenic bacterial.

Extracts		<i>Acc</i>	<i>Xcc</i>
Preparatory Fractions 1	MIC	>0.5	>0.5
	MBC	>0.5	>0.5
Preparatory Fractions 2	MIC	>0.5	>0.5
	MBC	>0.5	>0.5
Preparatory Fractions 3	MIC	0.5	0.5
	MBC	0.5	0.5
Preparatory Fractions 4	MIC	>0.5	>0.5
	MBC	>0.5	>0.5
Preparatory Fractions 5	MIC	>0.5	>0.5
	MBC	>0.5	>0.5
Preparatory Fractions 6	MIC	>0.5	>0.5
	MBC	>0.5	>0.5

Acc - *Acidovorax citrulli*; *Xcc* - *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*,

Figure 2 - HPLC chromatogram and UV spectra of the phenolic compound associated with the p-hydroxybenzoic compound released from *Anadenanthera colubrina*.

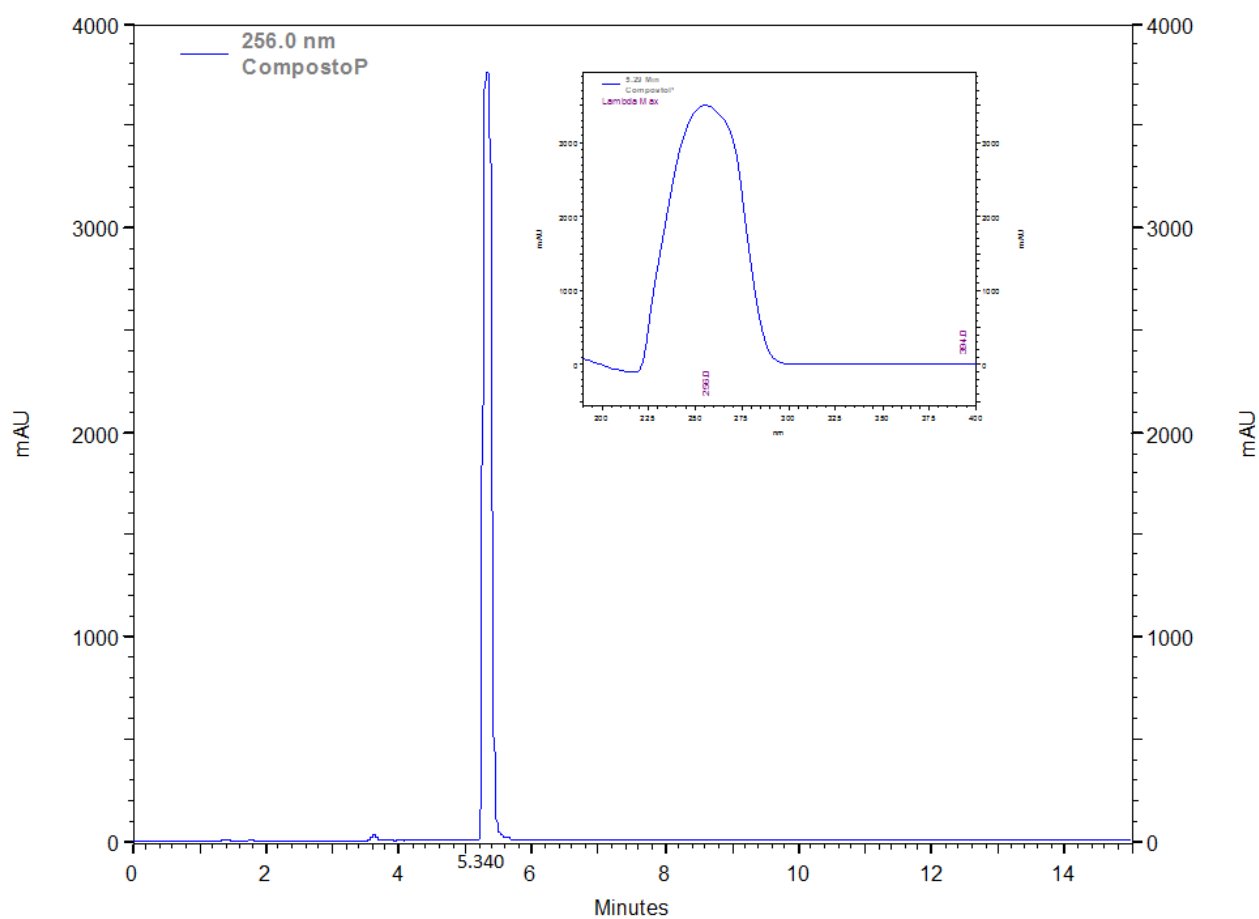


Figure 3 - Effect of Cyclohexane extract on *Xanthomonas campestris pv campestris* cells. observed by transmission electron microscopy. A: untreated cells, normal cytoplasm, intact plasma membrane; B: Treated Cells, formation of vacuums in the cytoplasm.

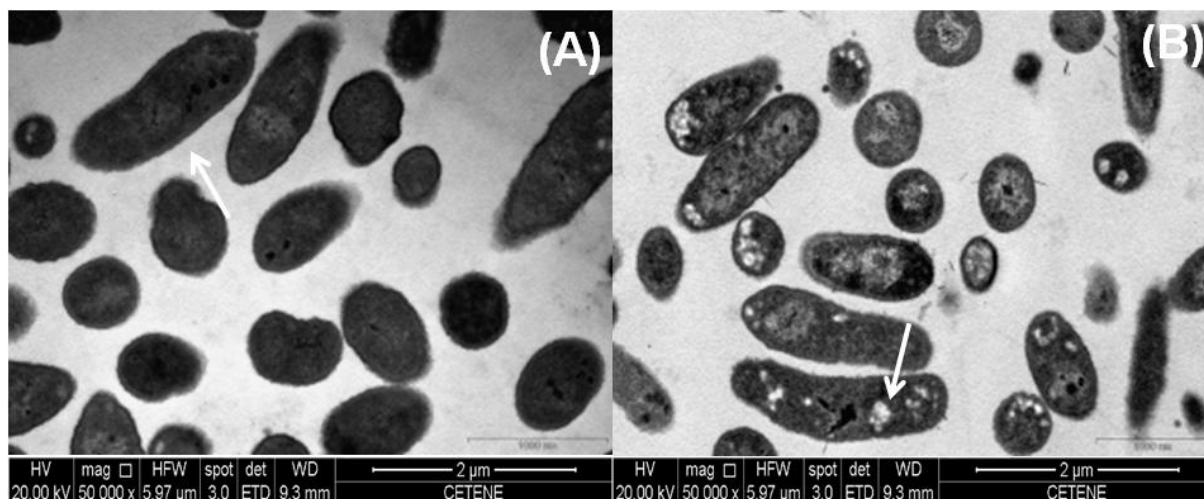
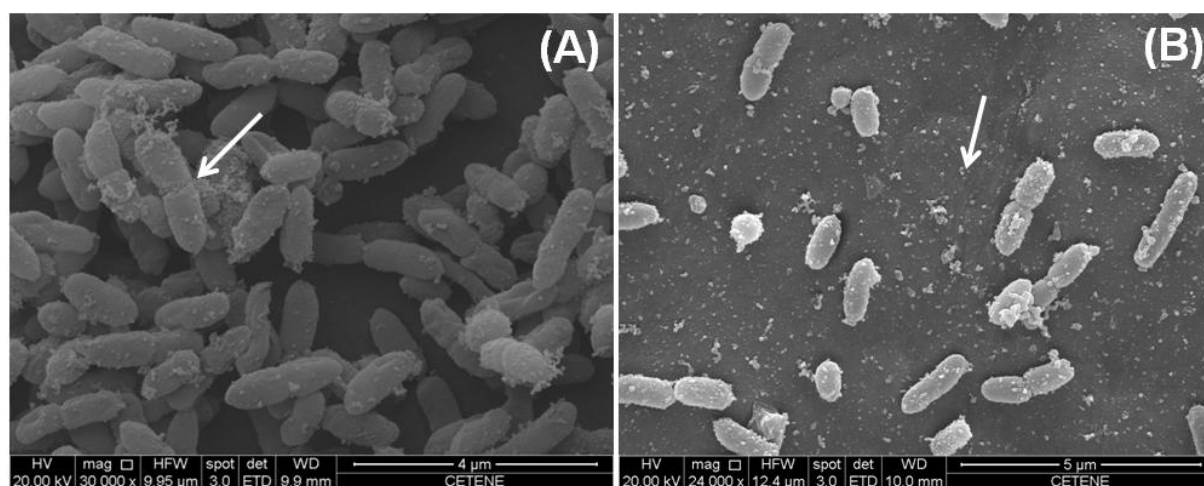


Figure 4 - Effect of cyclohexane extract on *Xanthomonas campestris pv campestris* cells. observed by scanning electron microscopy. A: untreated cells; cells in normal rod format, normal cell division B: treated cells, space between cells.



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

4.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INSETICIDA DE EXTRATOS DE FOLHAS DE ANADENANTHERA COLUBRINA VAR. CEBIL (GRISEB) ALTSCHUL CONTRA TETRANYCHUS URTICAE KOCH E SITOPHILUS ZEAMAI MOTS.

Cibele Maria Alves da Silva Bessa¹, Paula Fernanda Figueiredo das Mercês¹, Thiago Henrique Napoleão¹, Patrícia Maria Guedes Paiva¹, Milena Martins Correia da Silva², Claudio Augusto Gomes da Câmara², Maria Tereza dos Santos Correia¹, Maria Luiza Vilela Oliva³

¹ Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil.

² Departamento de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171- 900 Recife, Pernambuco, Brasil.

³ Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de São Paulo, Rua 3 de Maio, n 100, 04021-001, São Paulo, São Paulo, Brasil

Autor para correspondência: cibelealves2@gmail.com (CMAS, Bessa), Avenida Av. Professor Moraes Rêgo, s/n, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil. Tel/fax: +55 (081) 21268540.

RESUMO

A deterioração e a degradação das culturas por insetos causam perdas econômicas de vários bilhões de dólares e afetam a segurança alimentar. O *Sitophilus zeamais* é responsável por danos na pré e pós-colheita ao milho e o *Tetranychus urticae* é conhecido como praga economicamente importante de culturas agrícolas e ornamentais em todo o mundo. A alta toxicidade dos inseticidas sintéticos e o desenvolvimento de resistência por insetos aos produtos químicos atualmente utilizados estimulam a investigação de inseticidas derivados de plantas como novas alternativas para o controle de pragas. As propriedades inseticidas de metabólitos secundários têm sido reconhecidas empiricamente durante séculos, e vem sendo confirmadas cientificamente nas últimas décadas. O extrato em ciclohexano (CHX) e acetato de etila (EA) das folhas de *Anadenanthera colubrina* coletadas nas estações seca e chuvosa foram avaliados quanto à sobrevivência e fisiologia nutricional do *Sitophilus zeamais* Motsch. (gorgulho-do-milho) e quanto ao efeito acaricida frente a *Tetranychus urticae* Koch (ácaro-rajado) que ocorre em uma grande variedade de culturas economicamente importantes em todo o mundo. Para avaliar a interferência dos extratos na fisiologia nutricional do gorgulho do milho, foram testadas concentrações de 250, 500 e 700 mg/g. Todos os extratos induziram a mortalidade de *S. zeamais*, contudo somente ciclohexano estação seca (CHXd) e acetato de etila estação chuvosa (EAr) causaram mortalidade significativa ($p < 0.05$), mais de 50%, promovendo dano fisiológico aos insetos, em todas as concentrações testadas. Nos testes de mortalidade com o ácaro-rajado, os extratos CHXd e EAr apresentaram uma CL_{50} de 52,75 e 156,42 mg/mL. Ainda no mesmo teste, pode-se observar que a oviposição também foi suscetível aos extratos. Diante disso, os extratos de *Anadenanthera colubrina* 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, angico.

1 Introdução

O tratamento químico é amplamente utilizado na agricultura, porém, seu uso excessivo e indiscriminado tem aumentado o número de populações de pragas resistentes aos inseticidas comerciais (Ferreira et al., 2016; Zhang et al., 2016; Ismail et al., 2017), além de gerar contaminação ambiental e alimentar, o que representa perigo para a saúde dos produtores e consumidores (Rao et al., 2017). Devido a tais problemas, o manejo alternativo utilizando extratos e compostos de plantas (inseticidas botânicos) para proteger as culturas e produtos armazenados vem ganhando destaque. O uso de inseticidas de origem vegetal é um dos métodos alternativos mais estudados em todo o mundo para controle de pragas (Camaroti et al., 2017).

O *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae) é um inseto cosmopolita popularmente conhecido como gorgulho do milho, sendo o principal causador das perdas de grãos na cultura e/ou durante o armazenamento do milho (Lorini, 2008; Napoleão et al., 2015). Além disso, pode atacar trigo, arroz, cevada e produtos alimentícios processados, como massas e biscoitos (Fazolin et al., 2010; Suleiman et al., 2015; Zakka et al., 2015). Esse inseto aumenta sua população rapidamente, sendo difícil o controle desta praga em grãos armazenados (Adedire e Lajide 2003). Algumas pragas, em conjunto com *S. zeamais*, podem provocar uma perda estimada entre 20 a 30% da produção do milho (Tefera et al., 2011.; Mugo, 2012).

Outra praga cosmopolita de interesse agrícola que provoca prejuízo para pequenos, médios e grandes agricultores é o ácaro-rajado, *Tetranychus urticae* Koch, pertencente à família Tetranychidae (Gallo et al., 2002). *T. urticae* é considerado uma das principais pragas agrícolas capaz de infestar uma ampla variedade de culturas economicamente importantes no mundo tais como: tomate, pepino, melão, morango, milho, soja, maçã, uva, entre outros (Gerson e Weintraub, 2012), o que vêm causando danos consideráveis nas produções e um impacto negativo na produtividade (Cloyd et al., 2009). O controle de *T. urticae* é feito com acaricidas convencionais, o que tem se tornado cada vez mais difícil, pois esses

insetos têm desenvolvido resistência a esses produtos (Mazzoleni, 2010; Kumral et al., 2010)

Inúmeras plantas são ricas em substâncias bioativas com atividade inseticida, podendo constituir uma forma alternativa de controle de pragas (Menezes, 2005). A *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb) Altschul é uma árvore amplamente distribuída pelo Brasil, sendo nativa da América do Sul e do Nordeste do Brasil. É popularmente conhecida como angico, pertence à família Fabaceae e pode chegar até 7 m de altura (Barreto e Ferreira, 2011). Segundo Silva et. al. (dados não publicados até o momento), extratos orgânicos das folhas de *A. colubrina* coletadas em estações secas e chuvosas apresentaram atividade antimicrobiana e antifúngica, sendo o extrato em ciclohexano das folhas da estação seca (CHXd) e o extrato em acetato de etila das folhas da estação chuvosa (EAr) os mais ativos.

No presente estudo, buscamos avaliar o potencial dos extratos em ciclohexano de folhas de *A. colubrina* coletadas na estação seca (CHXd) e chuvosa (CHXr), bem como extratos em acetato de etila de folhas da estação seca (EAd) e chuvosa (EAr) sobre a sobrevivência de insetos adultos de *S. zeamais* quando incorporados a uma dieta artificial, sendo avaliados também seus efeitos antinutricionais. Além disso, foi verificada a ação desses extratos na mortalidade e ovoposição de *T. urticae*.

2 Materiais e Métodos

2.1 Coleta do material vegetal

Folhas de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*, sadias foram coletados no Parque Nacional do Catimbau, no Nordeste do Brasil, em janeiro e junho (estação seca e estação chuvosa, respectivamente). Um voucher de um espécime foi depositado no herbário do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA). As folhas coletadas foram secadas em estufa a 45°C por 72h. Os materiais secos foram triturados para se obter um pó fino. O pó da planta foi armazenado num recipiente hermético e mantido a 4 °C até a sua utilização.

2.2 Extrato Orgânico

As folhas trituradas de *A. colubrina* coletadas nas estações seca e chuvosa foram submetidos separadamente à extração utilizando solventes orgânicos em série eluotrópica: ciclohexano (CHX), clorofórmio (CF) e acetato de etila (EA), conforme descrito por Silva et al. (2017). cem gramas do pó das amostras foram colocadas em papel filtro e utilizou-se para extração o aparelho Soxhlet a uma temperatura inferior à temperatura de ebulição de cada solvente. Todas as amostras foram submetidas a refluxo até à saturação durante 24 h. Em seguida, os extratos foram filtrados utilizando papel de filtro Whatman No: 1. em todos os casos, os solventes foram removidos e os extratos orgânicos foram concentrados separadamente até a total secagem num evaporador rotativo a 45 °C sob pressão reduzida e foram armazenados à temperatura ambiente num dessecador até serem utilizados. Nesse trabalho, foram utilizados os extratos em ciclohexano e acetato de etila de folhas da estação seca (CHXd/EAd) e chuvosa (CHXr/EAr).

2.3 Bioensaios com *Sitophilus zeamais* (Gorgulho-do-Milho)

2.3.1 Criação dos Insetos

Foram utilizadas colônias de *S. zeamais* mantidas no Laboratório de Bioquímica de Proteínas do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco. As colônias são mantidas em recipientes de vidro, com capacidade de 1 L e tampados com tecido fino, em BOD à temperatura de 25°C, 70% de umidade relativa e fotoperíodo de 12:12h claro: escuro. A dieta consiste em grãos de milho selecionados de acordo com a integridade, condições sanitárias, tamanho e ausência de contaminação por outras espécies de insetos. Para o bioensaio foram utilizados insetos adultos (30 a 60 dias de idade).

2.3.2 Experimento

Os bioensaios foram realizados segundo uma adaptação do método de Xie et al., (1996) descrita por Napoleão et al., (2013). Cada bioensaio consistiu em placa de petri estéril (90x15mm) contendo cinco discos compostos por farinha de trigo autoclavada misturada com os extratos. Para tanto, os extratos CHXd, CHXr, EAd e

EAr (0,5, 1,0 ou 1,5 g) foram solubilizados em 300 µl de acetato de etila e metanol, respectivamente, e em seguida foi adicionada água destilada autoclavada, completando a solução para um volume final de 5 mL. Então, 2 g da farinha de trigo foram adicionados a cada solução e, após a homogeneização, cinco alíquotas de 200 µL da mistura foram colocadas em placa de Petri e armazenadas em estufa a 56°C por 24h até a completa secagem e formação dos discos contendo os extratos nas concentrações finais de 250, 500 ou 750 mg/g (mg de extrato/ g de farinha de trigo). Posteriormente a massa dos discos foi registrada. Nos tratamentos controle, acetato de etila ou metanol, na mesma condição utilizada para solubilizar os extratos, foram adicionados para formação dos discos. Cada placa recebeu 20 insetos, previamente pesados, e foi mantida a 28±2°C. Após 7 dias de experimento, o peso dos discos, o peso dos insetos e a taxa de mortalidade foram determinados. Os bioensaios foram realizados em quintuplicata.

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 também foram 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).

2.3.3 Análise Estatística

Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos foram calculadas através do teste de Tukey. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão.

2.4 Bioensaio com *Tetranychus urticae* (Ácaro rajado)

2.4.1 Criação do ácaro

Plantas de feijão-de-porco, (*Canavalia ensiformis* L.) Foram frequentemente cultivadas em vasos com capacidade de 5 l contendo terra misturada com húmus (3:1), em casa de vegetação. Após 25 dias de idade, foram levadas para o

laboratório de biologia de insetos da universidade federal rural de pernambuco e infestadas com ovos, larvas, ninfas e adultos do ácaro rajado, para manutenção da criação. A criação estoque não foi exposta aos acaricidas e foi mantida sob a temperatura de 25 ± 1 °C, umidade relativa de 65 ± 5 % e fotoperíodo 12:12 h.

2.4.2 Bioensaio de Contato Residual

Os testes de efeito residual sobre *T. urticae* foram realizados utilizando a metodologia estabelecida por Ribeiro et al., (2016). Para os experimentos foram utilizados discos de folha de feijão-de-porco de 2,5 cm de diâmetro. Os discos foram imersos em soluções contendo os extratos CHXd e EAr ou acaricida botânico (Azamax), usado como controle positivo. O Azamax foi selecionado como controle positivo por ser inseticida comercial registrado pelo Ministério da Agricultura utilizado para o controle do *T. urticae*. Após a secagem em temperatura ambiente, cada disco foliar foi transferido para uma placa de Petri (10 cm de diâmetro e 1,5 cm de altura) contendo disco de papel de filtro constantemente umedecido com água destilada. Dez fêmeas adultas do ácaro rajado foram transferidas para cada disco foliar, totalizando 30 ácaros por placa de Petri. As concentrações dos extratos CHXd e EAr variaram de 9,0 mg/mL a 102,6 mg/mL e 9,5 mg/mL a 500 mg/mL, respectivamente. Para observar a possível ação dos extratos testados e a mortalidade de ácaros por ingestão alimentar, todos os experimentos foram realizados com placas de Petri abertas. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, totalizando 3 repetições. O número de mortalidade nos tratamentos e nos controles foi registrado após 24 h.

2.4.3 Análises Estatísticas

Os dados de mortalidade dos extratos das folhas de *A. colubrina* e Azamax foram submetidos à análise de Probit utilizando o software POLO-PC (LeOra Software, 1987) para a determinação da concentração letal necessária para 50% de mortalidade (CL_{50}) da população de ácaros, com nível de confiança de 95%. As razões de toxicidade foram determinadas com base no método descrito por Robertson e Preisler (1992).

3 Resultados e Discussão

Produtos naturais oriundos de plantas podem ser utilizadas em pequena escala por agricultores para proteger grãos e leguminosas armazenados contra pragas (Ngamo et al 2007; Li et al 2013). Nos últimos anos, tem havido um esforço considerável para avaliar o potencial dos metabólitos secundários das plantas como fontes de agentes de controle e consequentemente novas fontes para a concepção de moléculas alvo-específica (Ateyyat et al. 2009; Gaikwad et al. 2010; Li et al. 2011).

Todos os extratos de folhas *Anadenanthera colubrina* induziram a mortalidade de adultos de *S. zeamais* em comparação com o controle (Figura 1), contudo somente CHXd e EAr causaram morte de mais de 50% os insetos. A taxa de ganho de biomassa relativa nos tratamentos com todos os extratos (Figuras 2A, 2B, 3A, 3B) foi negativa, indicando que os insetos perderam biomassa. Segundo Napoleão et al. (2013) uma possível explicação para resultados dessa natureza é que os compostos presentes nas amostras sendo avaliadas alteram os processos de ingestão e a absorção de nutrientes, de modo que os insetos começam a metabolizar as suas reservas corporais para sobreviver. A taxa de consumo relativo foi nula ou negativa nos tratamentos com os extratos, exceto EAr a 750 mg/g, sugerindo a rejeição da dieta (Figuras 2C, 2D, 3C, 3D). De fato, o cálculo dos valores de IDA indicou forte efeito de deterrência alimentar em todas as concentrações testadas os extratos. Sendo assim, os extratos de folhas de *A. colubrina* contêm compostos capazes de causar a rejeição da dieta. Segundo Menezes (2015) os metabólitos secundários presentes em plantas com efeitos inseticidas podem agir como inibidores da alimentação de insetos ou dificultadores de crescimento, desenvolvimento e reprodução.

Rathi et al. (2008) realizaram triagem fitoquímica de dez plantas com atividade inseticida, entre elas, *Adathoda vasica*, *Cynodon dactylon*, *Eclipta alba*, *Morinda pubescens*, *Ocimum tenuiflorum*, *Phyllanthus amarus*, *Sesbania grandifolora*, *Solanum surattense*, *S. trilobatum* e *Vinca rosea*. Várias misturas de solventes foram utilizadas como extrator. Foram encontrados flavonoides e taninos, uma importante classe de compostos que agem como uma barreira de defesa contra insetos herbívoros causando efeito deterrente na maior parte das plantas estudadas.

Esses compostos também se mostraram presentes nos extratos CHXd e EAr de *A. colubrina* (exatamente os mesmos que foram utilizados no presente trabalho), conforme descrito por Silva et al. (2017).

O efeito deterrente alimentar de um produto inseticida tem grande potencial em impedir a ação danosa da praga, bem como pode causar morte por inanição (Menezes, 2005). Contudo, pode ter sua eficácia limitada devido à plasticidade fenotípica dos insetos, que podem se tornar insensíveis em períodos até mesmo extremamente curtos, tais como dias e horas (Isman, 2006).

Alterações no comportamento alimentar de insetos podem ser uma consequência de um processo mediado por sensibilidade gustativa (efeito pré-ingestão). Por não haver a ingestão dos discos contendo os extratos, ocorrem os distúrbios nutricionais observados em todas as concentrações testadas. Ainda, o efeito deterrente pode estar relacionado com uma intoxicação (efeito pós-ingestão), onde o inseto evita se alimentar após ter ingerido uma pequena quantidade de alimentação que ativa a resposta de rejeição (Napoleão et al., 2013; Sauvion et al., 2004; Michiels et al., 2010; Sprawski and Gojawska, 2010).

De acordo com a Tabela 1 verifica-se que os extratos CHXd e EAr foram tóxicos ao *Tetranychus urticae* por contato residual, causando respostas fisiológicas e comportamentais, porém nenhum dos extratos testados foi mais tóxico do que o controle positivo. As respostas de concentração-mortalidade do ácaro rajado submetido aos extratos CHXd e EAr bem como ao Azamax, usado como controle positivo, foram comparados em termos de diferença das CL_{50} estimadas. Os extratos testados CHXd e EAr apresentaram uma CL_{50} de 52.75 e 73.27 mg/mL respectivamente. A susceptibilidade do ácaro rajado foi maior para o extrato CHXd, o qual foi cerca de 1,39 vezes mais tóxico que o extrato EAr. O Azamax foi cerca de 170 vezes mais tóxico que o extrato CHXd e cerca de 236 vezes mais tóxico que o extrato em EAr.

Os extratos de *A. colubrina* afetaram a fecundidade em *T. urticae* em concentrações subletais. À medida que as concentrações para ambos os extratos eram aumentadas a sobrevivência diminuía, causando um efeito, por consequência na redução da oviposição. Estudos anteriores relatam a capacidade dos óleos essenciais em reduzir a fecundidade em *T. urticae* (Pontes et al., 2010; Ribeiro;

Câmara e Ramos, 2016), mas sem indicação se esta redução na fecundidade se devia às propriedades dos óleos ou a morte de ácaros. Como se pode verificar na Figura 4, o extrato CHXd na concentração de 40 mg/mL, causou uma mortalidade de cerca da metade dos indivíduos com uma redução na fecundidade de 10%. Na maior concentração 102.6 mg/mL a mortalidade chegou a 100%. Já em relação ao extrato EAr, a concentração capaz de matar 100% dos indivíduos foi de 416 mg/mL. A redução do número de ovos e a inibição da oviposição são importantes efeitos de extratos vegetais sobre a reprodução dos insetos (Costa et al., 2004).

Os extratos das folhas e *A. colubrina* podem ser considerados significativos, pois a eficiência aumentou diretamente com a concentração e tempo de exposição. Resultados semelhantes foram encontrados por Ribeiro, Câmara e Ramos (2016) com óleos essenciais obtidos de *Piper marginatum*.

Segundo Silva et al., (2017) os extratos CHXd e EAr das folhas de *A. colubrina* apresentam em sua composição compostos como flavonoides, taninos catéquicos, triterpenos e açúcares redutores. Ricklefs (2003) descreve que taninos e outros metabólitos secundários podem interferir nas vias metabólicas específicas ou nos processos fisiológicos dos insetos. Estudos vêm mostrando que o número de metabólitos que apresentam atividade inseticida vêm crescendo nos últimos anos. Segundo Luz (2007), as plantas do gênero *Capsicum* contêm substâncias tais como alcaloides, flavonoides, cumarinas, saponinas e óleos essenciais provenientes do metabolismo secundário com grande potencial inseticida e de repelência.

A utilização de plantas ou seus extratos com atividade inseticida tem aplicação importante na saúde pública e na agropecuária (Matias et al., 2002). Este é o primeiro relato de atividade acaricida de extratos de *A. colubrina*. No entanto, a avaliação da atividade acaricida de outras espécies de plantas contra *T. urticae* tem sido investigada anteriormente. Ribeiro, Camara e Ramos (2016) viu que óleos essenciais da casca e da flor de *Piper marginatum* mostraram efeito contra *T. urticae*. Em outros estudos Camara et al., (2015) comprovou que óleos essenciais de *Citrus sinensis* e *C. aurantium* possui potencial de desenvolvimento como repelente comercial contra ácaros e pode impedir sua propagação em estufas comerciais. Segundo Pavela et al., (2016) óleos de *Mentha spicata*, *Ocimum basilicum*, *Origanum compactum* também apresentaram atividade contra *T. urticae*.

Ambos os extratos mostram ser promissores, porém novos estudos devem ser realizados, no intuito de validar tais resultados, levando em consideração a identificação dos princípios ativos contidos nesse extrato. Visando um uso direto dessa matriz vegetal, estudos do custo e benefícios na preparação de formulações para serem aplicados em ambientes abertos, além dos efeitos sobre os ácaros predadores.

4 Conclusão

O extrato de folhas de *A. colubrina* é uma fonte de inseticidas natural, que age contra adultos de *Sitophilus zeamais* e fêmeas de *Tetranychus urticae*. Esses extratos têm o potencial de serem utilizados no controle tanto do gorgulho do milho, dissuadindo o consumo e levando os insetos a morte por inanição, como no ácaro rajado, matando os insetos através da ingestão de compostos existentes nos extratos.

Conflito de Interesse

Os autores não têm conflito de interesse para declarar

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer às agências brasileiras que apoiaram esta pesquisa: Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pelas bolsas de pesquisa NANOBIOTEC-Brasil da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Ministério de Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicações (MCTI), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Estamos muito gratos ao curador do Herbário IPA por permitir o acesso à coleção e o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) por autorizar fazer coletas no PARNA Catimbau (Sisbio16.806).

5 Referências

- Adedire, C.O., Lajide, L., 2003. Ability of extracts of ten tropical plant species to protect maize grains against infestation by the *Sitophilus zeamais* during storage. Niger. J. Exp. Biol. 4, 175e179.
- Ateyyat, M.A., Al-mazra'awi M., Aburjai T., Shatnawi M.A., 2009. Aqueous extracts of some medicinal plants are as toxic as Imidacloprid to the sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci*. Journal of Insect Science 9, 15 e 20.
- Barretto, S.S.B., Ferreira, R.A., 2011. Aspectos morfológicos de frutos, sementes, plântulas e mudas de Leguminosa e Mimosoideae: *Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan e *Enterolobium contortisiliquum* (Vellozo) Morong. Revista Brasileira de Sementes 33, 223 e 232.
- Camara C.A.G., Akhtar Y., Isman M. B., Seffrin R.C., Born F.S., 2015. Repellent activity of essential oils from two species of *Citrus* against *Tetranychus urticae* in the laboratory and greenhouse. Crop Protection 74, 110 e 115.
- Camaroti, J.R.S.L., Oliveira, A.P.S., Paiva, P.M.G., Pontual, E.V., Napoleão, T. H., 2017. Phytoinsecticides for controlling pests and mosquito vectors of diseases. In: Victor Green. (Org.). Biocontrol Agents: Types, Applications and Research Insights. 1ed. New York: Nova Science Publishers 147-188.
- Cloyd, R. A., Galle, C. L., Keith, S. R., Kalscheur, N. A., Kemp, K. E., 2009. Effect of commercially available plant-derived essential oil products on arthropod pests. *Journal of Economic Entomology* 102, 1567.
- Costa, E.L.N., et al. 2004. Efeitos, aplicações e limitações de extratos de plantas inseticidas. Acta Biologica Leopoldensia, 26, 73 e 85.
- Fazolin, M., da Costa, C.R., Damaceno, J.E.O., de Albuquerque, E.S., Cavalcante, A.S.S., Estrela, J.L.V., 2010. Fumigação de milho para o controle do gorgulho utilizando caule de *Tanaecium nocturnum* (Bignoniaceae). Pesquisa Agropecuária Brasileira 45, 1e6.
- Ferreira, C. B.S., Andrade, F. H.N., Rodrigues, A.R.S., Siqueira, H.A.A., Gondim Jr.. M.G.C., 2015. Resistance in field populations of *Tetranychus urticae* to acaricides and

characterization of the inheritance of abamectin resistance. *Crop Protection*, 67, 77 e 83.

Gallo, D., Nakano, O., Silveira Neto, S., Carvalho, R.P.L., Batista, G.C., Berti Filho, E., Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., Alves, S.B., Vendramim, J.D., Marchini, L.C., Lopes, J.R.S., Omoto, C., 2002. *Entomologia agrícola*. Piracicaba: FEALQ 920.

Gerson, U., Weintraub P.G., 2012. Mites (Acari) as a factor in greenhouse management. *Annual Review of Entomology* 57, 229e247.

Ismail, M., Ejaz, M., Abbas, N., AliShad, S., ShahzadAfza, M.B., 2017. Resistance risk assessment to chlorpyrifos and cross-resistance to other insecticides in a field strain of *Phenacoccus solenopsis* Tinsley. *Crop Protection*, 94, 38-43.

Isman, M.B., 2006. Botanical Insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review Entomology*, 51, 45 e 66.

Kumral, N.A., Cobanoglu, S., Yalcin, C., 2010. Acaricidal: repellent and oviposition deterrent activities of *Datura stramonium* L. against adult *Tetranychus urticae* (Koch). *J. Pest Sci.* 83, 173e180.

Leora., Berkely, CA., 1987. *POLO-PC: An user's guide to Probit or Logit analysis*. LeOra Software.

Li, S.G., Li, M.Y., Huang, Y.Z., Hua, R.M., Lin, H.F., He, Y.J., Wei, L.L., Liu, Z.Q., 2013. Fumigant activity of *Illicium verum* fruit extracts and their effects on the acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activities in adult *Sitophilus zeamais*. *Journal of Pest Science* 86, 677 e 683.

Lorini, I., 2008. *Manejo Integrado de Pragas de Grãos de Cereais Armazenados*. Passo Fundo: Embrapa Trigo 72.

Luz, F.J.F., 2007. *Caracterização morfológica e molecular de acessos de pimenta (Capsicum chinense Jacq.)*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 70.

Matias, R. et al. 2002. *Melia azedarach*, uso popular x estudos químico e farmacológico: breve revisão. *Ensaio e Ciência*, 6, 91 e 121.

Menezes, E.L.A., 2005. Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola. Seropédica, Rio de Janeiro: Embrapa Agrobiologia, 58.

Michiels, K., Van Damme, E.J., Smagghe, G., 2010. Plant insect interactions: what can we learn from plant lectins? Archives of Insect Biochemistry and Physiology 73, 193 e 212.

Mugo, S., 2012. Storage insect pests of maize and methodologies for minimizing postharvest losses, 16 e 20. In: Proceedings of the 2012 Science Week and MAIZE & WHEAT CRP Meetings. International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), Mexico D.F., Mexico. Available at: <http://conferences.cimmyt.org/downloads/crp2012>.

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., 2013. Deleterious effects of Myracrodruon urundeuva leaf extract and lectin on the maize weevil, Sitophilus zeamais (Coleoptera, Curculionidae) Journal of Stored Products Research 54, 26 e 33.

Napoleão, T.H., Agra-Neto, A.C., Belmonte, B.R., Pontual, E.V., Paiva, P.M.G., 2015. Biology, Ecology and Strategies for Control of Stored-Grain Beetles: A Review. In: Camilla Stack. (Org.). Beetles: Biodiversity, Ecology and Role in the Environment. 1ed. New York: Nova Science Publishers Inc., 105-122.

Ngamo, T.S.L., Ngatanko, I., Ngassoum, M. B., Mapongmestsem, P. M., Hance, T., 2007. Persistence of insecticidal activities of crude essential oils of three aromatic plants towards four major stored product insect pests. African Journal of Agricultural Research, 2, 173 e 177.

Pavela, R., Dall'Acqua, S., Sut S., Baldan, V., Kamte S.L.N., Nya, P.C.B., Cappellacci L., Petrelli, R., Nicoletti, M., Canale, M., Maggi, F., Benelli, G., 2016. Oviposition inhibitory activity of the Mexican sunflower *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) polar extracts against the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* (Tetranychidae). Physiological and Molecular Plant Pathology, 1 e 8.

Pontes, W.J.T., Silva, J.M.O., Câmara, C.A.G., Gondim, M.G.C., Oliveira, J.V., Schwartz, M.O., 2010. E. Chemical composition and acaricidal activity of the essential oils from fruits and leaves of Protium bahianum Daly. Journal of Essential Oil Research, 22, 279 e 282.

Procópio, T.F., Belmonte, B.R., Paiva, P.M.G., Agra-neto, A.C., Pontual, E.V., Napoleão, T.H., 2015. Interferência do extrato aquoso de folhas de *Tradescantia spathacea* na fisiologia nutricional do gorgulho do milho, *Sitophilus zeamais*. Arrudea, 1, 023 e 027.

Rao S. Prasada Kodavanti Bommanna G. Loganathan. 2017. Organohalogen Pollutants and Human Health. Reference Module in Biomedical Sciences International Encyclopedia of Public Health Second Edition, 359–366.

Rathi, J.M. et al. 2008. Qualitative phytochemical screening of some locally available insecticidal plants. Journal of Biopesticides, 1, 52 e 4.

Ribeiro N., Camara C., Ramos C., 2016. Toxicity of essential oils of *Piper marginatum* Jacq. against *Tetranychus urticae* Koch and *Neoseiulus californicus* (McGregor). Chilean journal of agricultural research, 76.

Ricklefs, R.E., 2003. A economia da natureza. 5ª Edição. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Robertson, J.L., Preisler, H.K., 1992. Pesticide bioassays with arthropods. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA 127.

SAS Institute Inc., SAS 9.1.3 Help and Documentation, Cary, NC: SAS Institute Inc., 2002-2004.

Sauvion, N., Charles, H., Febvay, G., Rahbé, Y., 2004. Effects of jackbean lectin (ConA) on the feeding behaviour and kinetics of intoxication of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. Entomologia Experimentalis et Applicata 110, 31 e 44.

Sprawska, I., Goiawska, S., 2010. Effect of the lectin PHA on the feeding behavior of the grain aphid. Journal of Pest Science 83, 149e155.

Suleiman, R., Williams, D., Nissen, A., Bern, C. J., Rosentrater, K.A., 2015. Is flint corn naturally resistant to *Sitophilus zeamais* infestation?. Journal of Stored Products Research 60, 19e24.

Tefera, T., Kanampiu, F., de Groote, H., Hellin, J., Mugo, S., Kimenju, S., Beyene, Y., Boddupalli, P.M., Shiferaw, B., Banziger, M., 2011. The metal silo: an effective grain storage technology for reducing post-harvest insect and pathogen losses in maize

while improving smallholder farmers' food security in developing countries. *Crop Protection* 30, 240e245.

Xie, Y.S., Bodnaryk, R.P., Fields, P.G., 1996. A rapid and simple flour-disk bioassay for testing substances active against stored-product insects. *Canadian Entomology* 128, 865 e 875.

Zakka, U., Lale, N.E.S., Umeozor, O.C., 2015. Efficacy of combining varietal resistance with harvest time and planting date for the management of *Sitophilus zeamais* Motschulsky infestation in stored maize. *J. Stored Prod. Res.* 60, 31e35.

Zhang, X., Liao, X., Mao, K., Zhang, K., Wan, H., Li, J., 2016. Insecticide resistance monitoring and correlation analysis of insecticides in field populations of the brown planthopper *Nilaparvata lugens* (stål) in China 2012– 2014. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 132, 13-20.

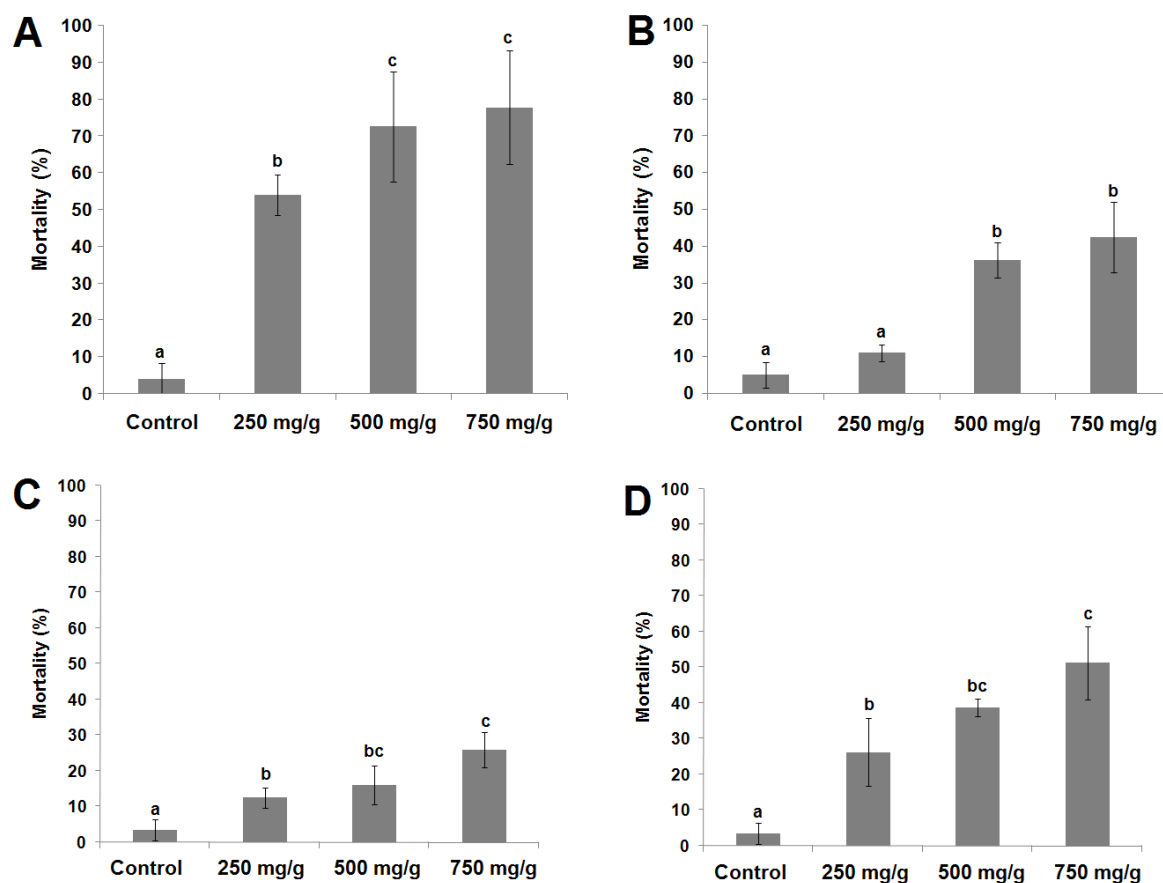


Figura 1 - Taxa de Mortalidade (%) de *Sitophilus zeamais* sob o efeito do: (A) Extrato em acetato de etila estação chuvosa (EAR); (B) Extrato em acetato de etila estação seca (EAd); (C) Extrato em ciclohexano estação chuvosa (CHXr); (D) Extrato em ciclohexano estação seca (CHXd).

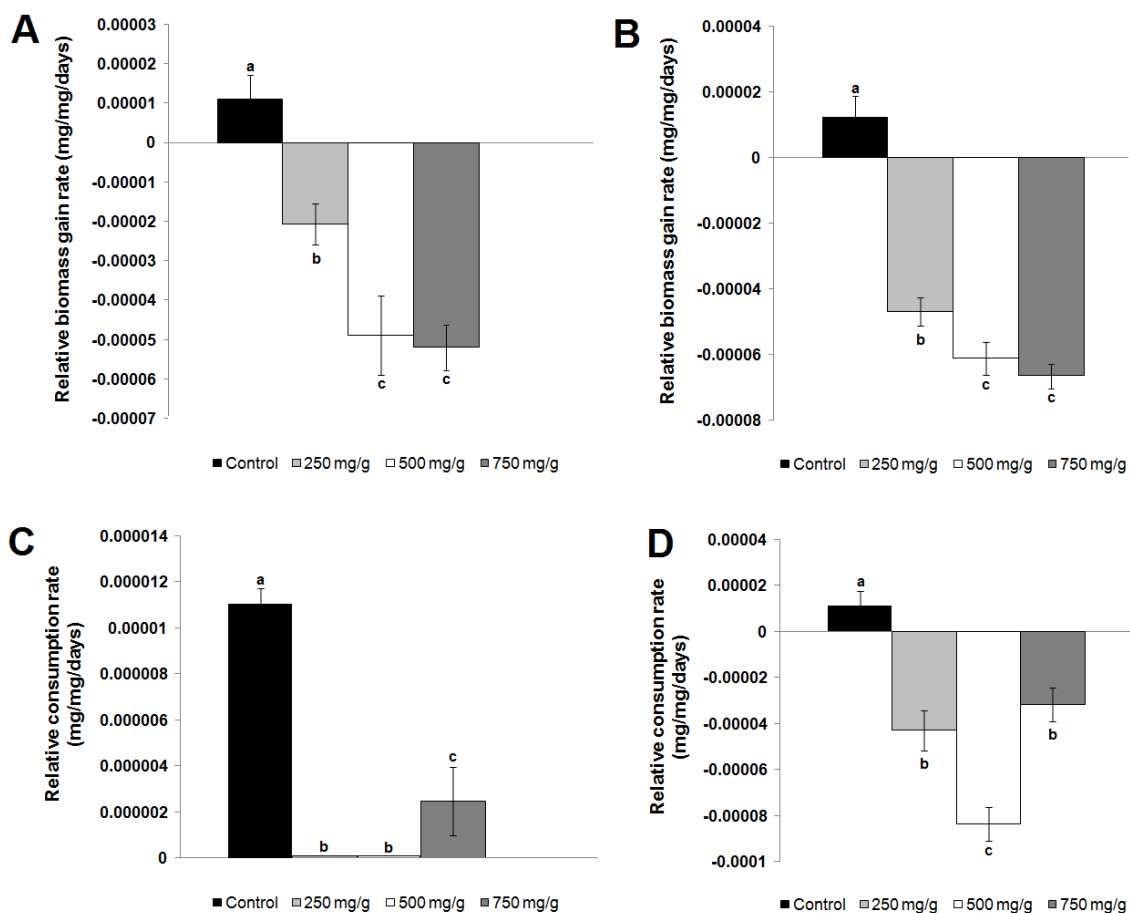


Figura 2 - Parâmetros nutricionais de adultos de *S. zeamais* mantidos em dietas artificiais. (A) Taxa de ganho relativo de biomassa de EAd; (C) Taxa de consumo relativo de EAd; (C) Taxa de ganho relativo de biomassa de EAR; (D) Taxa de consumo relativo de EAR. Le tras diferentes indicam ($P < 0,05$) diferenças significativas entre os tratamentos.

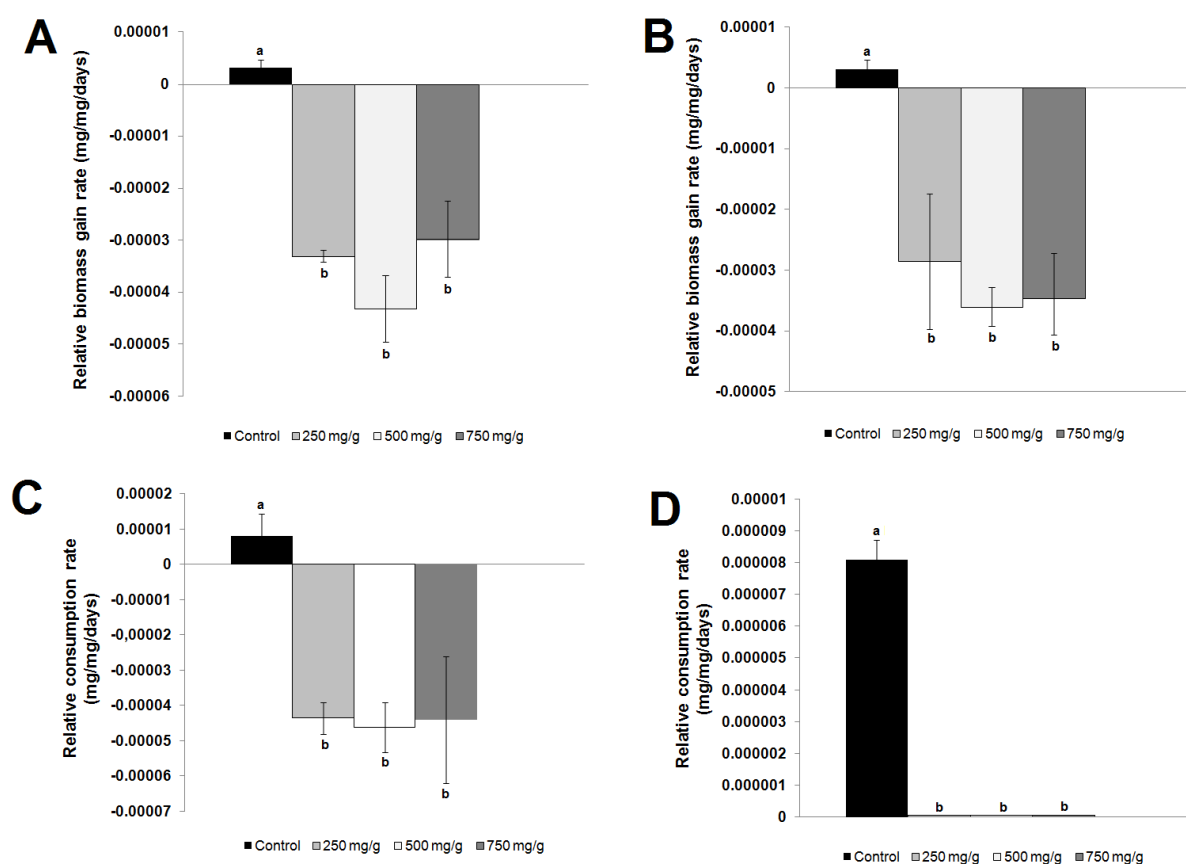
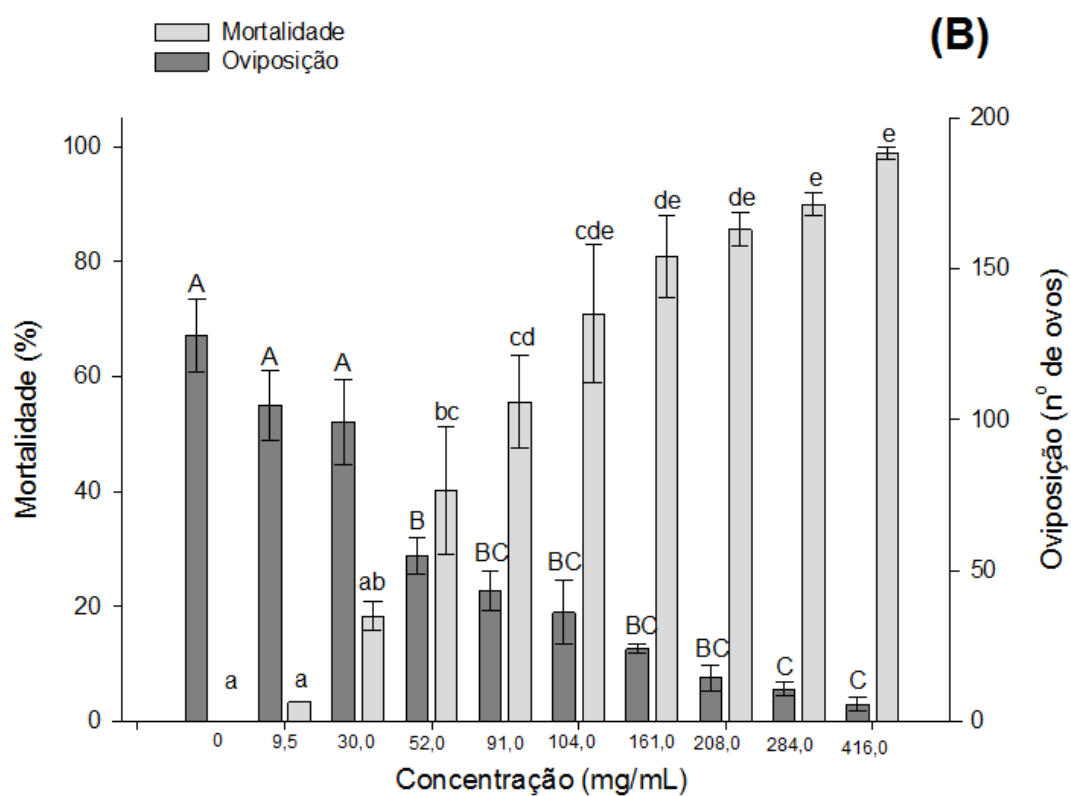
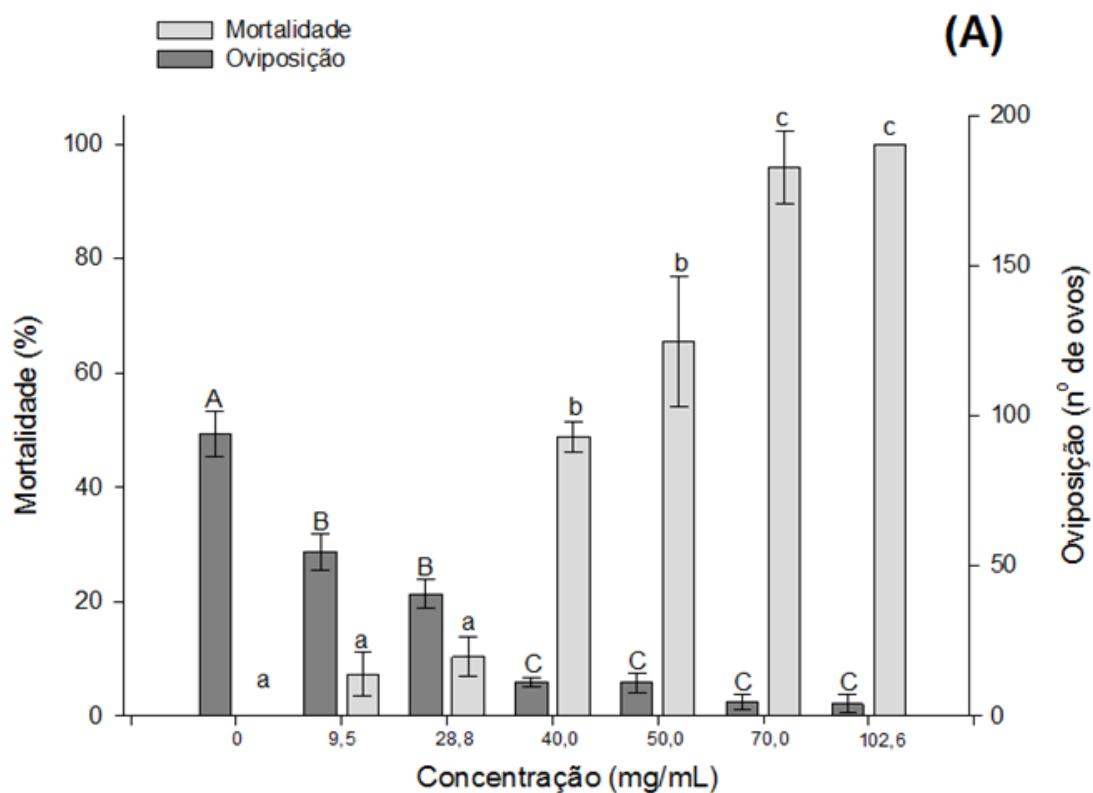


Figura 3 - Parâmetros nutricionais de adultos de *S. zeamais* mantidos em dietas artificiais. (A) Taxa de ganho relativo de biomassa de CHXd; (C) Taxa de consumo relativo de CHXd; (C) Taxa de ganho relativo de biomassa de CHXr; (D) Taxa de consumo relativo de CHXr. Letras diferentes indicam ($P < 0,05$) diferenças significativas entre os tratamentos.

Tabela 1 - Toxicidade por contato residual (CL50 em mg/mL) dos extratos CHXd e EAr das folhas de *Anadenanthera colubrina* sobre *T. urticae*.

Amostra	N	GL	Slope	CL50	χ^2	RT
				(IC 95%)		(IC 95%)
Extrato em Ciclohexânico (CHXd)	40	4	5,61 (5,12 - 6,10)	52,75 (46,28 – 59,86)	7,67	170,71 (150,50 – 193,64)
Extrato em Acetato de etila (EAr)	10	7	2,35 (2,06 – 2,64)	73,27 (65,41 – 81,39)	8,83	237,11 (203,00 – 276,98)
Azamax	30	5	2,46 (2,08 – 2,84)	0,31 (0,28 – 0,35)	8,30	-



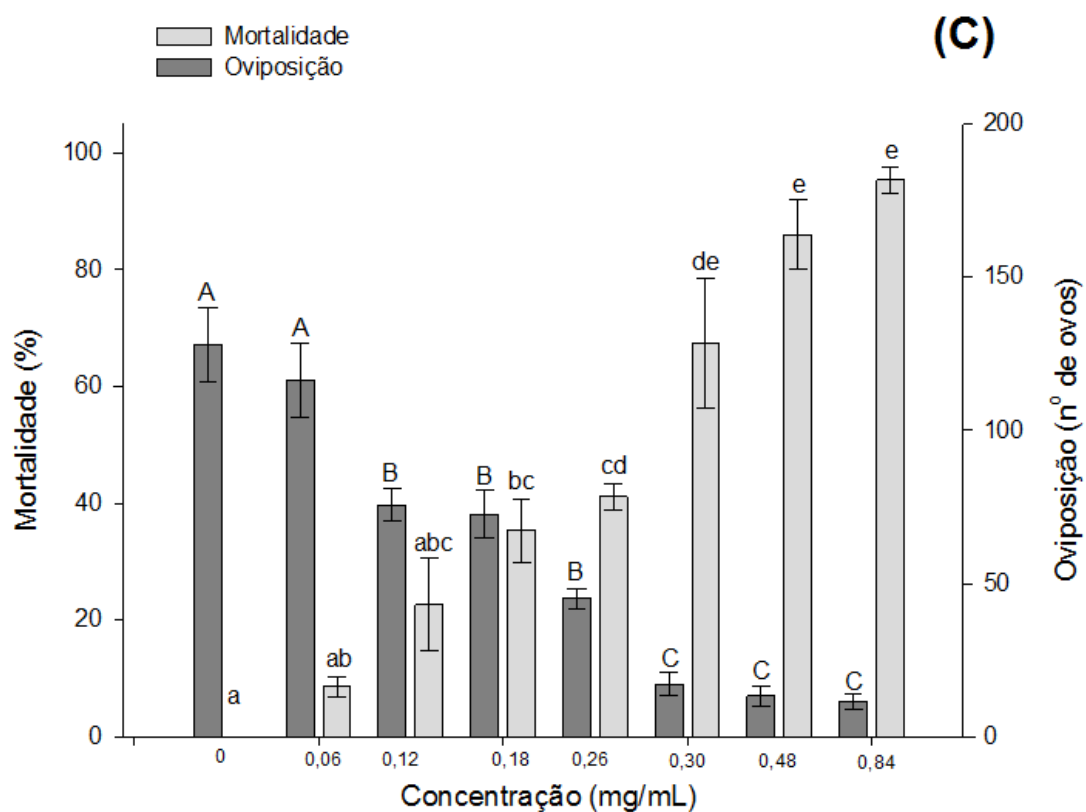


Figura 4 - Mortalidade e oviposição de *T. urticae* em discos de folhas pulverizados com diferentes concentrações de: (A) Extrato ciclohexano estação seca de *A. colubrina*; (B) Extrato Acetato de Etila estação chuvosa de *Anadenanthera colubrina*; (C) Controle com Azamax.

5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nesta tese, podemos concluir que extratos vegetais originados do semiárido de Pernambuco podem ser utilizados como fontes de metabólitos secundários no combate a micro-organismos fitopatógenos.

A atividade dos extratos de *A. colubrina* contra bactérias e fungos fitopatogênicos foi confirmada e pode ser atribuída ao principal composto isolado, neste caso o responsável pelo aumento da atividade antimicrobiana. Esse composto pode ser considerado um bactericida natural contra vários fitopatógenos com importância econômica.

Os extratos das folhas de *A. colubrina* são fontes de compostos com ação deletéria sobre a fisiologia nutricional de adultos de *S. zeamais* e causam alterações na redução da eficiência reprodutiva e da longevidade, afetando o comportamento de fêmeas de *Tetranychus urticae*. Esses extratos têm o potencial de serem utilizados no controle tanto do gorgulho do milho, dissuadindo o consumo e levando os insetos a morte por inanição, como no ácaro rajado, matando os insetos através da ingestão de compostos existentes nos extratos.

REFERÊNCIAS

- ABDELGALEIL, S.A.M., et al. Chemical composition, insecticidal and biochemical effects of essential oils of different plant species from Northern Egypt on the rice weevil, *Sitophilus oryzae* L. **Journal of Pest Science**, vl. 89, n. 1, p. 219-229, 2016.
- ACOSTA-ESTRADA, B. A.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A.; SERNA-SALDÍVAR, S. O. Bound phenolics in foods, a review. **Food chemistry**, vl. 152, p. 46-55, 2014.
- AGEITEC – **Agência Embrapa de Informação Tecnológica** (Temperatura e umidade relativa). Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/bioma_caatinga/arvore/CONT00g798rt3p02wx5ok0wtedt3n17xgwk.html> Acesso em: 10 set. 2016.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. ed 5 th. Elsevier: Academic Press. 5ed. 2005. 922p. ISBN 01-204-4564-6
- AGROFIT. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Coordenação Geral de Agrotóxicos Afins/DFIA/DA. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em 10 fev.2017.
- AGROLINK Disponível em: <http://www.agrolink.com.br/noticias/pragas-causam-perdas-de-ate-r--55-bilhoes-a-agricultura-no-brasil_220429.html> Acesso em: 29 mar. 2017.
- AGUIAR, L.M.M. "**A Arte da Pré-História nos Períodos Paleolítico e Neolítico**"; *Brasil Escola*. Disponível em <<http://brasilecola.uol.com.br/historiag/a-arte-prehistoria-nos-periodos-paleolitico-neolitico.htm>>. Acesso em 29 mar.2017.
- AHARONI, A. et al. Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. **Phytochemistry Reviews**, vl. 5, n. 1, p. 49-58, 2006.
- AJIKUMAR, P. K. et al. Terpenoids: opportunities for biosynthesis of natural product drugs using engineered microorganisms. **Molecular pharmaceuticals**, vl. 5, n. 2, p. 167-190, 2008.
- ALBUQUERQUE, U.P. de et al. Caatinga Biodiversidade e Qualidade de Vida. **Recife: UFRP**, 2010.
- ALTIMARI, L.R. et al. Cafeína e performance em exercícios anaeróbios. **Revista brasileira de ciências farmacêuticas**, São Paulo, vl. 42, n. 1, 2006.
- ALTSCHUL, S.VON.R. A taxonomic study of the genus *Anadenanthera*. **Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University**. n. 193, p. 3-65. 1964.
- ALVES, H. M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, v. 3, p. 10-15. 2001.
- AMBROSANO, E.J. et al. Agricultura ecológica. **O Agrônomo**, vl. 54, n. 2, p. 11-14, 2002.
- ÂNGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos-uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, vl. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

- ANTUNES, L.E.G.; DIONELLO, R.G. 2010. **Bioecologia de *Sitophilus zeamais* Motschulsky 1885 (Coleoptera: Curculionidae)**. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2010_2/Sitophilus/index.htm>. Acesso em: 29 mar.2017.
- APGII. ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. **Botanical Journal of the Linnean Society**, vl. 141, p .399–436, 2003.
- APGIII. ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plantas: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, vl. 161, p. 105-121, 2009.
- ARAÚJO FILHO, J.C. Relação solo e paisagem no bioma caatinga. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA FÍSICA, 14. 2011, Dourados-MS. **Anais...** Dourados: Anpege, 2011. ARAUJO FILHO, J. C. de. Relação solos e paisagem no bioma Caatinga. **Anais do Simpósio Brasileiro de Geografia Física Aplicada. Embrapa Solos. Recife-PE**, 2011.
- ARCOVERDE, J.H.V. et al. Screening of Caatinga plants as sources of lectins and trypsin inhibitors. **Natural product research**, vl. 28, n. 16, p. 1297-1301, 2014.
- ASIF, M.; KHODADADI, E.. Medicinal uses and chemistry of flavonoid contents of some common edible tropical plants. **Journal of paramedical sciences**, vl. 4, n. 3, 2013.
- ASLANI, F., et al. Effects of *Tinospora tuberculata* leaf methanol extract on seedling growth of rice and associated weed species in hydroponic culture. **Journal of Integrative Agriculture**, vl. 15, n. 7, p. 1521-1531, 2016.
- BALI, A. B., et al. Phytotoxicity and weed management potential of leaf extracts of *Callistemon viminalis* against the weeds of rice. **Acta Physiologiae Plantarum**, vl. 39, p .1-25, 2017.
- BARROSO, G. M. et al. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Imprensa Universitária. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999. 443p.
- 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 (AM). **Revista de Ciências Agrárias/Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, vl. 47, n. 1, p. 163-172, 2011.
- BENTHAM, G. Leguminosae. In: BENTHAM, G.; HOOKER, J. D. **Genera Plantarum**. London: Lovell Reeve & Co, vl. 1, 1865.
- BERNARDI, O. et al. Efficiency of neem insecticides in the control of *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, vl. 32, n. 1, p.286-290, 2010.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. **Biocontrole de doenças de plantas. Uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. 332p.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. In: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. Métodos alternativos de controle fitossanitário. Jaguaraúra: Embrapa Meio Ambiente, 2003, 279p.

BHAGWAT, S., HAYTOWITZ, D.B. HOLDEN, J.M. (Ret.). **USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods, Release 3.1.** U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. Nutrient 2013. 1012p.

BOTTON, M. et al. **O gorgulho do milho *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) como praga em frutíferas de clima temperado.** Bento Gonçalves: Embrapa, 2005. Circular Técnica n° 58.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). **Caatinga.** 2016. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga>> Acesso em: 19 ago. 2016.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). **Caatinga.** 2017. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga>>. Acesso em: 02 mar. 2017.

BRASIL. Ministério Do Meio Ambiente (MMA). **Flora do Brasil 2020 em construção.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 05 Abr. 2017

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). **Iniciativas de Conservação.** 2016. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga/iniciativas-de-conserva%C3%A7%C3%A3o>> Acesso em: 22 ago. 2016.

BRASIL. Ministério Do Meio Ambiente (MMA). **Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da Caatinga.** Serviço Florestal. Brasileiro. Brasília-DF, 2010.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition reviews**, vl. 56, n. 11, p.317-333, 1998.

BURGER, M. C.de M. et al. Ácido myrsinoicoA e derivado: inibidores da fotossíntese *in vitro*. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1395-1400, 2012.

CÂNDIDO, J.F.; GOMES, J.M. **Angico vermelho.** Boletim de extensão: 3ª Ed. Imp. Universitária, Viçosa. 1992

CANEPPELE, M. A. B. et al. Correlation between the infestation level of *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera, Curculionidae) and the quality factors of stored corn, *Zea mays* L. (Poaceae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 47, n. 4, p.625-630, 2003.

CARPES, S.T. **Estudo das características físico-químicas e biológicas do Pólen apícola de *Apis Mellifera* L. da região sul do Brasil.** São Paulo: 2008. 255 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

CARRARA, Â.A. O sertão no espaço econômico da mineração. **LPH: Revista de História**, vl. 6, p. 40-48, 1996.

CARVALHO, P.E.R. **Angico branco.** Colombo: Embrapa Florestas, Embrapa Florestas. Circular técnica, v. 56.p.10. 2002.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies arbóreas brasileiras.** Colombo: Embrapa Florestas, v.1. p.1039. 2003

CHAGAS, A.C.S. et al. Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. **Rev Bras Parasitol Vet**, vl. 13, n. 1, p.156-160, 2004.

CHAPMAN & HALL, New York, USA, 2008. 826p. ISBS14-020-4584-0

CHEN, Q. et al. Development of a liquid chromatography–mass spectrometry method for the determination of ursolic acid in rat plasma and tissue: application to the pharmacokinetic and tissue distribution study. **Analytical and bioanalytical chemistry**, vl. 399, n. 8, p. 2877-2884, 2011.

CHEN, Q. F.; LIU, Z. P.; WANG, F. P. Natural sesquiterpenoids as cytotoxic anticancer agents. **Mini reviews in medicinal chemistry**, vl. 11, n. 13, p. 1153-1164, 2011.

CIA, E.; SALGADO, C. L. Doenças do algodoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**, v. 2, 4 ed., São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 41-52.

COUTINHO, H.L.C. Diversidade microbiana e desenvolvimento sustentável: diversidade microbiana e agricultura sustentável. In: WORKSHOP SOBRE BIODIVERSIDADE: PERSPECTIVAS E OPORTUNIDADES TECNOLÓGICAS, 1996, Campinas, SP. Trabalho apresentado no workshop sobre biodiversidade: perspectivas e oportunidades tecnológicas. Campinas, 1996. 17p.

CROTEAU R.; KUTCHAN T. M.; LEWIS N. G. (2000). Natural products (SecondaryMetabolites). Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

D'ARCHIVIO, M. et al. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. **International Journal of Molecular Sciences**, vl. 11, n. 4, p. 1321-1342, 2010

DA SILVA, C. M. A. et al. Antimicrobial activity of several Brazilian medicinal plants against phytopathogenic bacteria. **African Journal of Microbiology Research**, vl.10, p. 578-583, 2016.

DA SILVA, L.M.B.; BARBOSA, D.C.A. Crescimento e sobrevivência de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan (Leguminosae), em uma área de Caatinga. Alagoinha, PE. **Acta Botanica Brasilica**, vl. 14, n. 3, p. 251-261, 2000.

DE MATTOS, P. P.; SEITZ, R. A. Dinâmica de crescimento de angico (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*) no Pantanal Mato-Grossense. **Embrapa Florestas**. Circular técnica, 2005.

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

DE SOUZA, A.R. et al. Seleção e desenvolvimento de *Sitophilus oryzae* (Linné, 1763) em três substratos. **Magistra**, vl. 24, p. 160-163, 2012.

DEQUECH, S.T.B et al. Efeito de extratos de plantas com atividade inseticida no controle de *Microtheca ochroloma* Stal (Col. Chrysomelidae), em laboratório. **Biotemas**, vl. 21, n. 1, p. 41-46, 2008.

DEVAPPA, R. K.; MAKKAR, H. P. S; BECKER, K. *Jatropha diterpenes*: a review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, vl. 88, n. 3, p. 301-322, 2011.

DEWICK, P.M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 1th ed. Chichester John Wiley & Sons, 2002.

DI CARLO, G. et al. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life sciences**, vl. 65, n. 4, p. 337-353, 1999.

DIOUF, E. et al. Phytochemical Screening and Insecticidal Activity of Three Extracts of *Tapinanthus bangwensis* (Engl. Krause) on *Sitophilus zeamais* (Maize Weevil). **Library Journal**, vl. 3, n. 8, p. 1-10, 2016.

DIXON, R. A. Natural products and plant disease resistance. **Nature**, vl. 411, n. 6839, p. 843-847, 2001.

DOYLE, J. J.; CHAPPILL, J. A.; BAILEY, D. C.; KAJITA, T. Towards a comprehensive phylogeny of legumes: evidence from rbcL sequences and non-molecular data. In: HERENDEEN, P. S.; BRUNEAU, A. (Eds.): **Advances in legume systematics**: Royal Botanic Gardens, Kew. p. 1-20. 2000.

DU, L. J. et al. Comparison of flavonoids, phenolic acids, and antioxidant activity of explosion-puffed and sun-dried jujubes (*Ziziphus jujuba* Mill.). **Journal of agricultural and food chemistry**, vl. 61, n. 48, p. 11840-11847, 2013.

DUBEY, V.S.; BHALLA, R.; LUTHRA, R. An Overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. **Journal of Biosciences**, vl. 28, p. 637, 2003.

DZUBAK, H.M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de química nova na escola**, vl. 3, p. 11-15, 2001.

DZUBAK, P. et al. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. **Natural product reports**, vl. 23, n. 3, p. 394-411, 2006.

EHLERS, E. **Agricultura sustentável: origens e perspectivas de um novo paradigma**. São Paulo: Livros da Terra 1996. 178 p.

EMBRAPA 2016. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/tema-controle-biologico/sobre-o-tema>>. Acesso em: 20 fev. 2017.

EMBRAPA 2017. **Cultivo do milho. Sistema de Produção**, 1 ISSN 1679-012X Versão Eletrônica - 7ª edição 2011. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_7_ed/colsecagem.htm> Embrapa Milho e Sorgo. Acesso em: 29 jan. 2017.

Fabaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB115>>. Acesso em: 04 abr. 2017

FACCHINI, P. J.; DE LUCA, V. Phloem-specific expression of tyrosine/dopa decarboxylase genes and the biosynthesis of isoquinoline alkaloids in opium poppy. **The Plant Cell**, vl. 7, n. 11, p. 1811-1821, 1998.

FADINI, M.A.M. et al. **Manejo integrado das principais pragas do morangueiro**. FAEMG Publisher Belo Horizonte, *Boletim do morango: Cultivo convencional, segurança alimentar, cultivo orgânico*, 2006 p. 81-85.

FALKENBERG, M. B; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. 2003. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (orgs). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, p. 230-288.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, vl. 18, n. 1, p. 23-36, 2006.

FAZOLIN, M. et al. Fumigação de milho para o controle do gorgulho utilizando caule de *Tanaecium nocturnum* (Bignoniaceae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, vl. 45, n. 1, p. 1-6, 2010.

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**, vl. 14, n. 1, p. 405, 2014

FERNANDES, O. A.; CARNEIRO, T. R. **Controle biológico de Spodoptera frugiperda no Brasil. Controle Biológico na Prática**, 2006, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), Piracicaba, 2006. 287 p.

FERRAZ, S.; LOPES, E. A.; AMORA, D. X. Controle de fitonematoides com o uso de extratos e óleos essenciais de plantas. **Panorama Atual e Perspectivas na Agricultura**, Belém: PA, 2008

FERRAZ, S.; LOPES, E. A.; AMORA, D. X. Controle de fitonematoides com o uso de extratos e óleos essenciais de plantas. In: POLTRONIERI, L. S.; ISHIDA, A. K. N. (Ed). **Métodos alternativos de controle de insetos-praga, doenças e plantas daninhas**. Panorama atual e perspectivas na agricultura. Belém: EMBRAPA Amazônia Oriental, 2008. 308. p.

FIGUEIREDO, N. L. et al. Phytochemical Analysis of *Plectranthus* sp. Extracts and Application in Inhibition of Dental Bacteria, *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans*. **European Journal of Medicinal Plants**, vl. 4, n. 7, p. 794–809, 2014.

FILHO, R.B. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, vl. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

FINATTI, D.; APARECIDO, C.C. Caracterização fisiológica e comparação de diferentes métodos na preservação, em laboratório, de isolados do gênero *Verticillium*. **Arquivos do Instituto Biológico**, p. 715-720, 2009.

FLETCHER, J. et al. Plant pathogen forensics: capabilities, needs, and recommendations. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, vl. 70, n. 2, p. 450-471, 2006.

FORZZA, R.C. et al. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. 1 ed. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro - Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2012.

FRANCISCO, P.R.M, et al. Mapeamento da Caatinga com Uso de Geotecnologia e Análise da Umidade Antecedente em Bacia Hidrográfica (Mapping of Caatinga with Use of Geotechnology and Analysis of Antecedent Humidity in Hydrographic Basin). **Revista Brasileira de Geografia Física**, vl. 5, n. 3, p. 676-693, 2012.

FREIRE, F. **História territorial do Brasil**. 1º vol. (Bahia, Sergipe e Espírito Santo). Edição fac-similar. Salvador: Governo do Estado da Bahia/Secretaria de Cultura e Turismo/Instituto Geográfico e Histórico da Bahia, 1998.

FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vl. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S et al. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ (Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz), 2002. 920 p. ISBN 85-7133-0011-5

GAMBETA, R. M. **Perfil fitoquímico de diferentes extratos de *Ilex paraguariensis* St. Hilaire**. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI). Erechim, 2008.

GERSON, U.; WEINTRAUB, P. G. Mites (Acari) as a factor in greenhouse management. **Annual review of entomology**, vl. 57, p. 229-247, 2012.

GHINI, R. KIMATI, H. **Resistência de fungos e fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 78 p.

GHOSH, S. et al. Unveiling the mode of action of antibacterial labdane diterpenes from *Alpinia nigra* (Gaertn.) BL Burt seeds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, vl. 66, p. 101-105, 2013.

GIACOBBO, C.L. et al. Emprego de diferentes inseticidas para o controle do gorgulho-do-milho na cultura do pessegueiro. **Revista Brasileira de Agrociência**, vl. 11, p. 63-66, 2005.

GIADA, M.L.R. Food phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidant power. In: MORALES-GONZALEZ, J.A. **Oxidative stress and chronic degenerative diseases – a role for antioxidants**, Rijeka: In Tech, 2013. p. 87-112.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, vl. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOUVÊA, A.C.M.S. **Quantificação das antocianinas majoritárias do açaí por cromatografia líquida de alta eficiência**. 2010. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2010

GRBIĆ, M. et al. The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations. **Nature** vl. 479, p. 487-492, 2011.

GUINET, P.H. **Comparative account of pollen characters in the Leguminosae**. Kew, Royal Botanic Gardens. p. 789-799. part 2, 1981.

GULLAN, P.J ; CRANSTON, P.S. **Os Insetos: Um Resumo de Entomologia**. Editora Roca, São Paulo, 2007, 3º Ed, 440p. ISBN 97-885-7288-9

HAIDA, K. S. et al. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, vl. 11, n. 3, 2007.

HELENO, S. A. et al. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. **Foodchemistry**, vl. 173, p. 501-513, 2015.

HENRIQUES, A.T., LIMBERGER, R.P., KERBER, V.A. E MORENO, P.R.H. (2004) Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. *In*: SIMÕES, C.M.O., Schenkel. E. P., Gosmann, G., Mello, J. C. P., Mentz, L. A., Petrocick, P. R. (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, p. 765-92.

HOG, D. T.; WEBSTER, R.; TRAUNER, D. Synthetic approaches toward sesterterpenoids. **Natural product reports**, vl. 29, n. 7, p. 752-779, 2012.

HORST, R. K. **Westcott's plant disease handbook**. ed. 8th. Springer,

IBAMA, INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE. **Caatinga: projeto de monitoramento do desmatamento dos biomas brasileiros por satélite- PMDBBS, 2011**. Disponível em:

<http://siscom.ibama.gov.br/monitora_biomass/PMDBBS%20-20CAATINGA.html> Acesso em: 02 fev. 2017.

ICMBIO. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. **Parque Nacional do Catimbau**. Disponível em:

<<http://www.icmbio.gov.br/portal/visitacao1/unidades-abertas-a-visitacao/732-parque-nacional-do-catimbau>> Acesso em: 17 ago. 2016.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Foodchemistry**, vl. 126, n. 4, p. 1821-1835, 2011.

IHU Revista do Instituto Humanista Unisinos[on-line]. **Caatinga: Um bioma exclusivamente brasileiro é o mais frágil**, 2012. Disponível

em:<www.ihu.unisinos.br/.../508736caatingaumbiomaexclusivamentebrasileiroeomaisfragil> ISSN 1981-8769 >Acesso em: 15 mar.2017.

INPE. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, Ministério da Ciência, **Tecnologia, Inovações e Comunicações**. Disponível em:

<http://www.inpe.br/noticias/noticia.php?Cod_Noticia=3895> Acesso em: 21.ago.2016.

JAMAL, C.M. O uso de extratos vegetais no controle alternativo da podridão pós-colheita da banana. *In*: SIMPÓSIO NACIONAL DO CERRADO, 4., 2008, Parla Mundi. Brasília, DF. EMBRAPA Cerrados, 2008. p.1-9. Anais do IX Simpósio Nacional do Cerrado, Brasília, DF: EMBRAPA Cerrados, 2008.p. 1-9.

JUNQUEIRA, N.T.V.; JUNQUEIRA, K.P.; BRAGA, M. F.; SILVA, D. G. P. da. 2006. Potencial de defensivos de origem vegetal e mineral para o controle de doenças em

frutíferas tropicais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NATURAIS, 3. Palestras. Embrapa: Belém, p. 158.

KARAKAYA, S. Bioavailability of phenolic compounds. **Critical reviews in food science and nutrition**, vl. 44, n. 6, p. 453-464, 2004.

KILCI, A.; GOCMEN, D. Changes in antioxidant activity and phenolic acid composition of tarhana with steel-cut oats. **Foodchemistry**, vl. 145, p. 777-783, 2014.

KREYCI, P. F.; MENTEN, J.O.M. **A soja turbinada do plantio a colheita**. Caderno técnico cultivar soja. Limitadoras de produtividade Limitadoras de produtividade, USP São Paulo, revista Cultivar Grandes Culturas nº 167, Abril/2013. Disponível em: http://www.agro.basf.com.br/agr/ms/pt_BR/function/conversions:/publish/content/APBrazi/solutions/fungicidas/caderno-limitadoras-de-produtividade Acesso em: 29 mar.2017.

KRÜGER, E.L. Uma abordagem sistêmica da atual crise ambiental. **Revista Desenvolvimento e meio ambiente**. Editora da UFPR, n 4, p. 37-43, 2001

KYLE, J. A. M.; DUTHIE, G. G. Flavonoids in foods. In: Andersen, .M. Markham, K. R. (Ed.) **Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications**. Boca Raton: CRC - Press, 2006. p. 397–411.

LANZOTTI, V.. Diterpenes for therapeutic use. **Natural Products**. Springer Berlin Heidelberg, p. 3173-319, 2013.

LE MARCHAND, L. Cancer preventive effects of flavonoids—a review. **Biomedicine & pharmacotherapy**, vl. 56, n. 6, p. 296-301, 2002.

LEARMONTH, S. Six-spotted mite pest of grapevines and avocados. **Department of Agriculture and Food**, Western Australia's, june 2016. Disponível em: <https://agric.wa.gov.au/n/2857> Acesso em: 02 jan. 2017.

LEITE, L. G. et al. **Nematóides entomopatogênicos no controle de pragas**. In: 2., 2006, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/Universidade de São Paulo, Piracicaba: 287p., 2006.

LEWIS, G. et al. Legumes of the World, Royal Botanic Gardens, Kew, 2005.

LIMA, H.C. de et al. Fabaceae. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: . Acesso em: 10 Fev. 2014.

LOCK, J. M. (eds.). Legumes of the World. **Royal Botanic Gardens, Kew**. 2005.

LOIOLA, M. I. B.; DE ARAÚJO R.A.; DE OLIVEIRA, A. C. P. Caatinga: Vegetação do semiárido brasileiro. **Ecologi@**, vl. 4, p. 14-19, 2012.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 3d. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**, 2000. v.2, 190p.

LORINI, I. **Manual técnico para o manejo integrado de pragas de grãos de cereais armazenados**. 2º ed. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2003. 80 p.

LUCCHESI, G. **Agrotóxicos –construção da legislação**. 1. ed. Brasília, DF: Câmara dos deputados, Consultoria Legislativa, 2005. 10 p.

LUCKOW, M. Tribe Mimoseae. In: LEWIS, G. P.; SCHRIRE, B. D.; MACKINDER, B. A.; LUTZENBERGER, J. A. 1998. **Absurdo da agricultura moderna: do fertilizante químico e agrotóxicos à biotecnologia**. Disponível em: <<http://www.fgaia.org.br/texts/biotec.html>>. Acesso em: 20 dez. 2016.

MACHADO, L. A.; SILVA, V. B.; OLIVEIRA, M.M de. Uso de extratos vegetais no controle de pragas em horticultura. **Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 103-106, 2007.

MAIA, G.N. *Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades*. São Paulo: D&Z Computação Gráfica e Editora, 2004. 413p.

MAIA, P.E.R. **Angico-branco: taxonomia e nomenclatura**. Colombo, *Embrapa Floresta, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, circular técnica*, n. 56, p. 10, 2002.

MANFIO G.P. **Avaliação do estado atual do conhecimento sobre a diversidade microbiana no Brasil**. Relatório Final: Projeto Estratégia Nacional de Biodiversidade. Ministério do Meio Ambiente/GEF/PNUD, 2000.

MARTIN G.S. 12 de agosto de 2010. Disponível em: <<http://www.realmonstrosities.com/2013/07/two-spotted-spider-mite.html>> Acesso em 10 fev. 2017.

MARTINS, M.V. **Leguminosas arbustivas e arbóreas de fragmentos florestais remanescentes no noroeste paulista, Brasil**. São Paulo: 2009. 161 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas Botânica) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

MARUYAMA, W. I. et al. Resistência de genótipos de tomateiro ao ácaro rajado. **Horticultura Brasileira**, vl. 20, n. 3, p. 480-484, 2002.

MARUYAMA, W.I.; TOSCANO, L.C. Tomate: reação aos ácaros. In: Revista Cultivar Hortaliças e Frutas. **Cultivar Hortaliças e Frutas**. vl. 19, p. 15-18, 2003.

MATOS, I. et al. Preventive and therapeutic oral administration of the pentacyclic triterpene α , β -amyrin ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice: the relevance of cannabinoid system. **Molecular immunology**, vl. 54, n. 3, p. 482-492, 2013.

MATTILA, P.; KUMPULAINEN, J. Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vl. 50, n. 13, p. 3660-3667, 2002.

MAZOYER, M.; ROUDART, L. **História das agriculturas no mundo: do neolítico à crise contemporânea**. São Paulo: Editora UNESP; Brasília, DF: NEAD, 2010. 568p.

MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 2. ed. Porto Alegre Florianópolis: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Ed. Universidade Federal de Santa Catarina, 2000, p. 163-179.

MENEZES, E.L.A. **Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola**. Seropédica, Rio de Janeiro: Embrapa Agrobiologia, 2005. 58p.

- MICHEREFF, S. J. **Fundamentos de Fitopatologia: Bactérias como agentes de doenças de plantas**. Universidade Federal Rural de Pernambuco/Departamento de Agronomia, Recife, 2001, p. 44-52.
- MIGEON, A.; DORKELD, F. 2006. **Spider mites web: a comprehensive database for the Tetranychidae**. Disponível em: <<http://www1.montpellier.inra.fr/CBGP/spmweb/index.php>> Acesso em: 20 mar.2017.
- MIOTTO, S.T.S.; LÜDTKE, R.; OLIVEIRA, M.de L.A.A. A família Leguminosae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, vl. 6, n. 3, 2008.
- MONTEIRO, J.M., et al. Use and traditional management of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan in the semi-arid region of northeastern Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, vl. 2, n. 1, p. 7, 2006.
- MORAES G. J., FLECHTMANN C. H. W. **Manual de acarologia: acarologia básica e ácaros de plantas cultivadas no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, 2008. 228p.
- MORAIS L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v.27, p.4050-4063, 2009.
- MORANDI, M.A.B.; PAULA JÚNIOR, T. J. de; BETTIOL, W.; TEIXEIRA, H. Controle biológico de fungos fitopatogênicos. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, vl. 30, n. 251, p. 73-82, 2009.
- MORIM, M.P. Leguminosae arbustivas e arbóreas da floresta atlântica do Parque Nacional do Itatiaia, sudeste do Brasil: padrões de distribuição. **Rodriguésia**, vl. 57, n. 1, p. 27-45, 2016.
- MORIM, M.P. *Anadenanthera* in: **Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB18073>>. Acesso em: 10 set. 2016.
- MUFFLER, K. et al. Biotransformation of triterpenes. **Process Biochemistry**, vl. 46, n.1, p. 1-15, 2011.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, vl. 1054, n. 1, p. 95-111, 2004.
- NAYUDU, M. V. *Pseudomonas viticola* sp. nov., incitant of a new bacterial disease of grape vine. **Journal of Phytopathology**, vl. 73, n. 2, p. 183-186, 1972.
- NIERO, R.; MALHEIROS, A. Principais Aspectos Químicos e Biológicos de Terpenos. In: Cechinel Filho, V.; Yunes, R. A. (eds.). *Química de Produtos Naturais, Novos Fármacos e a Moderna Farmacognosia*, Editora Univali, Capítulo X, p. 239-257, 2007.
- NIERO, R.; MALHEIROS, A. **Terpenóides**. In: YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. (Org.) *Química de produtos naturais: novo fármaco e a moderna farmacognosia*. 3. Ed. UNIVALI: Itajaí, 2012.

OJALA, T. **Biological Screening of Plant Coumarins**. Academic Desertation, Division of Pharmacognosy, Department of Pharmacy, Faculty of Science, University of Helsinki, 2001.

OKUNADE, A.L.; ELVIN-LEWIS, M.P.F; LEWIS, W.H. Natural antimycobacterial metabolites: current status. **Phytochemistry**, vl. 65, n. 8, p. 1017-1032, 2004.

OLIVEIRA Jr., P. H. B. **Notas sobre a história da agricultura através do tempo**. Rio de Janeiro, Projeto Tecnologia Alternativas-FASE, 1989. 72 p.

OLIVEIRA, D.M.T. **Análise morfológica comparativa de frutos, sementes, plântulas e plantas jovens de 30 espécies arbóreas de Fabaceae ocorrentes no Estado de São Paulo**. São Paulo: 1997. 212 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

OLIVEIRA, J.R. **Detecção de *Xanthomonas campestris* sp. *Vesicatoria* em sementes de tomateiro**. Viçosa MG: 1995. 98 f. Tese (Doutorado em fitopatologia) Universidade Federal de Viçosa, 1995.

OLIVEIRA, R.B., GODOY, S.A.P., COSTA, F.B. **Plantas tóxicas: conhecimento e prevenção de acidentes**. Ribeirão Preto – SP: Editora Holos, 2003. 64p.

OLIVER, J.; PALOU, A. Chromatographic determination of carotenoids in foods. **Journal of chromatography A**, vl. 881, n. 1, p. 543-555, 2000.

OPAS ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE **Manual de vigilância de saúde de populações expostas a agrotóxicos**. Ministério da Saúde, Brasília, 1997.

PASCHOAL, A.D. **Pragas, praguicidas e a crise ambiental: problemas e soluções**. Rio de Janeiro. Fundação Getulio Vargas, 1979. 102p.

PAVELA, R., et al. Oviposition inhibitory activity of the Mexican sunflower *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) polar extracts against the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* (Tetranychidae). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, p.1-8, 2016.

PAZ, M. et al. Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. **Food chemistry**, vl. 172, p. 462-468, 2015.

PEEL, M. C.; FINLAYSON, B. L.; MCMAHON, T. A. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. **Hydrology and earth system sciences discussions**, vl. 4, n. 2, p. 439-473, 2007.

PEREIRA FILHO, J. M., et al. Disponibilidade de fitomassa do estrato herbáceo de uma caatinga raleada submetida ao pastejo alternado ovinocaprino. **Livestock Research for Rural Development**, vl. 19, n. 2, 2007.

PEREIRA, Á. I. S. et al. Atividade antimicrobiana no combate às larvas do mosquito *Aedes aegypti*: homogeneização dos óleos essenciais do linalol e eugenol. **Educación química**, vl. 25, n. 4, p. 446-449, 2014.

PEREIRA, D.M. et al. Phenolics: From chemistry to biology. **Molecules** vl. 14, p. 2202-2211, 2009.

PERES, L. E. P. **Metabolismo Secundário**. Piracicaba – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/Universidade de São Paulo, p. 1-10. 2004.

PEROMBELON, M.C.M.; KELMAN, A.. Ecology of the soft rot erwinias. **Annual review of phytopathology**, vl. 18, n. 1, p. 361-387, 1980.

PHILLIPS, M. A. et al. The plastidial MEP pathway: unified nomenclature and resources. **Trends in plant science**, vl. 13, n. 12, p. 619-623, 2008.

PIASECKA, A.; JEDRZEJCZAK-REY, N.; BEDNAREK, P. Secondary metabolites in plant innate immunity: conserved function of divergent chemicals. *New Phytologist*, vl. 206, n. 3, p. 948-964, 2015.

PINO, O.; SÁNCHEZ, Y.; ROJAS, M.M. Metabolitos secundarios de origen botánico como una alternativa en el manejo de plagas. I: Antecedentes, enfoques de investigación y tendencias. **Revista de Protección Vegetal**, vl. 28, n. 2, p. 81-94, 2013.

PINTO, A.C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química nova**, vl.25, n.1, p. 45-61, 2002.

POLATOĞLU, K., et al. Insecticidal activity of *Salvia veneris* Hedge. Essential oil against coleopteran stored product insects and *Spodoptera exigua* (Lepidoptera). **Industrial Crops and Products**, vl. 97, p. 93-100, 2017.

POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H. & STIRTON, C. H. Evolution and systematics of the Leguminisae. In: POLHILL, R. M; RAVEN, P. H (Eds). *Advances in Legume Systematics – part 1*. Royal Botanic Gardens Kew, p. 1-26. 1981.

POTENZA, M. R. 2004. Produtos naturais para o controle de pragas. **Anais da X Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico: Café**. Mooca, SP. p:89-100.

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.

PRATES, H.T.; VIANA, P.A.; WAQUIL, J.M. Activity of neem tree (*Azadirachta indica*) leaves aqueous extract on *Spodoptera frugiperda*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, vl.38, n.3, p. 437-439, 2003.

QUEIROZ, L.P. *Leguminosas da Caatinga*. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana/Royal Botanic Gardens, Kew, Associação Plantas do Nordeste, 2009, p. 443.

QUIDEAU, S. et al. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, vl. 50, n. 3, p. 586-621, 2011.

RAMALHO, C, I., et al. Flora arbóreo-arbustiva em áreas de caatinga no semiárido baiano, Brasil. **Revista Caatinga**, vl. 22, n. 3, p. 182-190, 2009.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, vl. 29, n. 4, p. 755, 2006.

RATTAN, R. S. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. **Crop protection**, vl. 29, n. 9, p. 913-920, 2010.

RAY, R. C.; RAVI, V. Post harvest spoilage of sweetpotato in tropics and control measures. **Critical reviews in food science and nutrition**, vl. 45, n. 7-8, p. 623-644, 2005.

RÊGO JÚNIOR, N. O., et al. Compostos bioativos e atividade antioxidante de extratos brutos de espécies vegetais da caatinga. **Brazilian Journal of Food Technology**, vl. 14, n. 1, p. 50-57, 2011.

REITZ, R.; KLEIN, R.M.; REIS, A. Projeto madeira do Rio Grande do Sul. **Porto Alegre: Secretaria de Agricultura e Abastecimento**, p. 527, 1988.

RHOURLI-FRIH, B. et al. Pentacyclic triterpenes from *Manilkara bidentata* resin. Isolation, identification and biological properties. **Fitoterapia**, vl.88, p. 101-108, 2013.

RIBEIRO, N., CAMARA, C., RAMOS, C. Toxicity of essential oils of *Piper marginatum* Jacq. against *Tetranychus urticae* Koch and *Neoseiulus californicus* (McGregor). **Chilean journal of agricultural research**, vl.76, n.1, p. 71-76, 2016.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free radical biology and medicine**, vl.20, n.7, p. 933-956, 1996.

RIEGELHAUPT, E. M.; PAREYN, F. G. C. **A Questão Energética**. In: Uso Sustentável e conservação dos recursos florestais da caatinga. Serviço Florestal Brasileiro, Brasília: 2010.

RIJO, P. et al. (2009).

Antioxidant activity of two abietan diterpenoids from *Plectranthus* spp. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10400.9/912>> a 27-10-2016. Acesso em 27 nov. 2016.

ROBBINS, R. J. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. **Journal of agricultural and food chemistry**, vl. 51, n. 10, p. 2866-2887, 2003.

ROCHA, G. G. Fitopatologia. 2013. 60 p. Disponível em: <http://www.ifcursos.com.br/sistema/admin/arquivos/14-39-41-postilafitopatologia.pdf>. Acesso em: 13 jan. 2017.

RODRIGUES, E. et al. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de gengibre e eucalipto *in vitro* e em fibras de bananeira infectadas com *Helminthosporium* sp. **Acta Science Agronomy, Maringá**, vl. 28, n. 1, p. 123-127, 2006.

RODRIGUES, N.M. **Potencialidades e impactos ambientais no Parque Nacional do Catimbau e sua Zona de amortecimento**. Pernambuco: 2006. 106 f. Dissertação (Mestrado em Gestão e Políticas Ambientais) Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) Recife.

SANDHAR, H. K. et al. A review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, vl. 1, n. 1, p. 25-41, 2011.

SANTOS, N.Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto Contexto Enfermagem**, vl. 13, p. 64-70, 2004.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. in: SIMÕES, C.M.O *et al.* farmacognosia: da planta ao medicamento. Universidade/UFRJ/EDDA/UFSC Porto Alegre, 1999.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre, Editora da Universidade Federal Santa Catarina, 2004. p. 403-434.

SATO, M.E. et al. Seleções para resistência e suscetibilidade, detecção e monitoramento da resistência de *Tetranychusurticae* ao acaricida clorfenapir. **Bragantia**, vl. 66, n. 1, p. 89-95, 2007.

SATO, M.E. et al. Toxicidade diferencial de agroquímicos a *Neoseiuluscalifornicus* (McGregor) (Acari: Phytoseiidae) e *Tetranychusurticae* Koch (Acari: Tetranychidae) em morangueiro. **Neotropical Entomology**, vl. 31, n. 3, p. 449-456, 2002.

SCHMIDT, T. J. et al. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases-part II. **Current medicinal chemistry**, vl. 19, n. 14, p. 2176-2228, 2012.

SERTOX, 2017. Disponível em: <www.sertox.com.ar/img/item_full/Colchicine.jpg>. Acesso em 14/05/2017.

SILVA, A.C.; CARVALHO, G.A. Manejo integrado de pragas. In: ALVARENGA, M.A.R.(Ed.). **Tomate: produção em campo, em casa de vegetação e em hidroponia**. Lavras:UFLA, 2004, p. 391.

SILVA, E. M. et al. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **FoodChemistry**, vl. 101, n. 3, p. 1012-1018, 2007.

SILVA, F.C.; DUARTE, L.P.; VIEIRA FILHO, S.A. Celastráceas: fontes de triterpenos pentacíclicos com potencial atividade biológica. **Revista Virtual de Química**, vl. 6, p. 1205-1209, 2014.

SILVA, J. M. da, et al. Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. **Ciência & saúde coletiva**, vl. 10, n. 4, p. 891-903, 2015.

SILVA, J.M. da, et al. Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. **Ciência & saúde coletiva**, vl. 10, n. 4, p. 891-903, 2005.

SILVA, M. B.; ROSA, M. B.; BRASILEIRO, B. G.; ALMEIDA, V.; SILVA, C. C. A. Desenvolvimento de produtos à base de extratos de plantas para o controle de doenças de plantas. In: VENEZON, M.; PAULA JR., T. J.; PALLINI, A. (Eds.). **Controle alternativo de pragas e doenças**. Viçosa: EPAMIG/CTZM, 2005. p.221- 246.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 5ª edição. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC: Porto Alegre/Florianópolis, 2010.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. 6ª edição. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC: Porto Alegre/Florianópolis 2010, 1102 p.

SINDIVEG 2016. Disponível em: <<http://sindiveg.org.br/ed-12-fevereiro-2016-balanço-previo-do-setor-de-agroquimicos-aponta-queda-de-23-em-2015/>>. Acesso em: 20 fev. 2017.

SIQUEIRA FILHO, J.A. **A Floradas caatingas do Rio São Francisco**: histórias e conservação. Rio de Janeiro: Editora Jakobson, 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.

SNE. SOCIEDADE NORDESTINA DE ECOLOGIA. *Projeto Técnico para a Criação do Parque Nacional do Catimbau/PE*. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente de Pernambuco – SECTMA, Recife. 2002

SOUZA, A.R.; SILVA, T.M.; SANTOS, J.F.L. Seleção e desenvolvimento de *Sitophilusoryzae* (Linné, 1763) em três substratos. **Magistra**, v. 24, p. 160-163, 2012.

SOUZA, C.D.; FELFILI, J.M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás. **Acta Botânica Brasileira**, vl. 20, p. 135–145, 2006.

SOUZA, E.R. de. **Estudos filogenéticos na tribo Ingeae (Leguminosae: Mimosoideae) com ênfase em Calliandra Benth. e gêneros afins**. Bahia: 2007. 110 f. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia.

SOUZA, N.M.; SOUZA, L.A.G. Levantamento do potencial de aproveitamento das leguminosas no distrito da Barreira do Andirá, Barreirinha, AM. **Enciclopédia Biosfera-Centro Científico Conhecer**, Goiânia, vl. 7, n. 12, 2011.

STRANGE, R. N. **Introduction to plant pathology**. Chichester. Wiley, 2003. 464p. ISBN 04-708-4973-8

STRANGE, R. N.; SCOTT, P.R. Plant disease: a threat to global food security. **Annu. Rev. Phytopathol.**, vl. 43, p. 83-116, 2005.

SUGAYAMA, R. L. et al. **Defesa vegetal: fundamentos, ferramentas, políticas e perspectivas Belo Horizonte**. 1 ed. Belo Horizonte, SBDA: Sociedade Brasileira de Defesa Agropecuária, p. 183-203, 2015.

TABARELLI, M.; SILVA, J. M.C; FONSECA, M. T.; LINS, L. V. **Áreas e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Caatinga**. In: LEAL, I. R.; TABARELLI M.; SILVA, J. M. C. **Ecologia e Conservação da Caatinga**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2003. 382 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.

TAVARES, M.A.G.C. **Bioatividade da erva-de-santa-maria, *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae), em relação a *Sitophilus zeamais* Mots., 1855 (Col.: Curculionidae)**. São Paulo: 2002. 59 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura (ESALQ), Universidade de São Paulo, Piracicaba.

TEFERA, T. et al. The metal silo: An effective grain storage technology for reducing post-harvest insect and pathogen losses in maize while improving smallholder

farmers' food security in developing countries. **Crop Protection**, vl. 30, n. 3, p. 240-245, 2011.

TILMAN, D. et al. Forecasting agriculturally driven global environmental change. **Science**, vl. 292, p. 281-284, 2001

TURINA, A. del. V. et al. Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. **Biophysical chemistry**, vl. 122, n. 2, p. 101-113, 2006.

UEFUJI, H. et al. cloning and functional characterization of three distinct N-methyltransferases involved in the caffeine biosynthetic pathway in coffee plants. **Plant Physiology**, vl. 132, p. 372-380, 2003.

VALLE, A. E. et al. Leguminosaceae. In: GIULIETTI, A. M.; QUEIROZ, L. P. de. Plantas da Caatinga: Perfil Botânico, Fitoquímica e Atividade Biológica. **Associação plantas do Nordeste**, Recife, vl. 4. 2006.

VEIGA, J.E. **O desenvolvimento agrícola: uma visão histórica**. 1ª Ed São Paulo, Edusp-Hucitec, 1991. 21 p.

VILARINHO, M.K. **Inseticidas químicos e extratos vegetais aquosos no controle de *Sitophilus zeamais* em grãos de milho sob condições de armazenamento**. Mato Grosso: 2012. 71f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) Universidade Federal do Mato Grosso.

VISOTTO, L.E.; Avanços tecnológicos aplicados à pesquisa na produção vegetal. **Universidade federal de viçosa**, p 556, 2015.

VIZOTTO, M.; KROLOW, A.C.; WEBER, G.E.B. **Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância**; Embrapa Clima Temperado. Documentos, 316. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. 16 p.

VOLP, A.C.P. et al. Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. **Rer Bras Nutr Clin**, vl. 23, n. 2, p. 141-9, 2008.

VRANOVÁ, E.; COMAN, D.; GRUISSEM, W. Structure and dynamics of the isoprenoid pathway network. **Molecular plant**, vl. 5, n. 2, p. 318-333, 2012.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. **Thin Layer Chromatography in Phitochemistry**. Vol.99. Chromatographic Science Series, 2008.

WINCK, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food chemistry**, vl. 99, n. 1, p.191-203, 2006.

XU, R.; FAZIO, G. C.; MATSUDA, S.P.T. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. **Phytochemistry**, vl. 65, n. 3, p. 261-291, 2004.

YANG, B. et al. Cembrane diterpenes chemistry and biological properties. **Current Organic Chemistry**, vl. 16, n. 12, p. 1512-1539, 2012.

YANG, C. S. et al. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annual review of nutrition**, vl. 21, n. 1, p. 381-406, 2001.

YANG, L. et al. Sorghum phenolics demonstrate estrogenic action and induce apoptosis in nonmalignant colonocytes. **Nutrition and cancer**, vl. 64, n. 3, p. 419-427, 2012.

YANG, L.; STÖCKIGT, J. Trends for diverse production strategies of plant medicinal alkaloids. **Natural product reports**, vl. 27, n. 10, p. 1469-1479, 2010.

YAO-LAN, L. et al. Antiviral activities of flavonoids and organic acid from *Trollius chinensis* Bunge. **Journal of ethnopharmacology**, vl. 79, n. 3, p. 365-368, 2002.

ZHANG, Y. et al. Phenolic compositions and antioxidant capacities of Chinese wild mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruits. **Food Chemistry**, vl. 145, p. 674-680, 2014.

ZUANAZZI, J .A. S. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade, 2000, p. 489-515

APÊNDICE

APÊNDICE A - ARTIGO PUBLICADO EM JUNHO DE 2016.

Full Length Research Paper

Syagrus coronata* seed oils have antimicrobial action against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus

Cibele Maria Alves da Silva Bessa¹, Rodrigo Santana do Nascimento¹, Renata Carla Corrêa Alves^{1*}, José Matias Anselmo², Ana Paula Sant'Anna da Silva¹, Alexandre Gomes da Silva^{1,2}, Vera Lúcia de Menezes Lima¹, Josean Fachine Tavares³, Luís Cláudio Nascimento da Silva^{1,2}, Márcia Vanusa da Silva¹ and Maria Tereza dos Santos Correia¹

¹Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, Cidade Universitária, 1235, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil.

²Faculdade Pernambucana de Saúde, Av. Jean Emile Favre, 420, Imbiribeira, 51200-060, Recife, Pernambuco, Brazil.

³Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, Castelo Branco, 58051-970, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

Received 15 March, 2016; Accepted 20 May, 2016

Syagrus coronata (Mart.) Becc. (Arecaceae) is a native Brazilian palm (*ouricuri*) and despite the use of its derived products by traditional communities, few scientific reports have been published regarding its biomedical activity. This study investigates the chemical composition and anti-*Staphylococcus aureus* effects of both manufactured oil (SCO) and essential oil (SCEO) from *S. coronata* seeds. SCO was provided by rural inhabitants, while SCEO was obtained by hydrodistillation. Chemical characterization was performed by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). *In vitro* antimicrobial activity was determined against 17 *S. aureus* strains, including multidrug-resistant strains. Eleven compounds were detected in the SCEO, octanoic (28.61%) and dodecanoic acids (22.97%) were the major constituents. On the other hand, nineteen fatty acids (FA) were identified in the SCO, the major ones were dodecanoic acid (41.58%) and 9-octadecenoic acid (23.81%). Both oils showed strong activity against all tested strains. Most strains (68.75%) were sensitive to SCEO at minimum inhibitory concentrations (MIC) between 0.002 and 0.01 µL/mL; and minimum bactericidal concentrations (MBC) ranging from 0.002 to 0.312 µL/mL. SCO inhibited the growth of 52.94% of strains with MIC between 0.16 and 0.625 µL/mL. MBC values for SCO were between 0.16 and 5 µL/mL; however, 47.05% of isolates were killed by 2.5 µL/mL of SCO. These results encourage further research into the toxicological and pharmacological aspects of SCO and SCEO. Such work would likely support their use in the development of new antimicrobial agents for the pharmaceutical, food and cosmetic industries.

Key words: Coating, essential oil, anti-*Staphylococcus aureus*, natural products.

INTRODUCTION

Bacteria, with their increasing drug resistance and their capacity to spread around the world, have become the most complex threats to a global public health system that is increasingly in need of effective antimicrobial

treatments (Gould et al., 2012). Among human and animal pathogens, *Staphylococcus aureus* is of particular concern due to its ability to express a variety of virulence factors that facilitate cell adhesion, immune evasion, host

cell damage, and provoke symptoms of disease (Du Toit et al., 2014). Furthermore, *S. aureus* strains have developed increased resistance to antimicrobial agents. In fact, methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) and multidrug-resistant *S. aureus* (MDRSA) have been found to be the major cause of hospital-acquired infections (Davis et al., 2013).

The use of plants or their derived products (extracts, oils, infusions, etc.) to treat infections is an age-old practice in many parts of the world, especially in developing countries such as Brazil, where folk medicine is widely used for a variety of diseases (Nascimento et al., 2013). These plant materials apparently have less toxicity compared to synthetic drugs, which make them attractive candidates for drug development. Brazil is the fifth-largest country in the world and is characterized by a huge biological and cultural diversity. Amongst Brazilian biomes, one in particular stands out for being exclusively Brazilian: the Caatinga, which occupies a large portion of the Brazilian Northeast. The Caatinga is marked by an accentuated dryness (rainfall is usually less than 900 mm/year) and is, therefore, considered a semi-arid region. It supports a great diversity of plant species (Albuquerque et al., 2012). As a result of the environmental conditions to which they are exposed, Caatinga plants have developed interesting chemical features, some of which have been described as excellent weapons against microorganisms (Castelo Branco Rangel de Almeida et al., 2012; Oliveira et al., 2012; Da Silva et al., 2013).

Paradoxically, the Caatinga ecosystem harbors many under-utilized plant species with biotechnological and economic potential. *Syagrus coronata* (Mart.) Becc. (Arecaceae), a palm species native to the Brazilian semi-arid and cerrado regions, is a good example of this situation. This species is popularly known as *licuri* or *ouricuri* and its derived products have played a vital role in the diet and subsistence economy of traditional communities of the Brazilian Northeast region. Nevertheless, few scientific reports have been published regarding the biomedical activity of *S. coronata*. Recent studies have demonstrated that crude extracts or fractions of this plant have anti-*Leishmania amazonensis* (Rodrigues et al., 2011), antimicrobial (Hughes et al., 2013), and antioxidant (Belviso et al., 2013) activities. Specifically, oils from *S. coronata* have been evaluated for use as biodiesel (Teixeira da Silva de La Salles et al., 2010) and topical emulsion (Leal et al., 2013).

This study provides the chemical characterization and reports the anti-*S. aureus* activity of two oils from seeds of *S. coronata*. The first seed oil is a commercial available and is extracted by traditional rural inhabitants

of Catimbu National Park, a national park of Brazil for Caatinga preservation. The second is an essential oil extracted in our laboratory. This is the first report of the chemical profile of an essential oil from *S. coronata* and antimicrobial activity of both materials.

MATERIALS AND METHODS

Plant

Samples of fruits were collected at Catimbu National Park (Pernambuco, Brazilian Northeast) in mature fruit stage, during the month of March 2013. The identification of this material was made by Dr. Alexandre Gomes da Silva, and a voucher specimen (IPA 86950) was deposited at the Agronomic Institute of Pernambuco (IPAPE). The seeds were removed from mature fruits and dried (at 33°C) in an open area with active ventilation until constant weight was attained (three weeks). Lastly, the seeds were ground using a household grinder.

Extraction and analysis of the essential oil from *S. coronata* seeds (SCEO)

Samples of *S. coronata* seeds (250 g) were submitted to hydrodistillation for 4 h, in a Clevenger-type apparatus. The oils were dried over anhydrous Na_2SO_4 . The oils were stored at 4°C until further analysis. All experiments were done in triplicate and results were expressed in terms of dry mass. The main constituents were analyzed by GC/MS, which were performed in the EI mode on a Hewlett Packard-6890 GC system with a fused capillary column (30 m X 0.25 mm X 0.25 μm , HP-5MS, Crossbond 5% phenyl/95% dimethylpolysiloxane) directly coupled to a Hewlett Packard 5973 selective mass detector. The mass spectrometer was operated at 70 eV. The constituents of the essential oils were identified by comparison of their mass spectral pattern and retention indices (RI) with those reported in the literature (Adams, 2009).

S. coronata seed oil (SCO) and its fatty acid composition

The commercial oil from seeds of *S. coronata* was kindly provided by traditional rural inhabitants of Catimbu National Park in March 2013. Fatty acid methylation was performed by the saponification and esterification procedure described by Metcalfe et al. (1966). Dosage of methyl esters was achieved using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS). A GC/MS/QP 2010 Shimadzu Instrument was used, equipped with a capillary column of type HP5 MS, 30 mm long by 250 μm internal diameter; the thickness of the film was 0.250 μm . The temperature of the injector was 250°C. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 0.8 mL/min, the injection mode was Split 50:1 and the temperature

*Corresponding author. E-mail: mtscoreia@gmail.com. Tel: +55 (81) 2126-8547. Fax: +55 (81) 2126-8576.

program was set at 150 to -240°C (5°C/min).

Isolation, Identification and resistance profile of *S. aureus* isolates

Sixteen *S. aureus* strains were isolated from samples processed in the microbiology laboratories of referral health care institutions in Recife (Pernambuco, Brazil) between September and December 2012. The isolates were cultured on sheep blood agar and the phenotypic identification of *S. aureus* was based on colony morphology, Gram stain, positive plasma coagulase reaction (slide and tube test) and growth in mannitol salt agar (positive colonies changed the medium color from red to yellow).

The antibiotic-susceptibility profile of isolates was performed using a disc diffusion assay on Mueller-Hinton agar (MHA) according to the recommendations of CLSI (2011). In brief, each *S. aureus* isolate was grown overnight on Mueller-Hinton agar at 37°C and the colonies were suspended in sterile saline water equivalent to 0.5 McFarland standard. The suspension (100 µL) was spread over a medium plate and an antibiotic disk was applied aseptically onto the surface. Afterwards, the plates were incubated at 37°C for a period of 24 h. The antibiotics used were erythromycin, clindamycin, oxacillin, penicillin, linezolid, tetracycline, vancomycin, chloramphenicol and gentamicin. The multiple antibiotic resistance (MAR) index was calculated as previously described by Krumpal (1983) using the formula $MAR = x/y$, where "x" is the number of antibiotics to which the isolate demonstrated resistance and "y" is the total number of antibiotics tested.

Determination of minimal inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC)

The antimicrobial activity was determined using broth microdilution assay against all sixteen *S. aureus* strains identified in this work and a standard *S. aureus* strain (UFPEA 02), which was provided by the Culture Collection from Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco (UFPEA). Solutions of both oils used in the antimicrobial assays were obtained according to the following procedure: 400 µL of the SCEO or SCO were mixed with 40 µL of Tween 80 and 5 mL of sterile water (q. s. f.) in a sterile tube and shaken using a vortex (Farnem). After 5 min, solutions with a final concentration of 80 µL/mL were obtained from both samples, SCEO or SCO.

MIC was determined by the microdilution method (CLSI, 2011). Two-fold serial dilutions of each solution containing SCEO or SCO (40 to 0.002 µL/mL) were prepared in Mueller-Hinton broth (MHB) and 10 µL of bacterial suspension (approximately 1.5×10^8 CFU/mL) were added. The samples were incubated for 24 h at 37°C. Resazurin solution (0.01%) was used as an indicator by color change visualization: any color changes from purple to pink were recorded as bacterial growth. The lowest concentration at which no color change occurred was taken as the MIC. Afterwards, cultures were seeded in MHA and incubated for 24 h at 37°C to determine the minimum bactericidal concentration (MBC), which corresponds to the minimum concentration of the sample that eliminated the bacteria.

Statistical analysis

All tests were performed in triplicate. Statistical analysis was performed using the Student's T-test. Differences were considered significant at $p < 0.05$. The correlation indices were calculated using the Pearson coefficient (ρ).

RESULTS

Chemical composition of SCEO

The GC/MS analysis of SCEO is shown in Table 1. A total of 11 compounds were detected in the SCEO, of which the major constituents were octanoic acid (28.61%) and dodecanoic acid (22.97%), followed by hexanoic acid (17.9%) and decanoic acid (14.04%). Thus, fatty acids are the predominant component of the oils, as they accounted for 86.87% of the total SCEO (including tetradecanoic acid and methyl octanoate). α -Cubebene was the major sesquiterpene detected (9.16%), followed by Δ -cadinene and γ -cadinene (2.08 and 1.36%, respectively). Finally, α -humulene and 1H-cycloprop[e]azulene were found as minor components of the SCEO (<1%).

Fatty acid composition of SCO

The fatty acid composition of *S. coronata* seed oil is shown in Table 2. In total, 19 fatty acids were identified in this oil, which correspond to 99.84% of the total. A predominance of saturated fatty acids was observed (72.3%), while unsaturated fatty acids represented 27.49% of total fatty acid content (23.9% for monounsaturated, and 3.6% for polyunsaturated fatty acids). The most represented fatty acids were dodecanoic acid (41.58%) and 9-octadecenoic acid (23.81%), followed by tetradecanoic acid (9.68%), hexadecanoic acid (7.19%) and octanoic acid (5.32%). All fatty acids with odd numbers of carbon atoms (C7, C9, C11, C13 and C15) were found in trace concentrations. It is noteworthy that medium-chain fatty acids accounted for 51.44% of total fatty acid content, namely hexanoic, heptanoic, octadecanoic, nonanoic, decanoic, undecanoic and dodecanoic acids. The levels of saturated fatty acids were approximately three times higher than unsaturated fatty acids.

Antibiotic susceptibility of *S. aureus* strains

The tested *S. aureus* strains had their antibiotic-susceptibility profile analyzed. All of them were susceptible to vancomycin and linezolid, and susceptible or intermediately susceptible to chloramphenicol (Table 3). On the other hand, all strains were resistant to penicillin-G. Higher resistance was seen against erythromycin (62.5% of the strains), clindamycin (50%), oxacillin (43.75%), tetracycline and gentamicin (31.25% for both). Oxacillin resistance is a marker characterizing MRSA/ORSA strains, and we used this to classify the clinical isolates of *S. aureus* used in this study as resistant (MRSA) or sensitive (MSSA) to methicillin, as

Table 1. Chemical composition of essential oil from *S. coronata* seeds.

Compounds ^a	Retention indices		EO (%)
	Calculated ^b	Literature ^c	
Hexanoic acid	975	974	17.9
Methyl octanoate	991	988	1.25
Octanoic acid	1003	1002	28.61
Decanoic acid	1008	1004	14.04
1H-Cycloprop(e)azulene	1024	1022	0.23
α -Humulene	1049	1044	0.3
γ -Cadinene	1100	1095	1.36
Δ -Cadinene	1177	1174	2.08
Dodecanoic acid	1190	1186	22.97
Tetradecanoic acid	1337	1335	2.1
α -Cubebene	1444	1444	9.16
Total	-	-	100

^aCalculated on DB-5MS column; ^b According to Adams (2009).Table 2. Fatty acid composition of *S. coronata* seed oil.

Fatty acid	Common name	Lipid numbers	% of the total fatty acids
Saturated fatty acids:			72.35
Hexanoic acid	Caproic Acid	C6:0	Tr
Heptanoic acid	Enanthic acid	C7:0	Tr
Octadecanoic acid	Stearic acid	C8:0	5.32
Nonanoic acid	Pelargonic acid	C9:0	Tr
Decanoic acid	Capric acid	C10:0	4.54
Undecanoic acid	Undecylic acid	C11:0	Tr
Dodecanoic acid	Lauric acid	C12:0	41.58
Tridecanoic acid	Tridecylic acid	C13:0	Tr
Tetradecanoic acid	Myristic acid	C14:0	9.68
Pentadecanoic acid	Pentadecylic acid	C15:0	Tr
Hexadecanoic acid	Palmitic acid	C16:0	7.19
Heptadecanoic acid	Margaric acid	C17:0	Tr
Octadecanoic acid	Stearic acid	C18:0	3.54
Eicosanoic acid	Arachidic acid	C20:0	0.21
Docosanoic acid	Behenic acid	C22:0	0.22
Tetracosanoic acid	Lignoceric acid	C24:0	0.07
Monounsaturated fatty acids			23.90
9-octadecenoic acid	Oleic acid	C18:1	23.81
11-eicosenoic acid	Gondolic acid	C20:1	0.09
Polyunsaturated fatty acids			
9,12-octadecadienoic acid	Linoleic acid	C18:2	3.59

Tr: Trace concentrations.

shown in Table 3. Six strains (37.5%) could be classified as MRSA. These isolates showed the highest MAR indices (0.44-0.67) and the following resistance patterns:

penicillin G-clindamycin-erythromycin-gentamicin-tetracycline-oxacillin (6.25%; MAR index: 0.67), penicillin G-clindamycin-erythromycin-gentamicin-oxacillin (12.5%;

Table 3. Antibiotic-resistance profile and clinical source of *S. aureus* strains.

Strain	Source	Ery	Clin	Oxa	Pen	Lin	Tetra	Van	Chlor	Gen	MAR INDEX
MSSA 1	Oropharynx	R	S	S	R	S	S	S	S	S	0.22
MSSA 2	Eye discharge	S	S	S	R	S	I	S	S	S	0.11
MRSA 3	Blood	R	R	R	R	S	S	S	S	S	0.44
MRSA 4	Wound secretion	R	R	R	R	S	S	S	S	S	0.44
MSSA 5	Oropharynx	S	S	S	R	S	I	S	S	S	0.11
MSSA 6	Blood	S	S	S	R	S	I	S	S	S	0.11
MSSA 7	Wound secretion	I	S	S	R	S	S	S	S	S	0.11
MSSA 8	Wound secretion	S	S	S	R	S	S	S	S	S	0.11
MRSA 9	Blood	R	R	R	R	S	S	S	I	R	0.56
MSSA 10	Blood	R	R	S	R	S	R	S	S	S	0.44
MRSA 11	Blood	R	R	R	R	S	S	S	S	S	0.44
MSSA 12	Wound secretion	R	S	S	R	S	S	S	S	S	0.22
MSSA 13	Blood	R	S	S	R	S	S	S	S	S	0.22
MSSA 14	Blood	S	S	S	R	S	S	S	S	S	0.11
MRSA 15	Blood	R	R	R	R	S	I	S	I	R	0.56
MRSA 16	Blood	R	R	R	R	S	R	S	I	R	0.67

Ery: Erythromycin; Clin: clindamycin; Oxa: oxacillin; Pen: penicillin; Lin: linezolid; Tetra: tetracycline; Van: vancomycin; Chlor: chloramphenicol; Gen: gentamicin. R: resistant; S: sensitive; I: intermediate (CLSI, 2011). MRSA: Methicillin-resistant *S. aureus* strain; MSSA: Methicillin-sensitive *S. aureus* strain.

MAR index: 0.56), penicillin G-clindamycin-erythromycin-oxacillin (18.75%; MAR index: 0.44). These strains are also considered multidrug-resistant according to Maglorakos et al. (2012). Among the MSSA strains, the resistance profile was the following: penicillin G-clindamycin-erythromycin-tetracycline (6.25%; MAR index: 0.44 - multidrug-resistant) and penicillin G-erythromycin (18.75%; MAR index: 0.22), other isolates were only resistant to penicillin G (37.5%).

Antimicrobial activity of SCEO

The essential oil from *S. coronata* seeds showed very strong activity against the standard *S. aureus* strain (UFPEDA 02) and also against both MRSA and MSSA strains (Table 4). The values of MIC ranged from 0.002 µL/mL to 0.08 µL/mL. The growth of the *S. aureus* UFPEDA 02 was inhibited by 0.002 µL/mL of SCEO. Among the clinical isolates, the majority (68.75%) were sensitive to concentrations between 0.002 and 0.01 µL/mL. Regarding the MBC values, a variation of 0.002 to 0.312 µL/mL was observed, as well as a strong correlation between MIC and MBC values ($p = 0.89$). The MBC/MIC ratios ranged from 1 to 4, thus SCEO is a bactericidal agent (Pankey and Sabath, 2004). Finally, a weak correlation was observed between the MAR Indexes and MIC ($p = 0.17$) or MBC ($p = 0.01$) values, indicating that there is no relationship between the SCEO efficacy and the multidrug-resistance profile of *S. aureus* strains. A weak correlation between SCEO and chloramphenicol was also detected (p values of -0.18 and

-0.19 for MIC and MBC, respectively), revealing that SCEO was effective against *S. aureus* strains less sensitive to the drug's action.

Antimicrobial activity of SCO

The oil obtained from *S. coronata* also showed a strong anti-*S. aureus* activity (Table 4). The SCO, at a concentration of 0.16 µL/mL, inhibited the growth of 41.18% of the strains (including UFPEDA 02). The remaining strains were sensitive to oil at 0.625 µL/mL (11.76%), 1.25 µL/mL (23.53%) and 2.5 µL/mL (23.53%). The MBC values of SCO ranged from 0.16 to µL/mL; however, 47.05% of isolates were killed by 2.5 µL/mL of SCO. Both bactericidal and bacteriostatic effects were observed for SCO (MBC/MIC ratios ranged from 1 to 16), but bactericidal action was more prominent (for 81.25% of strains). The MIC and MBC values were strongly related ($p = 0.78$), while these values were moderately correlated with MAR indices of clinical isolates ($p = 0.49$ for MIC/MAR correlation and $p = 0.56$ for MBC/MAR correlation). Unlike SCEO, the MIC and MBC values found for the SCO were substantially correlated to chloramphenicol ($p = 0.43$ for MIC; $p = 0.58$ for MBC).

DISCUSSION

S. aureus is an extremely versatile, worldwide pathogen, which is able to cause from superficial to deep-seated skin infections that can lead to sepsis (Du Toit, 2014).

Table 4. Anti-*S. aureus* activity of oil and essential oil from seeds of *S. coronata*.

Strain	SCEO			SCO			Control		
	MIC ^a	MBC ^a	MBC/MIC	MIC ^b	MBC ^b	MBC/MIC	MIC ^b	MBC ^b	MBC/MIC
UFPEDA 02	0.002	0.002	1	0.16	0.16	1	0.04	0.04	1
MSSA 1	0.01	0.02	2	0.16	1.25	8	0.04	0.625	16
MSSA 2	0.01	0.04	4	0.16	2.5	16	0.04	0.625	16
MRSA 3	0.01	0.01	1	0.16	1.25	8	0.04	0.625	16
MRSA 4	0.005	0.02	4	1.25	2.5	2	0.312	10	32
MSSA 5	0.002	0.004	2	0.16	0.63	4	0.04	1.25	31
MSSA 6	0.01	0.01	1	0.63	2.5	4	0.04	0.625	16
MSSA 7	0.01	0.02	2	0.16	1.25	8	0.04	0.625	16
MSSA 8	0.01	0.02	2	0.16	0.16	1	0.04	0.625	16
MRSA 9	0.04	0.04	1	1.25	2.5	2	0.08	1.25	16
MSSA 10	0.04	0.04	1	1.25	2.5	2	0.08	1.25	16
MRSA 11	0.04	0.16	4	0.63	0.63	1	0.04	0.08	2
MSSA 12	0.08	0.31	4	2.5	2.5	1	0.08	0.625	8
MSSA 13	0.02	0.02	1	2.5	2.5	1	0.04	0.08	2
MSSA 14	0.01	0.02	2	1.25	2.5	2	0.625	10	16
MRSA 15	0.01	0.02	2	2.5	5	2	0.312	5	16
MRSA 16	0.01	0.02	2	2.5	5	2	0.312	10	32

^aMIC and MBC values are expressed in $\mu\text{L/mL}$; ^bMIC and MBC values are expressed in $\mu\text{g/mL}$; MRSA: Methicillin-resistant *S. aureus* strain; MSSA: Methicillin-sensitive *S. aureus* strain. UFPEDA02: Standard *S. aureus* strain provided by the Culture Collection UFPEDA.

This bacterium has an exceptional capacity to acquire resistance to antibiotics (Gould et al., 2012). These combined features make *S. aureus* the most important pathogen in the Twenty-first Century and point to the urgent need for new anti-*S. aureus* agents. In the present study, we reports the antimicrobial action of *S. coronata* seed oils against MRSA and MSSA *S. aureus* strains and the chemical composition and fatty acid content of SCEO and SCO, respectively. While both oils showed antimicrobial activity, SCEO was more active (15.6 to 250 times greater) than SCO. Their MIC values were moderately correlated between themselves ($p = 0.43$). Nevertheless, while SCEO is a more effective bactericidal agent, SCO showed both bactericidal and bacteriostatic actions. The antimicrobial activity of compounds derived from *S. coronata* has been evaluated for aqueous and methanol extracts from different tissues (leaves, inflorescence, nut-shell, liquid and solid endosperm nuts). In that study, only the extracts obtained from inflorescence tissue showed antimicrobial activity by inhibiting *S. aureus* (including strains with antibiotic resistance) and *Bacillus cereus*. The authors did not report the chemical characterization of these active extracts (Hughes et al., 2013).

To the best of our knowledge, the composition of *S. coronata* essential oil and its biological activity have not been reported before. Only one study on the volatile fraction of *S. coronata* is known (Belviso et al., 2013). The study's authors evaluated the volatile fraction of raw

and roasted seeds. A total of 59 volatile compounds were identified in *S. coronata* (34 in raw and 55 in roasted) belonging to 8 chemical classes. Among these, 30 compounds were found in both raw and roasted seeds. Carboxylic acids (such as octanoic and hexanoic acids) prevailed in raw *S. coronata* seeds, while after roasting, Strecker aldehydes (δ -lactones and alkyl pyrazines) were the most abundant. These data corroborate with our results, which showed that the essential oil of *S. coronata* seeds is also predominantly composed of fatty acids such as octanoic, dodecanoic and hexanoic acids.

Although less active than SCEO, the seed oil of *S. coronata* also showed a significant anti-*S. aureus* activity. SCO is predominantly composed of saturated fatty acids, with lauric acid (dodecanoic acid) the main constituent. The levels of saturated fatty acids were approximately three times higher than unsaturated fatty acids. Saturated fatty acids with medium chain length, such as lauric acid, have been found to be major components of other oils from Arecaceae plants, such as *Syagrus oleracea*, *Syagrus romanzoffiana* and *Acrocomia aculeata* (Colmbra and Jorge, 2011). This study demonstrated that *S. coronata* seed oil is a rich source of medium-chain fatty acids, which could be suitable for biomedical applications (cosmetic and pharmaceutical industries), as showed by Leal et al. (2013). Our data are in agreement with the work of Bauer et al. (2013), which showed that saturated fats with high levels of medium-chain fatty acids (such as lauric and myristic fatty acids) are

prevalent in kernel and fruit oil of *S. coronata* collected in Bahia, Brazil. These authors commented that this composition is very similar to coconut oil. The presence of saturated chains made a biodiesel derived from *S. coronata* less viscous and more stable to oxidation and these physico-chemical properties showed that it has good potential for use in engines (Iha et al., 2014).

Various studies have reported the antimicrobial action of saturated and unsaturated fatty acids, in the form of oil (mixture) or individual compounds (Dilika et al., 2000; Yff et al., 2002; Kitahara et al., 2006; Narasimhan et al., 2006). For instance, lauric acid and related compounds have shown inhibitory action against a range of bacteria, such as *S. aureus* (Kitahara et al., 2006). Likewise, the second-most important compound of SCO, oleic acid (an unsaturated fatty acid), has shown anti-*S. aureus* activity, as has olinoleic acid (9,12-octadecadienoic acid), the only polyunsaturated fatty acid detected (Dilika et al., 2000). Other fatty acids present in SCO have antimicrobial action, such as myristic (tetradecanoic acid) (Narasimhan et al., 2006) and palmitic acid (hexadecanoic acid) (Yff et al., 2002).

In this study, the strong anti-staphylococcal properties of *S. coronata* seed oils were demonstrated. These are promising results that encourage further research on the toxicological and pharmacological aspects of this species, as well the determination of the action mechanisms involved. Such research would clarify these substances' suitability in any potential application as antimicrobial agents for therapy, food practices and/or cosmetic industry.

Conflict of interests

The authors have not declared any conflict of interests.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to acknowledge MCT/CNPq and NANOBIOTEC-Brasil from CAPES for their financial support and the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) for research grants. They are very grateful to the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) for authorizing collections in the Catimbau National Park (Sisbio 16.806). They also express their gratitude to Scott V. Heald, a North American teacher at CIEC bilingual school, for correcting the English language.

REFERENCES

Adams RP (2009). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (4th ed). Allured Publishing Co., Carol Stream, IL.

Albuquerque UP, de Lima Araújo E, El-Deir AC, de Lima AL, Souto A,

Bezerra BM, Ferraz EM, Maria Xavier Freire E, Sampaio EV, Las-Casas FM, de Moura GJ, Pereira GA, de Melo JG, Alves Ramos M, Rodal MJ, Schiel N, de Lyra-Neves RM, Alves RR, de Azevedo-Júnior SM, Telino Júnior WR, Severi W (2012). Caatinga revisited: Ecology and conservation of an important seasonal dry forest. *Scientific World J.* 2012:205182.

Bauer LC, do Amaral Damásio JM, Da Silva MV, de Andrade Santana D, Gualberto SA, Simionato JI (2013). Chemical characterization of pressed and refined licuri (*Syagrus coronata*) oils. *Acta Sci. Technol.* 35:771-776.

Belviso S, Ghirardello D, Giordano M, Ribeiro GS, de Souza Alves J, Parodi S, Rizzo S, Zeppa G (2013). Phenolic composition, antioxidant capacity and volatile compounds of licuri *Syagrus coronata* (Martius) Beccari fruits as affected by the traditional roasting process. *Food Res. Int.* 51:39-45.

Castelo Branco Rangel de Almeida Cde F, de Vasconcelos Cabral DL, Rangel de Almeida CC, Cavalcanti de Amorim EL, de Araújo JM, de Albuquerque UP (2012). Comparative study of the antimicrobial activity of native and exotic plants from the Caatinga and Atlantic Forest selected through an ethnobotanical survey. *Pharm. Biol.* 50(2):201-207.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2011). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (21st ed) Wayne: M100-S21, Clinical and Laboratory Standards Institute.

Coimbra MC, Jorge N (2012). Fatty acids and bioactive compounds of the pulp and kernels of Brazilian palm species, guaratuba (*Syagrus oleracea*), jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) and macaúba (*Acrocomia aculeata*). *J. Sci. Food Agric.* 92:679-684.

da Silva LC, Sandes JM, de Paiva MM, de Araújo JM, de Figueiredo RC, da Silva MV, Correia MT (2013). Anti-Staphylococcus aureus action of three Caatinga fruits evaluated by electron microscopy. *Nat. Prod. Res.* 27:1492-1496.

Davis MF, Peterson AE, Julian KG, Greene WH, Price LB, Nelson K, Whitener CJ, Silbergeld EK (2013). Household risk factors for colonization with multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *PLoS one* 8:e54733.

de Oliveira YLC, Nascimento da Silva LC, da Silva AG, Macedo AJ, Araújo JMD, Correia MTDS, Silva MVD (2012). Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) RA Howard (Combretaceae: Combretaceae). *Scientific World J.* 2012:849302.

Dilika F, Bremner PD, Meyer JJM (2000). Antibacterial activity of linoleic and oleic acids isolated from *Helichrysum pedunculatum*: A plant used during circumcision rites. *Fitoterapia* 71:450-452.

do Nascimento VT, de Lucena RF, Maciel MI, de Albuquerque UP (2013). Knowledge and use of wild food plants in areas of dry seasonal forests in Brazil. *Ecol. Food Nutr.* 52:17-343.

Du Toit A (2014). Bacterial pathogenesis: *Staphylococcus* slips through the net. *Nat. Rev. Microbiol.* 12:6-7.

Gould IM, David MZ, Esposito S, Garau J, Lina G, Mazzei T, Peters G (2012). New insights into methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents* 39(2):96-104.

Hughes AFDS, Lima FGD, Lucchesi AM, Góes Neto A, Uetanabaro APT (2013). Antimicrobial activity of *Syagrus coronata* (Martius) Beccari. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 56:269-274.

Iha OK, Alves FC, Suarez PA, de Oliveira MB, Meneghetti SM, Santos BP, Soletti JI (2014). Physicochemical properties of *Syagrus coronata* and *Acrocomia aculeata* oils for biofuel production. *Ind. Crops Prod.* 62:318-322.

Kitahara T, Aoyama Y, Hirakata Y, Kamihira S, Kohno S, Ichikawa N, Nakashima M, Sasaki H, Higuchi S (2006). In vitro activity of lauric acid or myristylamine in combination with six antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Int. J. Antimicrob. Agents* 27:51-57.

Krumpal PH (1983). Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:165-170.

Leal LB, Sousa GD, Sebas KB, Souza PHND, Santana DPD (2013). Determination of the critical hydrophile-lipophile balance of licuri oil

- from *Syagrus coronata*: Application for topical emulsions and evaluation of its hydrating function. *Braz. J. Pharm. Sci.* 49:167-173.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18:268-281.
- Metcalfe LD, Schmitz AA, Pelka JR (1966). Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.* 38:514-515.
- Narasimhan B, Mourya V, Dhake A (2006). Design, synthesis, antibacterial, and QSAR studies of myristic acid derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16:3023-3029.
- Pankney GA, Sabath LD (2004). Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clin. Infect. Dis.* 38:864-870.
- Rodrigues IA, Alviano DS, Gomes MT, Silva DO, Antoniazzi R, Silva AJR, Blizzo HR, Alviano CS, Vermeijo AB, Rosa MSS (2011). *In vitro* anti-*Leishmania amazonensis* activity of the polymeric procyanidin-rich aqueous extract from *Syagrus coronata*. *J. Med. Plants Res.* 5:3781-3790.
- Teixeira de La KTD, Meneghetti SMP, de La Salles WF, Meneghetti MR, Dos Santos ICF, Da Silva JPV, De Carvalho SHV, Soletti JI (2010). Characterization of *Syagrus coronata* (Mart.) Becc. oil and properties of methyl esters for use as biodiesel. *Ind. Crop Prod.* 32:518-521.
- Yip BT, Lindsey KL, Taylor MB, Erasmus DG, Jäger AK (2002). The pharmacological screening of *Pentstemon prunellifolius* and the isolation of the antibacterial compound palmitic acid. *J. Ethnopharmacol.* 79:101-107.

APÊNDICE B - CAPÍTULO DE LIVRO PUBLICADO EM JULHO 2016.

From: conference@biomicroworld2015.org
Subject: Proceedings book
To: ingridd.torres@hotmail.com
Date: Sat, 18 Jun 2016 17:38:29 +0200

Dear Ingrid Ayslane Torres de Araújo Ribeiro,

We would like to inform you that the proceedings of the VI International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology - BioMicroWorld2015, titled "Microbes in the spotlight: recent progress in the understanding of beneficial and harmful microorganisms", will be released by BrownWalker in July 2016.

Although the book is not released officially yet, we would like to inform you about all the details for full citation of your accepted chapter:

Chapter title: "Biodiversity and antimicrobial activity from endophytic fungi isolated from *Morinda citrifolia*"

Pages of the chapter: 255-259 (both included)

Book title: "Microbes in the spotlight: recent progress in the understanding of beneficial and harmful microorganisms"

ISBN-10: 1627346120
ISBN-13: 9781627346122

Editor: A. Méndez-Vilas

Publisher: BrownWalker Press

Publication date: 2016

As soon as the book is released, we will contact you for the last remaining details (link to download the ebook, official website for the book...)

If you have any questions, please, do not hesitate to contact us.

Best regards,
Aurora Solano
BioMicroWorld2015 Conference
Phone: +34 924 25 86 15
Fax: +34 924 26 30 53
e-mail: conference@biomicroworld2015.org

<https://mail.google.com/mail/u/0/?ui=2&ik=a7789dd59d&view=pt&q=ingridd.torres%40hotmail.com&q=qs=true&search=query&msg=15562d7a4e9776be&sim...> 1/2

ANEXOS

ANEXO A - FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA – FIB.



HERBÁRIO IPA – DÁRDANO DE ANDRADE LIMA

FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA FIB N^o. 43/2012

°	N ^o de Tombo	Família	Nome Científico
1	84039	Fabaceae	<i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i>

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

Rita de Dr.^a 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: Outubro de 2012.

Recebi em 16/10/2012

Cibele Maria Alves da Silva

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 B - 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: 58473-1	Data da Emissão: 09/05/2017 21:01	Data para Revalidação*: 08/06/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Cibele Maria Alves da Silva Bessa	CPF: 082.985.154-20
Título do Projeto: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO COMO DEFENSIVO NATURAL DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE FOLHAS DE <i>Anadenathera colubrina</i> var. <i>cebil</i> (Griseb) Altschul (FABACEAE:MIMOSOIDEAE)	
Nome da Instituição: UFPE - UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO	CNPJ: 24.134.488/0001-08

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta e preparação dos extratos	05/2017	05/2017
2	Purificação e caracterização dos extratos	06/2017	08/2017
3	Atividade biológica	09/2017	09/2017
4	A apresentação de tese ao PPGCB	10/2017	12/2017

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 passada, 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 de terra indígena (FUNAI), 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 ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 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).
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	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	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, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	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.

Outras ressalvas

1	A pesquisadora deve agendar as atividades de campo através do e-mail gisela.carvalho@icmbio.gov.br . Qualquer publicação decorrente deverá ter cópia em arquivo remetida a este mesmo e-mail. Poderá haver solicitação de acesso aos dados brutos, pela equipe do ICMBio, com o compromisso de sigilo, se assim for necessário às questões de manejo da UC.
---	--

Locais onde as atividades de campo serão executadas

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

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. 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: 14929946



Página 1/4



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: 58473-1	Data da Emissão: 09/05/2017 21:01	Data para Revalidação*: 08/06/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Cibele Maria Alves da Silva Bessa	CPF: 082.985.154-20
Título do Projeto: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO COMO DEFENSIVO NATURAL DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE FOLHAS DE <i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i> (Griseb) Altschul (FABACEAE:MIMOSOIDEAE)	
Nome da Instituição : UFPE - UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO	CNPJ: 24.134.488/0001-08

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico	<i>Anadenanthera colubrina</i>

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Plantas)	Flor, Frutos/estróbilos, Folhas, Ramos
2	Método de captura/coleta (Plantas)	Coleta manual

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. 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: 14929946



Página 2/4



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: 58473-1	Data da Emissão: 09/05/2017 21:01	Data para Revalidação*: 08/06/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Cibele Maria Alves da Silva Bessa	CPF: 082.985.154-20
Título do Projeto: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO COMO DEFENSIVO NATURAL DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE FOLHAS DE <i>Anadenathera colubrina</i> var. <i>cebil</i> (Griseb) Altschul (FABACEAE:MIMOSIOIDEAE)	
Nome da Instituição : UFPE - UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO	CNPJ: 24.134.488/0001-08

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, 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

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. 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: 14929946



Página 3/4



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: 58473-1	Data da Emissão: 09/05/2017 21:01	Data para Revalidação*: 08/06/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Cibele Maria Alves da Silva Bessa	CPF: 082.985.154-20
Título do Projeto: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO COMO DEFENSIVO NATURAL DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE FOLHAS DE <i>Anadenathera colubrina</i> var. <i>cebil</i> (Griseb) Altschul (FABACEAE:MIMOSIOIDEAE)	
Nome da Instituição : UFPE - UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO	CNPJ: 24.134.488/0001-08

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. 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: 14929946



Página 4/4