



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

PAULA FERNANDA FIGUEIREDO DAS MERCÊS

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE COMPOSTOS
BIOATIVOS COMO DEFENSIVOS NATURAIS DE FOLHAS
DE LEGUMINOSAS (LEGUMINOSAE)**

Recife

2019

PAULA FERNANDA FIGUEIREDO DAS MERCÊS

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE COMPOSTOS
BIOATIVOS COMO DEFENSIVOS NATURAIS DE FOLHAS
DE LEGUMINOSAS (LEGUMINOSAE)**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção do grau de Doutora em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Luiza Vilela Oliva

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Maria Tereza dos Santos Correia

Recife

2019

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

Mercês, Paula Fernanda Figueiredo das
Isolamento, caracterização e aplicação de compostos bioativos como defensivos naturais de folhas de leguminosas (Leguminosae) / Paula Fernanda Figueiredo das Mercês. – 2019.

148 f. : il.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Luiza Vilela Oliva.

Coorientadora: Prof^a Dr^a Maria Tereza dos Santos Correia.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2019.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Doenças e pragas. 2. Pragas – Controle biológico. 3. Leguminosas. I. Oliva, Maria Luiza Vilela (orientadora) II. Correia, Maria Tereza dos Santos (coorientadora) III. Título.

632.96

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-133

PAULA FERNANDA FIGUEIREDO DAS MERCÊS

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE COMPOSTOS
BIOATIVOS COMO DEFENSIVOS NATURAIS DE FOLHAS
DE LEGUMINOSAS (LEGUMINOSAE)**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção do grau de Doutora em Ciências Biológicas.

Data da aprovação ____/____/____

Banca examinadora:

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

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

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

Dr. Túlio Diego da Silva
Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste

Prof. Dr. Luis Cláudio Nascimento da Silva
Universidade CEUMA – UNICEMA

Recife
2019

Dedico,

A minha família pelo amor e dedicação que constituem a base das minhas
realizações pessoais e profissionais.

AGRADECIMENTOS

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

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

Gostaria de agradecer imensamente àqueles que me deram toda a força necessária para que eu seguisse sempre em frente. Aos meus pais e exemplos, Marcos das Mercês e Fernanda das Mercês, pelo amor incondicional, pelos valores que construíram em mim, e, principalmente, por toda dedicação e renúncia – às vezes necessária – despendidos para que eu sempre pudesse trilhar meu caminho com persistência e sabedoria. Agradeço por me ensinarem a amar os estudos e por me proporcionarem, com muita luta e esforço, todo o alicerce para que a conquista deste sonho fosse possível;

A meu marido, João Victor sempre companheiro dedicado a ajudar. obrigada pelo seu amor, seu carinho, seu cuidado, esteve comigo nas etapas mais difíceis do trabalho, sempre compreendendo, proporcionando momentos que me trouxeram muitas alegrias;

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

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

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

A professora Dr^a Márcia Vanusa da Silva, por sua amizade, dedicação, apoio, pelos seus conselhos e sugestões, além das palavras de ânimo que sempre me

incentivaram, além disso, pelas valiosas discussões, sugestões e participação nas determinações estruturais do meu projeto;

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

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

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

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

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

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

A grande amiga Juciara Tenório, pelo incentivo, pelos conselhos de carinho e cuidado e pela ajuda no decorrer da pesquisa.

Ao meu amigo Thiago Fonseca pelo apoio, incentivo e participação durante o projeto.

A Carolina Malafaia, pelo auxílio no decorrer do trabalho e no dia-dia, por muitas vezes contribuindo de forma essencial.

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

A todos esses, e também àqueles que não couberam nessas poucas linhas, mas que me preenchem como pessoa, um muito obrigada cheio de carinho. Essa conquista é nossa!

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

À todos muito obrigada!

O fardo é proporcional às forças, como a recompensa
será proporcional à resignação e à coragem.

Allan Kardec, 1863, 83.

Obrigada meu Deus!

RESUMO

As doenças e pragas podem constituir um fator limitante à exploração econômica de plantas, pois, causam danos às culturas, no cultivo e pós-colheita. Geralmente, o controle dos fitopatogênicos e insetos ocorre através da aplicação de pesticidas sintéticos. No entanto, o uso excessivo e indiscriminado acarreta vários problemas. Por isso, a busca de formas alternativas para o controle tem sido estimulada. O objetivo foi investigar o potencial dos compostos bioativos presentes nas folhas de leguminosas contra microrganismos fitopatogênicos e insetos-pragas de importância agrícola. O óleo essencial de *Hymenaea courbaril* var *courbaril* (Jatobá) foi obtido por hidrodestilação e os extratos orgânicos de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Angico) e Jatobá através da série eluotrópica com solventes orgânicos, utilizando o Soxhlet. Para composição fitoquímica, utilizou-se cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas (CG-EM) e cromatografia em camada delgada (CCD) para o óleo e extratos, respectivamente. Avaliou-se a atividade inseticida e antimicrobiana de ambos. Para *Tetranychus urticae* (ácaro rajado) utilizou os ensaios de fumigação, ingestão e toxicidade, para *Sitophilus zeamais* (gorgulho do milho) avaliou-se a sobrevivência e fisiologia nutricional. O efeito antimicrobiano dos extratos foi avaliado em ambas as leguminosas, através da concentração mínima inibitória (CMI) e mínima bactericida (CMB), utilizando microdiluição em caldo contra: *Acidovorax citrulli*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *X. campestris* pv. *malvacearum* e *X. campestris* pv. *viticola*, os melhores resultados seguiram para semi purificações. O extrato acetato de etila (EA), expressou melhor atividade para ambas espécies, foram realizados fracionamentos por cromatografia em coluna Sephadex LH-20 eluída com metanol. Subsequentemente, as frações foram analisadas em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A análise do óleo, identificou 36 compostos, sendo 46,42% dos monoterpenos e 51,41% dos sesquiterpenos. Os bioensaios inseticidas indicaram que o óleo causou mortalidade significativa, promovendo danos fisiológicos ao *S. zeamais*. O valor de CL₅₀ para *T. urticae* foi de 35,57 µL/mL; além disso, observou-se que a oviposição foi afetada negativamente. Para os extratos do Angico, o teste de fumigação de *T. urticae* e mortalidade para o *S. zeamais*, foi eficaz; no entanto, o extrato ciclohexano (CH) e EA causaram mortalidade significativa ($p < 0,05$), mais de 50%. Nos testes de mortalidade com o ácaro rajado, os extratos CH e EA mostraram

uma CL₅₀ de 52,75 e 156,42 mg/mL. Ainda, no mesmo teste, pode-se observar que a oviposição foi suscetível a extratos. A análise da CCD revelou-se a presença de diversos compostos. Todos os extratos foram ativos sobre as bactérias. Porém o extrato de EA das duas espécies apresentou MIC variando de 0,78-3,12 mg/mL. As frações semi-purificadas do HPLC, apresentaram MIC e MBC 0,5 mg/mL contra *X. campestris pv. campestris* e *A. citrulli* para o Angico e MIC e MBC 0,5 mg/mL para *X. campestris pv. campestris* e *X. campestris pv. malvacearum* para o Jatobá. De acordo com os resultados, o óleo e os extratos das leguminosas possuem metabólitos com fortes potenciais antimicrobianos e inseticidas capazes de interferir e prejudicar o metabolismo dos mesmos, associando como potencial alternativa no controle de pragas e bactérias fitopatogênicas.

Palavras-chaves: Angico. Jatobá. Inseticida. Antimicrobiano. Potencial biológico.

ABSTRACT

Diseases and pests can be a limiting factor to economic exploitation of plants, therefore, cause damage to crops, the cultivation and post-harvest. Usually the control of plant pathogens and insects occurs through the application of synthetic pesticides. However, overuse and indiscriminate use causes several problems. Therefore, the search for alternative forms of control has been encouraged. The objective was to investigate the potential of bioactive compounds present in the leaves of legumes against phytopathogenic microorganisms and insect pests of agricultural importance. The essential oil of *Hymenaea var courbaril* (Jatoba) was obtained by hydrodistillation and the organic extracts *anadenanthera colubrina* var. *cebil* (angico) and Jatoba through eluotrópica series with organic solvents using Soxhlet. For phytochemical composition used gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and thin layer chromatography (TLC) for oil and extracts, respectively. Both were evaluated for insecticidal and antimicrobial activity. The tests with insects evaluated the insecticide potential. For *Tetranychus urticae* (spider mite) used fumigation tests, ingestion and toxicity to *Sitophilus zeamais* (maize weevil) evaluated the survival and nutritional physiology. The antimicrobial effect of the extracts was evaluated in both legumes by minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal (CMB) using broth microdilution against: *Acidovorax citrulli*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *X. campestris* pv. *malvacearum* and *X. campestris* pv. *viticola*, the best results followed for semi purifications. The ethyl acetate (EA) extract, expressed better activity for both species, were fractionated by chromatography on a Sephadex LH-20 column eluted with methanol. Subsequently, fractions were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC). Oil analysis identified 36 compounds, and 46.42% of monoterpenes and sesquiterpenes of 51.41%. The insecticidal bioassays indicated that the oil caused significant mortality, promoting physiological damage to *Sitophilus zeamais*. The LC_{50} value for *T. urticae* was 35.57 μ L/mL; Moreover, it was observed that oviposition was negatively affected. Also in this test, it can be observed that the oviposition was susceptible to extracts. The CCD analysis revealed the presence of several compounds. All the extracts were active on bacteria. However, the EA extract of the two species showed MIC ranging from 0.78 to 3.12 mg/mL. The semi-purified fractions of the HPLC showed MIC and MBC 0.5 mg/ml versus *X. campestris*

pv. campestris and *A. citrulli* for Angico and MIC and MBC 0.5 mg/mL for *X. campestris* *pv. campestris* and *X. campestris* *pv. malvacearum* for Jatobá. According to the results, oil and pulses of the extracts possess strong antimicrobial metabolites with potential and insecticides can interfere and disrupt the metabolism thereof, involving a potential alternative to control pests and plant pathogenic bacteria.

Keywords: Angico. Jatobá. Insecticide. Antimicrobial. Biological potential.

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1 - Agrotóxico liberados entre 01/01 e 21/03 de cada ano. Comparação da liberação de agrotóxicos na última década, no intervalo de três meses.....	27
Figura 2 - Riscos do uso dos agrotóxicos e suas complicações.....	29
Figura 3 - Vendas de defensivos agrícolas no brasil (2011- 2015).....	30
Figura 4 - Sintomas causados por fitopatógenos. (a) mancha aquosa: manchas marrons necróticas que causam lesões no fruto do melão contaminando as sementes, (b) podridão-mole: degradação da polpa do tubérculo, causando coloração marrom escura resultante da oxidação dos tecidos infectados. (c) murcha bacteriana: lesões circulares brancas que provocam a deformação e necrose nos frutos. (d) podridão negra: infecta o interior da planta hospedeira, através dos estômatos ocasionando lesões amareladas em forma de “v”. (e) ferrugem bacteriana: as lesões surgem ao longo das nervuras, abrangendo todo tecido foliar. (f) cancro bacteriano: lesões nas bagas e no ráquis do cacho.....	34
Figura 5 - Ciclo de vida do <i>Sitophilus zeamais</i> . A postura dos ovos pela fêmea é feita no grão onde a larva completa o seu desenvolvimento, passa ao estágio de pupa até a emergência do adulto no seu interior.....	38
Figura 6 - Danos em grãos de milho e arroz causados por <i>Sitophilus zeamais</i> ...	39
Figura 7 - Fases de desenvolvimento do <i>Tetranychus urticae</i> (ácaro rajado). Ovos: translúcidos, postura ocorre entre os fios de teia. Larvas: são incolores e do tamanho do ovo, caracterizando-se por apresentar três pares de patas. Protoninfa e deutoninfa: estágio móvel e imaturo possui quatro pares de patas. Fêmea adulta: apresenta duas manchas no dorso. O período de desenvolvimento de ovo a adulto pode variar entre 5 e 50 dias, dependendo dos fatores ambientais. Ácaros adultos (a) macho, (b) fêmea.....	40
Figura 8 - Sintomas da infestação por <i>Tetranychus urticae</i> (a) formação de teias pelas fêmeas para oviposição, (b) plantas de morango com grande quantidade de teia em alta infestação, (c) ataque ao milho, fêmeas e ovos na folha, (d) sintomas clorose causada por infestação do acaro rajado provocando danos no mamoeiro, folhas amareladas e aclorofiladas, (e) infestação em flores ornamentais.....	42

Figura 9 - Componentes envolvidos nos efeitos sobre o patógeno ou sobre a ativação de mecanismos de defesa das plantas.....	43
Figura 10 - Classificação dos compostos fenólicos.....	50
Figura 11 - Diferenças em estruturas fenólicas.....	51
Figura 12 - Flavonoides, estrutura química básica dos grupos mais encontrados	52
Figura 13 - Representação esquemática dos mecanismos antimicrobianos, onde os pontos castanhos representam partículas de flavonoides. Ex: extrato vegetal; f: fungos; b: bactérias; v: vírus; pal: fenilalanina amônia-liase; cat: catalase; pox: peroxidase; ppo: polifenoloxidase.....	53
Figura 14 - Estrutura química de alguns terpenos.....	56
Figura 15 - Diferentes estruturas de alcaloides.....	57
Figura 16 - (A) ocorrência natural de <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>courbaril</i> . (B) suas variedades no Brasil.....	66
Figura 17 - Aspectos gerais de <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>courbaril</i> (A) hábito da planta (árvore), (B) folhas alternas, compostas e coriáceas, com dois folíolos (C) flores brancas, hermafroditas e pentâmeras. (D) frutos verdes tipo vagem lenhosa com resina e (E) fruto maduro com sementes.....	69
Figura 18 - (A) ocorrência natural de <i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i> no Brasil. (B) suas variedades no Brasil.....	71
Figura 19 - Aspectos gerais de <i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i> ; (A) árvore semicaducifolia, com copa bastante ramificada, (B) casca levemente avermelhada, (C) folhas compostas, (D) flores agrupadas em inflorescências terminais globosas, (E) frutos alongados do tipo vagem.....	71

RESULTADOS

Figura 1 - HPLC-UV chromatograms from ethyl acetate extract of <i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i> . 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).....	87
Figura 2 - HPLC-UV chromatograms from ethyl acetate extract of <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>courbaril</i> . Detection at 254 nm. UV spectra analysis of the main	

peaks. Peak 3: Chlorogenic acids; peak 4: Catechin; peak 7: Acid coumaric; peak 8: Rutin; peak 11: Ellagic acid; peak 22: Quercetin (UV 190- 400nm).....	88
--	----

APÊNDICE A

Figura 1 - Mortalidade e oviposição de <i>Tetranychus urticae</i> em discos de folhas pulverizados com diferentes concentrações do óleo das folhas de <i>Hymenaea courbaril</i> L. var. <i>courbaril</i>	126
Figura 2 - Parâmetros nutricionais de adultos de <i>Sitophilus zeamais</i> criados em dietas artificiais. A.Mortalidade; B. taxa de consumo relativo indica a quantidade de alimentos consumido em $\mu\text{L.g}^{-1}$ por mg de peso corporal por dia de insetos; C. ganho de biomassa em relação taxa indica a quantidade de biomassa obtida em todos os dias por $\mu\text{L.g}^{-1}$ de corpo inicial peso; D. eficiência de conversão do alimento ingerido (%) indica a quantidade de alimentos ingeridos pelos insetos e incorporada como biomassa. Letras diferentes indicam $p < 0,05$	127

APÊNDICE B

Figura 1 - Mortality Rate (%) of <i>Sitophilus zeamais</i> under the effect of EaD (A), EaR (B), ChD (C), ChR (D) in different concentrations (mg.g^{-1}).....	137
Figura 2 - Relative consumption rate of artificial diets containing: EaD (A) EaR (B), CfD (C) CfR (D) from <i>Anadenanthera colubrina</i> by adult insects of <i>Sitophilus zeamais</i> . Different letters indicate significant differences among treatments.....	137
Figura 3 - Relative gain rate of the biomass of <i>Sitophilus zeamais</i> adult insects kept in artificial diets containing: EaD (A) EaR (B), CfD (C) CfR (D) from <i>Anadenanthera colubrina</i> . Different letters indicate significant differences among treatments.....	138
Figura 4 - Mortality and oviposition of <i>Tetranychus. urticae</i> on leaf discs treated with different concentrations of ChD (A), EaR (B) from <i>Anadenanthera colubrina</i> and control with Azamax (C).....	139

LISTA DE TABELAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1 - Principais classes de compostos antimicrobianos de plantas.....	49
Tabela 2 - Classificação dos terpenos baseada na quantidade de unidades de isopreno, com os respectivos exemplos.....	55
Tabela 3 - Atividades biológicas realizados com <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>courbaril</i>	69

RESULTADOS

Tabela 1 - Chromatographic and revealing systems used for the phytochemical screening of the leaves extracts of <i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i> and <i>Hymenaea. courbaril</i> var. <i>courbaril</i>	80
Tabela 2 - Production organic extracts of <i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i> (Acc) and <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>courbaril</i> (Hcc).....	84
Tabela 3 - Phytochemical screening of <i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i> (Acc) and <i>Hymenaea. courbaril</i> var. <i>courbaril</i> (Hcc) extracts harvest at Catimbau Nacional Park.....	84
Tabela 4 - Antibacterial activity, Minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of organics extracts from <i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i> (Acc) and <i>Hymenaea. courbaril</i> var. <i>courbaril</i> (Hcc) against selected plant pathogenic bacterial.....	87
Tabela 5 - Antibacterial activity, Minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of fractions semi purified the column chromatography of EAAcc (<i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i>) extract against selected plant pathogenic bacterial.....	90
Table 6: Antibacterial activity, Minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of fractions semi purified the column chromatography of EAHcc (<i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>courbaril</i>) extract against selected plant pathogenic bacterial.....	91

APÊNDICE A

Tabela 1. Composição química do óleo essencial de folhas de <i>Hymenaea courbaril</i> L. var. <i>courbaril</i>	125
Tabela 2. Toxicidade por contato residual (CL50 em $\mu\text{L.mL}^{-1}$) do óleo essencial de <i>Hymenaea courbaril</i> L. var. <i>courbaril</i> e eugenol sobre <i>Tetranychus urticae</i> . n = número de indivíduos; GL = grau de liberdade; χ^2 = quiquadrado; RT = razão de toxicidade.....	126

APÊNDICE B

Table 1. Residual contact toxicity (LC50 in mg.mL^{-1}) of the extracts ChD and EaR from the leaves of <i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i> and Azamax on <i>Tetranychus urticae</i> . N = individuals' Number; DF = Degree of Freedom; χ^2 = qui-square; TR = Toxicity Reason; RI = Reliability Index.....	139
--	-----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 OBJETIVOS	23
1.1.1 Geral.....	23
1.1.2 Específico.....	23
2 REFERENCIAL TEÓRICO	25
2.1 AGROTÓXICOS NO BRASIL	25
2.2 UTILIZAÇÃO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS E A RELAÇÃO COM MEIO AMBIENTE, TRABALHO E A SAÚDE.....	27
2.3 IMPACTOS DOS FITOPATÓGENOS NA AGRICULTURA.....	30
2.3.1 Patógenos de plantas.....	32
2.4 ESTRATÉGIAS VEGETAIS CONTRA O ATAQUE DE PATÓGENOS.....	42
2.4.1 Defesa vegetal.....	42
2.5 PRODUTOS NATURAIS COMO ALTERNATIVA À AÇÃO DE FITOPATÓGENOS.	44
2.6 BIOTECNOLOGIA E AGRICULTURA.....	45
2.6.1 Metabólitos como precursores de novas moléculas praguicidas.....	47
2.7 ÓLEOS ESSENCIAIS	58
2.8 ATIVIDADES BIOLÓGICA E MODOS DE AÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS ...	59
2.9 OS INSETICIDAS DE ORIGEM VEGETAL NO CONTROLE BIOLÓGICO	61
2.10 LEGUMINOSAE.....	63
2.10.1 <i>Hymenaea courbaril</i> L.	65
2.10.2 <i>Anadenanthera colubrina</i> (Vellozo) Brenan.....	70
3 RESULTADOS.....	73
ARTIGO 1 - ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ORGANIC EXTRACTS AND SEMI PURIFIED OF LEGUMINOSAE AGAINST PHYTOPATHOGENIC BACTERIA.....	73
4 CONCLUSÃO.....	100

REFERENCIAS	101
-------------------	-----

APÊNDICE A – CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ACARICIDA E INSETICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE HYMENEAE COURBARIL L. VAR. COURBARIL SOBRE O ÁCARO-RAJADO E O GORGULHO DO MILHO.	120
--	-----

APÊNDICE B – EVALUATION OF THE INSECTICIDAL POTENTIAL OF LEAF EXTRACTS OF ANADENANTHERA COLUBRINA VAR. CEBIL (GRISEB) ALTSCHUL AGAINST TETRANYCHUS URTICAE KOCH AND SITOPHILUS ZEAMAE MOTS.	133
--	-----

ANEXO A - FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA – FIB.	143
---	-----

ANEXO B - AUTORIZAÇÃO PARA ATIVIDADES COM FINALIDADE CIENTÍFICA.	145
---	-----

1 INTRODUÇÃO

Dentre as vertentes da evolução humana, a agricultura foi o progresso fundamental para o crescimento populacional e as mudanças de hábito na sociedade, pois a mesma começou a interferir não apenas nos hábitos alimentares como também na civilização (MAZOYER; ROUDART, 2010; AGUIAR, 2017). Ao longo da história, houve grandes transformações na agricultura. Há 10 mil anos, ocorreu a revolução agrícola neolítica, que tinha três características principais: o cultivo na várzea dos rios, a rotação de culturas e a plantação em terraços.

Nos séculos XVIII e XIX houve crescimento da produção agrícola devido ao uso de fertilizantes naturais (esterco) e, posteriormente, de máquinas agrícolas. Na metade do século Revolução Verde, que tinha como objetivo solucionar a falta de alimentos em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Para produzir mais intensamente, ela valeu-se de tecnologias mais avançadas, mão de obra especializada, sementes selecionadas e agrotóxicas. A Revolução Verde tinha como modelo a produção racional, voltado à expansão das agroindústrias, com base na intensiva utilização de sementes híbridas, na aplicação de insumos industriais (fertilizantes e agrotóxicos), mecanização da produção, uso extensivo de tecnologia no plantio, na irrigação e na colheita, assim como no gerenciamento (FIDELES, 2018).

Mais recentemente, temos a revolução agrobiotecnológica, caracterizada pela produção de Organismos Geneticamente Modificados (OGM), determinados de alimentos transgênicos. Paralelamente, também vem sendo usada a agricultura orgânica (não utiliza agrotóxicos), e a técnica da agrofloresta, que combina culturas agrícolas com culturas florestais. Diversos economistas destacam o papel da agricultura, como sendo fundamental no desenvolvimento econômico de um país, (FIGUEIREDO, 2018). Moura *et al.* (2018) realizaram estudos mostrando que o setor agrícola, ao ser estimulado, pode gerar um efeito benéfico para o resto da economia, ou seja, acarreta efeitos indutores positivos para os demais setores. Além disso, mostraram que ao priorizar as atividades no setor como “mola propulsora” do crescimento econômico, um país estará fazendo uma opção por um grau mais elevado de eficiência na alocação de seus recursos, principalmente no caso de um país que ainda não atingiu os padrões de desenvolvimento econômicos considerados como satisfatórios.

O agronegócio brasileiro vem contribuindo significativamente com a balança comercial do país, apresentando saldos positivos frequentes e por conta disso, a importância econômica da agricultura para o Brasil é incontestável, seja na produção de commodities ou na geração de divisas, sendo derivada da elevada competitividade do segmento produtivo no país. Podemos ainda destacar o setor agrícola pelo importante papel no desenvolvimento do país, tanto pela oferta de produtos para a demanda interna quanto pela absorção de contingente significativo de mão de obra (DE FARIA *et al.*, 2019).

O setor agrícola é composto por cadeias produtivas que irão atuar em distintos ecossistemas ou sistemas naturais, e assumem assim importante papel na economia brasileira através da adoção de modernos projetos de gestão visando aprimorar o processo produtivo, maximizando a lucratividade. A agricultura é responsável por inúmeros e grandiosos avanços no setor de produção, alto percentual na geração de renda e empregabilidade, alavancando a economia brasileira, e constituindo-se assim uma peça chave na economia nacional (MAURI *et al.*, 2017).

Em 2017 o setor agro brasileiro teve crescimento de 13%, no ano seguinte 1,5% e para 2019, as projeções são de 2%. Esse crescimento se deve também aos agricultores familiares que produzem cerca de 70% dos alimentos consumidos no país. De acordo com o relatório Perspectivas Agrícolas 2015-2024, publicado pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) e pela Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Econômico (OCDE), o Brasil é o segundo maior exportador agrícola mundial e o maior fornecedor de açúcar, suco de laranja e café (MOURA, 2017).

Desde a antiguidade agricultores desenvolvem maneiras de lidar com insetos, plantas e outros seres vivos que se difundem nos cultivos, competindo pelo alimento (RIBEIRO, 2011). Escritos de romanos e gregos mencionavam o uso do arsênico e enxofre para o controle de insetos nos primórdios da agricultura (PAPA, 2014). Após a Segunda Guerra Mundial, os agrotóxicos foram amplamente elogiados como uma nova arma científica na guerra contra pragas e patógenos de plantas. Desde então, uma variedade de fórmulas foi desenvolvida pela indústria química, as quais até hoje são difundidas no mercado mundial como insumos para a agricultura moderna (BORTOLOTTI, 2015). O aumento contínuo da população mundial e o impacto da

globalização da economia promoveram avanço de demandas de produção de alimentos cada vez mais eficientes e competitivas. Logo, tornou-se necessário satisfazer essas demandas depende do desenvolvimento da agricultura com base na geração de tecnologia que promovia aumentos da produtividade das culturas (PERES, 2013).

Nesse propósito, a década de 60, foi marcada pela adesão dos sistemas de produção agrícola pelas monoculturas extensivas, e, portanto, com baixo nível de diversidade biológica e alto aporte de insumos externos, especialmente os fertilizantes químicos sintéticos e os agrotóxicos (DUNLAP, 2015). Existiam incentivos públicos, que estimulavam o uso de agrotóxicos como instrumento tecnológico para aumentar a eficiência e garantia da produção agrícola, ocorrendo no mundo um aumento significativo de investimentos em fertilizantes, contaminando os solos e causando graves impactos na saúde, até mesmo a morte dos trabalhadores agrícolas (KROETZ, 2015)

Diferentes métodos de controle de pragas, incluindo o uso de ervas, óleos e cinzas, para tratar sementes e grãos armazenados foram utilizados em décadas passadas, muito embora essas primeiras práticas tenham ocorrido sem base científica, tornando-se uma ciência experimental dos sistemas naturais. Todavia, a mecanização da agricultura, o uso difundido dos produtos químicos, associados à melhoria considerável das condições de armazenamento, transporte e comunicação, permitiram, não só um aumento da produtividade, mas também, o desenvolvimento de novas áreas de terras (QUINTINELA, 2004).

Porém essa modernização gerou graves consequências quanto ao uso indiscriminado dos defensivos agrícolas, uma vez que as indústrias químicas enganavam a sociedade, afirmando que o uso era uma alternativa para aumentar a produção de alimentos e solucionar o problema da fome no planeta, influenciando positivamente movimentos pelo mundo para incentivar o uso de agrotóxicos pelos órgãos governamentais (NARANJO, 2015). Ainda não demonstraram os riscos, aos quais não estão restritos ao ambiente de trabalho e às pessoas diretamente envolvidas, mas que transcendiam esses espaços para as fronteiras dos países não poluidores (DE SILVA, 2016).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

Investigar compostos bioativos existentes nas folhas de leguminosas com potencial inseticida sobre microorganismos fitopatógenos e insetos-pragas de importância agrícola.

1.1.2 Específicos

- ✓ Extrair óleo essencial das folhas de *Hymenae courbaril* var *courbaril* L. utilizando a técnica de hidrodestilação em aparelho de cleverger;
- ✓ Caracterizar o óleo essencial extraído através de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/MS);
- ✓ Investigar os efeitos do óleo essencial na mortalidade e oviposição do *Tetranychus urticae*;
- ✓ Investigar a toxicidade por ingestão e efeito fumigante do óleo essencial, contra *Sitophilus zeamais*.
- ✓ Obter extratos com solventes orgânicos de diferentes polaridades crescente (ciclohexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol) a partir de folhas de *Hymenaea courbail* L. var. *courbaril* e *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (vell) Brenan;
- ✓ Realizar o screening fitoquímico dos extratos orgânicos obtidos;
- ✓ Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos, através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida (CBM);
- ✓ Analisar o extrato mais ativo por cromatografia líquida de alta performance (HPLC);
- ✓ Fracionar o extrato orgânico mais ativo por coluna de Sephadex e avaliar a atividade antimicrobiana das frações obtidas;
- ✓ Avaliar a toxicidade por ingestão de dieta artificial de *Sitophilus zeamais* sob o efeito dos extratos ativos;

- ✓ Calcular os parâmetros nutricionais, taxa de crescimento relativo e taxa de consumo relativo de *S. zeamais* sob o efeito dos extratos das folhas.
- ✓ Investigar o efeito fumigante dos extratos, contra *Sitophilus zeamais*.
- ✓ Investigar os efeitos dos extratos na mortalidade e oviposição do *Tetranychus urticae*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 AGROTÓXICOS NO BRASIL

No Brasil, a aplicação de produtos químicos, foi incentivada por um pacote tecnológico que introduzia a mecanização em larga escala, associada a outros fatores de produção, com propósito de aumento da produtividade, sem levar em conta os riscos à saúde ou ao ambiente (ALVES FILHO, 2012).

Acredita-se, que esse período foi o marco temporal para o desenvolvimento da moderna agricultura, implementando-se as inovações tecnológicas criadas para o setor agrícola como máquinas pesadas, fertilizantes químicos, sementes híbridas e os próprios pesticidas. Os primeiros registros de defensivos agrícolas sintéticos feitos no Brasil foram no ano de 1946. Nesse período, também foram introduzidos os inseticidas sintéticos e, em 1958, os antibióticos à base de sais de estreptomicina. A grande variedade de produtos sintéticos desenvolvidos pela indústria química mundial resultou em milhares de fórmulas comerciais para a agricultura (BARBOSA, 2014).

O Plano Nacional de Desenvolvimento Agrícola – PNDA, lançado em 1975, incentivava e exigia o uso de agrotóxicos, oferecendo investimentos para financiar estes “insumos” e ampliar a indústria de síntese e formulação dos mesmos no país, passando de quatorze fábricas em 1974 para setenta e três em 1985 (DERANI, 2015). A indústria química, favorecida pelos órgãos governamentais, nos anos de 1954 a 1960, registrou um grande número de novos produtos junto ao Ministério da Agricultura, resultando no crescimento das indústrias de formulações de substâncias químicas operando no processamento de produtos importados e obtidos localmente.

Neste processo de modernização da agricultura, configurou-se o agronegócio, onde as indústrias químicas, metalúrgicas e de biotecnologia, se beneficiaram como o capital financeiro apoiado por fortes bases político-institucionais, assim como no campo científico e tecnológico (FIGUEIREDO, 2017). As políticas públicas, a partir de 1960, criaram condições favoráveis ao desenvolvimento e fabricação dos pesticidas, políticas que alcançaram inclusive, o espaço acadêmico. Surgiram diversos institutos acadêmicos e de investigação científica e de pesquisa aplicada que valorizavam a utilização do processo biológico e vegetativo para assegurar o potencial produtivo da terra (MELO, 2011). O papel desempenhado pelo Estado foi fundamental para

incrementar a produção brasileira dos pesticidas, seja mediante as linhas de créditos agrícolas, seja com a isenção de tributos em benefício de empresas, especialmente norte americanas e européias, somadas à normatização favorecendo a disseminação dos agrotóxicos (PERES, 2013).

O governo federal, desde 1997, concede isenção de 60% do ICMS para os fabricantes de agrotóxicos, além de isenção do IPI, PIS/PASEP e COFINS. Alguns estados, como elemento de disputas pelos investimentos do agronegócio através da guerra fiscal, ampliaram estas isenções a 100%, beneficiando a indústria química e comprometendo o financiamento de políticas públicas como as de saúde e meio ambiente (TEIXEIRA, 2010). Desde 2015 o Brasil se tornou o maior consumidor mundial de agrotóxicos (SINDAG, 2018), movimentando 6,62 bilhões de dólares, para um consumo de 725,6 mil toneladas de agrotóxicos o que representa 3,7 quilos de agrotóxicos por habitante. Em 2015 as vendas atingiram 732,2 toneladas.

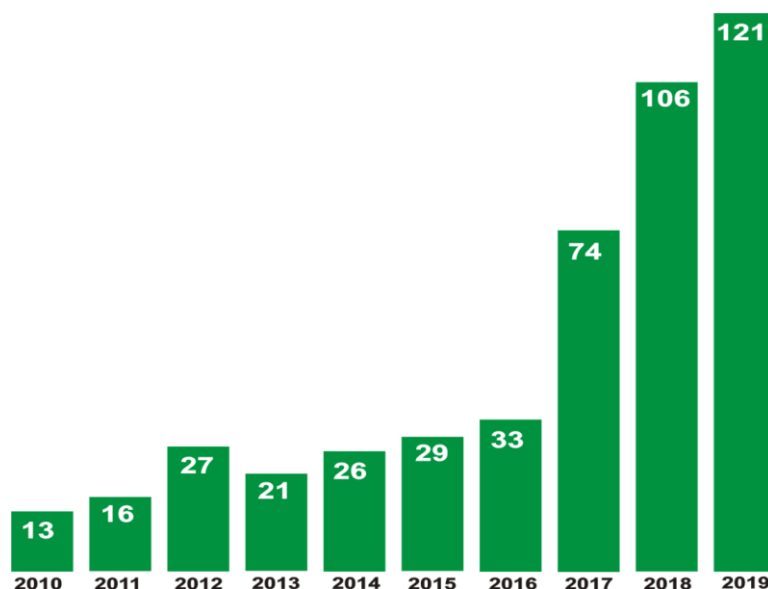
Recentemente, com a publicação no Diário Oficial, do ato nº10 da Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins, foi concedido para o ano de 2019 até o momento, o total de 166 (cento e sessenta e seis) agrotóxicos outorgados após a concessão de doze novos registros. Estatísticas anteriores apontavam que nos primeiros dois meses de 2019, foram oitenta e seis novos registros. Ao final de março, o total chegou a cento e vinte um como mostra a figura 1. Totalizando o número para 2.232 agrotóxicos, considerando os herbicidas, em circulação no mercado, ou seja, além do amplo uso, há ainda a grande gama de produtos disponíveis, o que maximiza a exposição e a avaliação de seus impactos sobre o ambiente e a saúde (GREENPEACE BRASIL 2019).

Entre a composição dos produtos com agrotóxicos aprovados pelo ministério destacam-se a introdução de substâncias novas e de agrotóxicos já existentes para comercialização no país. No entanto, entre elas serão permitidas a produção por mais empresas e em outras culturas agrícolas. Todavia, a liberação de agrotóxicos enfraquece as políticas públicas tradicionais voltadas ao meio ambiente e a produção de alimentos orgânicos (GRIGORI, 2019).

A expansão da demanda de agrotóxico no Brasil também foi estimulada por vários fatores, entre eles, destacam-se o elevado número de aplicações praticadas pelos agricultores desinformados, a deficiência do aparato institucional de controle dos

produtos, a expansão das áreas de monocultura e ainda a insipiência dos instrumentos institucionais voltados à defesa ambiental e dos consumidores, em relação aos aspectos tóxicos ligados aos produtos químicos. Esse contexto tornou o país extremamente dependente do consumo externo de defensivos, cujo mercado era controlado basicamente por empresas multinacionais (KOIFMAN, 2012).

Figura 1 - Agrotóxico liberados entre 01/01 e 21/03 de cada ano. Comparação da liberação de agrotóxicos na última década, no intervalo de três meses.



Fonte: GREENPEACE BRASIL (2019)

2.2 UTILIZAÇÃO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS E A RELAÇÃO COM MEIO AMBIENTE, TRABALHO E A SAÚDE.

A utilização de substâncias químicas para o combate das pragas e das doenças que atingem a produção de alimentos, sempre motivou grande discussão sobre os reais prejuízos e benefícios (ARAÚJO, 2015). O aumento do consumo dos defensivos agrícolas resulta em inúmeros problemas relacionados à degradação ambiental e à saúde pública, situação que alertou os especialistas e ambientalistas, a defender medidas de controle para registro, aquisição e aplicação dos agrotóxicos (ISMAN, 2011).

Apesar da utilização do inseticida sintético contribuir para um incremento significativo na produção de alimentos, especialmente grãos, a falta de manejo ou acompanhamento técnico sobre o manuseio adequado, acarreta danos. Dentre os principais problemas no manejo, encontram-se o aumento no número de

pulverizações, doses acima das recomendadas e negligência do período de carência (FRONZAGLIA, 2016).

Esse manejo inadequado contribui para a presença de efeitos maléficos sobre o meio ambiente e ao homem, dentre eles o ressurgimento das pragas-alvo, surgimento de pragas secundárias em função dos efeitos tóxicos sobre os inimigos naturais dessas pragas, desenvolvimento de resistências das pragas a esses produtos, intoxicação dos produtores rurais, contaminação da água e do solo, impactos negativos sobre os organismos não-alvo, presença de resíduos tóxicos nos alimentos dentre outros, como pode ser verificado na figura 2. (PIGNATI, 2012).

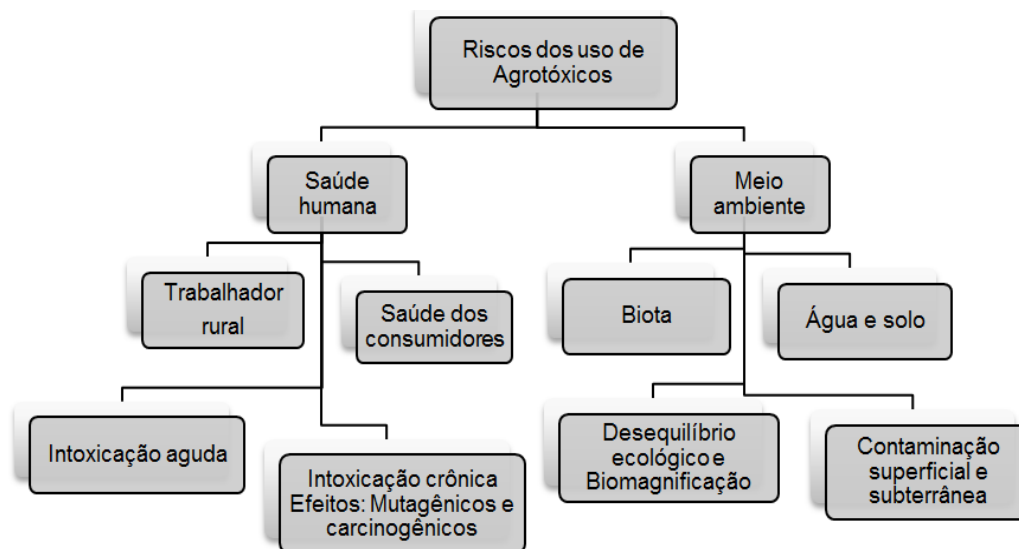
No início dos anos 60 surgem, os primeiros processos de reavaliação dos problemas de segurança e de eficácia dos agrotóxicos, essa discussão têm se intensificado, desde o começo da Revolução Verde, onde avaliou-se a necessidade de aceitar o uso deles e estabelecer regras que garantiriam a proteção das diferentes formas de vida expostas a biocidas. Desde então, estuda-se sobre as consequências do uso contínuo de produtos químicos não biodegradáveis nos ecossistemas em que peixes, aves, mamíferos e o homem constituem parte integrante (FERRARI, 1986).

Com o crescimento dos eventos relacionados a desastres ecológicos e à realidade com que se deparavam, diariamente, milhares de agricultores, homens, mulheres, crianças indefesas, vítimas de envenenamento por agrotóxicos, começaram a surgir pesquisas e estudos sobre os efeitos danosos do uso indiscriminado dos produtos químicos (PORTO, 2009). A partir de então, cientistas alarmavam o mundo sobre os riscos que os seres humanos estavam sofrendo com o envenenamento do meio ambiente diante da disseminação de substâncias químicas e condenava a liberação dessas substâncias sem o conhecimento integral de seus efeitos, bem como a necessidade urgente de mudanças em busca de práticas alternativas de menor impacto ao ambiente e à saúde humana (MACHADO, 2008).

Entre elas estão a obrigatoriedade do registro dos agrotóxicos, após avaliação de sua eficiência agronômica; avaliar a toxicidade para a saúde e sua periculosidade para o meio ambiente; o estabelecimento do limite máximo de resíduos aceitável em alimentos e do intervalo de segurança entre a aplicação do produto e sua colheita ou comercialização; regularizar a definição de parâmetros para rótulos e bulas; a fiscalização da produção, importação e exportação; as ações de divulgação e

esclarecimento sobre o uso correto e eficaz dos agrotóxicos; a destinação final de embalagens (VAZ, 2016).

Figura 2 - Riscos do uso dos agrotóxicos e suas complicações.



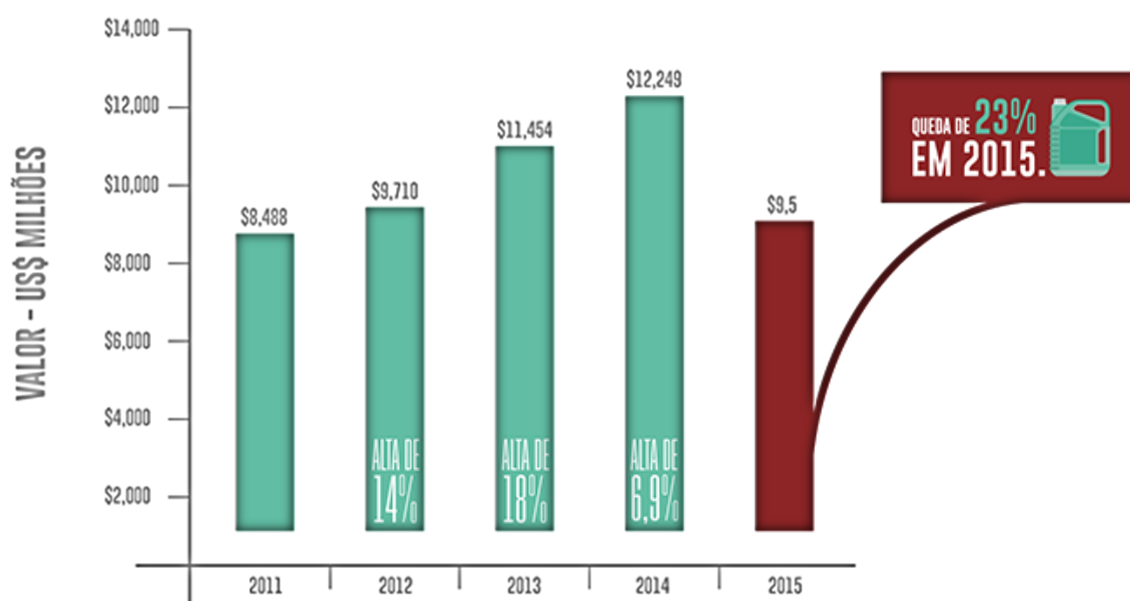
Fonte: Compilação do autor

O uso de agrotóxicos na produção de alimentos introduziu diferentes elementos no quadro de agentes degradadores ou poluentes no ecossistema. Trazendo uma nova preocupação à humanidade, devido a sua contribuição na poluição ambiental e no comprometimento da vida humana, afetando os recursos naturais e a vida de diversas espécies (ROCHA, 1998). A Revolução Verde, diante do padrão tecnológico, propiciou as grandes safras, porém cedeu lugar a uma série de preocupações relacionadas tanto aos seus impactos socioambientais quanto à sua viabilidade energética (LEFF, 2009). O agrônomo Eduardo Ehlers destaca várias consequências ambientais, dentre elas, a erosão e perda de fertilidade dos solos; a destruição florestal; a dilapidação do patrimônio genético e da biodiversidade; a contaminação dos solos, da água, dos animais silvestres, do homem do campo e dos alimentos.

Desta forma, para implementar o uso consciente e responsável dos agrotóxicos seria preciso estabelecer um eficaz programa, que incluiria a formação dos trabalhadores para o trabalho com agrotóxicos, a assistência técnica, o financiamento das medidas e equipamentos de proteção, a estrutura necessária para o monitoramento, a vigilância e assistência pelos órgãos públicos e participação dos responsáveis sociais no processo de tomada de decisões, dessa forma, poderia se reduzir os problemas fitossanitários ambientais e de saúde pública (GEREMIA, 2011).

Segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal (SINDIVEG), nos últimos anos, o aumento na utilização de produtos químicos pelos agricultores brasileiros tem se intensificado, sendo usados no mundo aproximadamente 2,5 milhões de toneladas de agrotóxicos. 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 (Figura 3). 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, que atinge níveis cada vez mais baixos e a dificuldade para obtenção de linhas de crédito rural (SINDIVEG, 2016).

Figura 3 - Vendas de Defensivos Agrícolas no Brasil (2011- 2015).



Fonte: SINDIVEG (2016)

2.3 IMPACTOS DOS FITOPATÓGENOS NA AGRICULTURA

Um dos grandes desafios da humanidade é a produção de quantidade suficiente de alimentos para sustentar a população mundial, que atingiu sete bilhões de pessoas em 2019, com projeção de onze bilhões para 2100, entretanto estudos revelam uma preocupação com a incapacidade de atender às necessidades humanas

por alimentos, devido ao declínio geral do crescimento da produtividade agrícola (SAATH; FACHINELLO, 2019).

Os patógenos de plantas ocorrem na natureza com o objetivo de, em parte, manter o equilíbrio entre microrganismos e a ciclagem de nutrientes, sendo, desse ponto de vista, benéficos (ZENGERER, 2018). Porém, destacam-se por apresentar grande ameaça à agricultura e à estabilidade do ecossistema, pois eles alteram a ecologia do solo do ambiente, degradam a fertilidade e, conseqüentemente, desencadeiam efeitos nocivos na saúde humana, além de contaminar as águas subterrâneas (LEMOS, 2017).

Os micróbios fitopatogênicos são descritos desde os primeiros relatos sobre a agricultura (10.000 anos atrás), desde então se busca alternativas para o controle desses organismos nocivos às plantas (insetos, ácaros, vírus, bactérias, fungos e nematóides). Alguns desses são causadores de diversas doenças consideradas pragas, conseqüentemente são responsáveis pelas maiores perdas agrícolas em todo o mundo, gerando um impacto negativo na economia (SILVA, 2011). 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 microrganismos 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 (VENTUROSIO *et al.*, 2011). Segundo Strange e Scott (2005), os fungos e bactérias fitopatogênicas são organismos que apresentam potencial para causar perdas catastróficas nas lavouras, devido ao fato de que, a maioria das espécies produz grandes estratégias responsáveis pela sua propagação, além disso, podem ser facilmente disseminados (vento, água, solo) a longas distâncias e infectar outras plantas.

Para mais, podem produzir toxinas e enzimas como as, que desestabilizam o mecanismo de resistência das plantas, podendo degradar os compostos da parede celular da planta, ocasionando a infecção no vegetal, e conforme o avanço da doença, o desenvolvimento da planta fica comprometido levando-a a morte (CRUZ, 2000).

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).

2.3.1 PATÓGENOS DE PLANTAS

2.3.1.1 Fitobactérias

No Brasil, há diversos desafios para controlar o desenvolvimento e resistência á fitopatogênos, que em sua maioria são responsáveis por causar grandes perdas na produção agrícola, pois essas patologias podem limitar a quantidade e a qualidade dos produtos vegetais, dentre essas doença, destaca-se a mancha aquosa (Figura 4a), a qual ocorre em sua maioria em melão (*Cucumis melo* L.) e melancia (*Citrullus lanatus* Thunb.) sendo destrutiva em regiões produtoras em todo mundo. É causada pela bactéria *Acidovorax citrulli* (Schaad), no Brasil, esse patógeno causa o impacto econômico muito significativo na cultura das Cucurbitáceas, principalmente os cultivados e exportados no Ceará e no Rio Grande do Norte. Nestes estados, as perdas de produção são estimadas em 40 a 50% (EPPO, 2013),

Pectobacterium carotovorum subsp. *Carotovorum*, outra fitobacteria de importância econômica é a causadora da podridão-mole (Figura 4b), ocorre em sua maioria em hortaliças e tubérculos como, alface (*Lactuca sativa* L.), batata (*Solanum tuberosum* L.), beterraba (*Beta vulgaris* var. *conditiva* L.), cenoura (*Daucus carota* L.), couve-chinesa (*Brassica pekinensis* Rupr.), pimentão (*Capsicum annuum* L.), rabanete (*Brassica rapa* L.), repolho (*Brassica oleracea* L.) e tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) esse hospedeiro é encontrado em âmbito mundial, acometendo campos de produção gerando severos danos pós-colheita (BUTNARIU *et al.*, 2018). Com elevada variabilidade fenotípica, essa fitobactéria *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi, é capaz de causar a murcha bacteriana (Figura 4c) em numerosos hospedeiros, no Brasil, as culturas mais afetadas estão entre as solanáceas, sendo uma doença limitante para essas culturas. Para o controle dessa praga são utilizados necessariamente, cultivares resistentes, a fim de minimizar a infestação dessa doença complexa e destrutiva que afeta mais de 200 espécies de plantas (WANG, *et al.*, 2019).

Dentro de gênero *Xanthomonas* são classificados diversos patógenos importantes, conhecidos por sua diversidade fitopatogênica e uniformidade fenotípica, pois produz pigmentos amarelos característicos do gênero, as xantomonadinas, devido à sua importância econômica, têm sido objeto de vários estudos quanto a patogenicidade (CHIESA, 2019). Segundo, Távora *et al.* (2019) a maioria das culturas econômicas é afetada por pelo menos uma espécie de *Xanthomonas*.

A *Xanthomonas campestris campestris* Pammel é a espécie mais heterogênea dentro do gênero (IGLESIAS-BERNABÉ, 2019) capaz de sobreviver em sementes, é o agente causador da doença da podridão-negra (Figura 4d), que acomete o cultivo das brássicas (repolho, couve, couve-flor, brócolis e mostarda), sua infecção resulta em desfoliação prematura devido a murcha e necrose dos tecidos foliares ao redor das nervuras, essa condição deprecia o produto e gera perdas de produção, resultando em quedas de rendimento (Távora *et al.* 2019). Desse mesmo gênero, a bactéria denominada *X. campestris* pv. *malvacearum* (Smith) é capaz de afetar a produção do maior produto têxtil mundial, o algodão (*Gossypium hirsutum* L.), de vinte e cinco doenças que ocorrem nessa cultura, a mancha angular (Figura 4e) é a mais difundida e destrutiva (Sandipan, 2018). Segundo Kalpana *et al.* (2014) ocorre perdas de 10 a 30% de rendimento. Ainda, no grupo das *Xanthomonas*, o cancro bacteriano (Figura 4f), causado pela *X. campestris* pv. *viticola*, afeta o cultivo da videira (*Vitis vinifera* L.), essa bacteriose é a principal causa da redução de produtividade desse fruto. As plantas infectadas produzem cachos com sintomas de cancro no engaço, inutilizando os frutos para a comercialização. Essa problemática gera danos fitossanitários e econômicos, já que no Brasil os estados da Bahia e Pernambuco são responsáveis por 32% da produção total de uvas de mesa no país, correspondendo a aproximadamente 98% da exportação anual brasileira de uvas (GUERRA, 2018).

Muitos processos biológicos ocorrem no campo da fisiologia, bioquímica e microbiologia, que têm o potencial para dar as condições biotecnológicas no controle de doenças agrícolas (PINOTTI; SANTOS, 2013). O que se observa é que as epidemias estão cada vez mais frequentes em agrossistemas, essa situação está intimamente relacionada à interferência humana, desencadeando a alteração do equilíbrio natural (Ghini e Bettiol, 2000). Doenças de plantas podem levar a custos de controle muito altos como ocorre em algumas fitopatologias, caso observado nas

doenças de cereais, cujo custo pode ser alto ou maior que o retorno esperado da cultura (BERGAMIN FILHO; KIMATI, 1995).

Figura 4. Sintomas causados por fitopatógenos. (A) Mancha aquosa manchas marrons necróticas que causam lesões no fruto do melão contaminando as sementes, (B) Podridão-mole_ degradação da polpa do tubérculo, causando coloração marrom escura resultante da oxidação dos tecidos infectados. (C) Murcha bacteriana_ lesões circulares brancas que provocam a deformação e necrose nos frutos. (D) Podridão negra_ infecta o interior da planta hospedeira, através dos estômatos ocasionando lesões amareladas, em forma de “V”. (E) Ferrugem bacteriana_ as lesões surgem ao longo das nervuras, abrangendo todo tecido foliar (F) Cancro bacteriano_ Lesões nas bagas e no ráquis do cacho.



Fonte: EPPO, 2013; PÉROMBELON, 2002; TÁVORA, 2019; SANDIPAN, 2018; GUERRA, 2018.

Para algumas doenças, poucas medidas de controle efetiva são conhecidas, sendo possível a obtenção de colheitas pela combinação de práticas culturais e uso de variedades parcialmente resistentes (LUCAS, 1998). São organismos bastante versáteis, com grande capacidade de adaptação a ambientes diversos. Ao contrário das bactérias patogênicas ao homem e aos animais, as fitobactérias têm uma temperatura ótima de crescimento e multiplicação entre 25 e 30°C pH ótimo em torno do neutro e a maioria são aeróbicas estritas (GOTO, 1992). Os fitopatógenos se caracterizam não somente pela alta incidência e severidade em culturas de valor econômico, mas também pela facilidade com que se disseminam e pelas dificuldades encontradas para o controle das enfermidades por elas incitadas.

2.3.1.2 Insetos praga: Biologia e Especificações

De acordo com Gallo *et al.* (2002) o termo “inseto-praga” caracteriza-se quando há um aumento desordenado de uma determinada população de inseto, ocasionando danos em plantas ou produtos de plantas e está diretamente relacionado a perdas na produção e prejuízos econômicos. Atualmente, o uso indiscriminado de insumos químicos para o controle de “pragas” tem proporcionado um desequilíbrio no número de insetos benéficos, além de ocasionar uma pré-seleção dos insetos resistentes a estes compostos (GUEDES, 2016).

Os insetos são os maiores responsáveis pelas perdas quantitativas e qualitativas durante armazenagem de grãos (MARANGONI, 2012). São capazes de causar danos diretos, quando atacam o produto a ser comercializados, ou indiretos, quando atacam estruturas vegetais que não serão comercializadas (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). Estes podem ser manejados, utilizando-se táticas físicas, culturais, biológicas e químicas, sendo estas últimas as mais utilizadas (DIETRICH, 2011).

Os insetos causam frequentemente danos extensivos aos grãos armazenados e aos produtos destes grãos. As perdas quantitativas podem atingir 5-10% nas regiões

temperadas e 20-30% nas regiões tropicais. Nesse cenário, amplia-se a necessidade de novas pesquisas e tecnologias para o controle destes (DOUGLAS, 2018). Globalmente, cerca de 20-40% do rendimento das culturas são perdidos por pragas e doenças os insetos representam uma parcela significativa dessa perda, tanto por danos diretos quanto indiretos através da transmissão de doença vegetal (DUNLAP, 2015). Reduzir o ônus das pragas das culturas é uma prioridade fundamental, uma vez que um aumento estimado de 70-100% na produção mundial de alimentos será exigido para 2050 para alimentar a crescente população humana (MOLINA, 2018). Existe um crescente consenso que este objetivo deve ser atingido pela intensificação sustentável, ou seja, aumento da produtividade sem degradação ecológica, e que essas mudanças na produção agrícola implicarão no aumento da automação e inovação biotecnológica (BOREL, 2017).

A produção agrícola brasileira se destaca no cenário mundial, pois ao longo de seu desenvolvimento sempre esteve associada ao setor econômico do país (PAZ, 2015). Porém esse crescimento também gerou fontes de alimento para as mais variadas espécies de insetos e roedores, além das bactérias e fungos que também atacam. Essas espécies se multiplicaram rapidamente, devido à grande quantidade de alimentos passando a interferir no bem-estar das pessoas sendo, por isso consideradas pragas (BUSBY, 2017).

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de grãos, segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2016) com uma produção de aproximadamente 196,5 milhões de toneladas, produzidos anualmente nas safras de inverno e verão em uma área estimada em 55,6 milhões de hectares. As perdas ocasionadas pelo ataque de pragas aos grãos armazenados são estimadas em cerca de 10% da produção. Considerando-se que a estimativa da produção brasileira em 2015/2016 foi de aproximadamente 180 milhões de toneladas (BRASIL, 2016), fica evidente a relevância destes prejuízos. Não apenas no Brasil, mas no mundo todo, a produção agrícola é reduzida pela ocorrência de pragas, doenças e plantas daninhas (RESS, 2004).

O controle de pragas é feito através de inseticidas sintéticos, que nem sempre são eficazes, além de apresentar toxicidade a mamíferos, causar a seleção de insetos resistentes, eliminar populações de inimigos naturais, deixar resíduos nos alimentos

e contaminar o meio ambiente (CANEPPELE; SANTAELLA, 2010; PAULIQUEVIS; FAVERO, 2015).

Um fator chave que contribui para a presença dos insetos (a classe Insecta) como praga de colheita é a sua diversidade. Os insetos são o grupo de animais mais ricos em espécies, onde dois terços delas (600.000 espécies) são fitófagos; ou seja, eles se alimentam de material vegetal vivo (excluindo o pólen e néctar). Praticamente todas as espécies de plantas são visitadas por pelo menos uma espécie de inseto fitófago, e muitas vezes por múltiplas espécies (GULLAN, 2007).

2.3.1.3 *Sitophilus zeamais* Mothschulsky: Gorgulho do milho

De acordo com Gallo (2012) o período de incubação dura de 3 a 6 dias, e da fase de ovo até a emergência dos adultos são 34 dias de desenvolvimento. As fêmeas vivem até 140 dias, colocando 282 ovos em média, durante 104 dias de oviposição. Após a eclosão das larvas, alimentam-se no interior dos grãos, construindo túneis à medida que se desenvolvem até a fase de pupa, permanecendo no interior do grão. Os adultos ao sair do grão provocam um grande buraco de emergência (Figura 5).

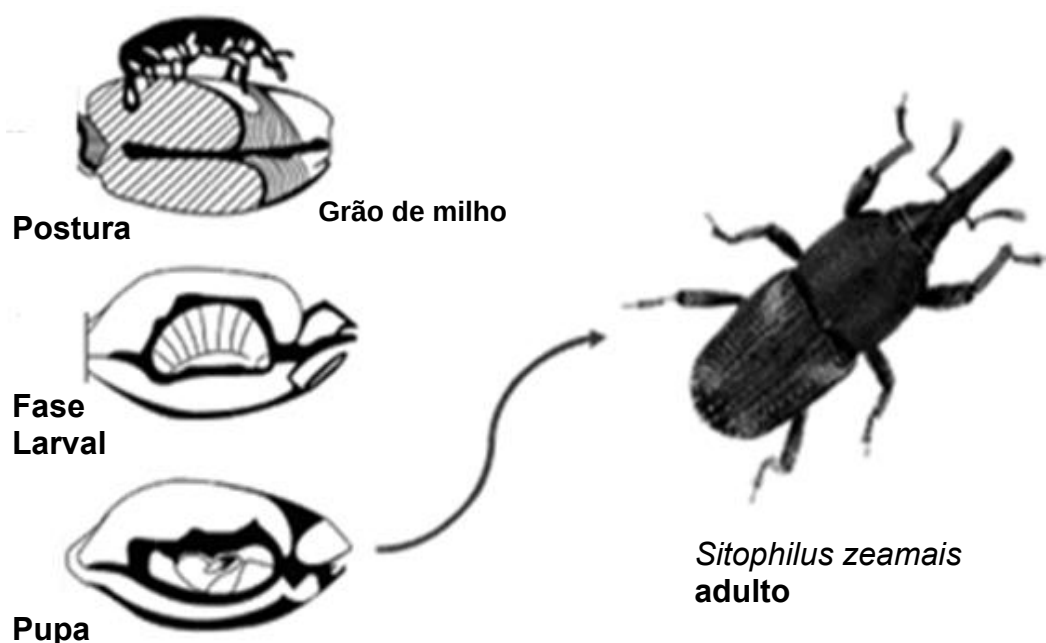
A cadeia de produção dos alimentos começa na colheita, distribuição e por fim na comercialização. Ao longo desses processos, a exposição de grãos a insetos é a principal razão para a contaminação e dispersão de pragas (BATEY, 2017). Os cereais são um dos principais grupos de alimentos afetados capazes de gerar perdas financeiras e causar impactos econômicos nas diferentes fases do agronegócio no mercado mundial (READER, 2015).

De acordo com KAGUCHIA *et al.* (2018), cerca de 90% da perda pós-colheita de grãos é causada por pragas de insetos. O gorgulho do milho (*Sitophilus zeamais* Mothschulsky) destaca-se por ser uma das pragas mais sérias que infestam milho e trigo (ILEKE *et al.*, 2011). As perdas no peso dos grãos podem variar de 20 a 30%, sendo que até 80% resulta do período de secagem, transporte e armazenamento no campo pré-colheita (ZAIIO *et al.*, 2018).

No Brasil, o gorgulho do milho se destaca, como uma das mais importantes pragas agrícolas, devido ao grande número de hospedeiros, elevado potencial biótico, capacidade de penetração na massa de grãos (postura), elevado potencial de multiplicação e infestação cruzada, ocasionando danos principalmente, aos grãos de

milho, arroz e trigo. (OLIVEIRA, 2017). Para Lorini *et al.* (2015) seus danos causam perdas de peso dos grãos e desvalorização comercial, perda no valor nutritivo e diminuição no poder germinativo das sementes, pois as larvas alimentam-se completamente dentro dos grãos inteiros. Barbosa (2015) descreveu em seus estudos que *S. zeamais* provoca danos significativos uma vez que perfuram os grãos sadios para sua alimentação e oviposição possibilitando a instalação de patógenos e pragas secundárias (Figura 6). Devido à capacidade de promover a inviabilidade da cultura ou dos grãos infectado (proliferação rápida) o gorgulho do milho é considerado uma praga, logo, há uma preocupação com o controle e manejo desse inseto.

Figura 5 - Ciclo de vida do *Sitophilus zeamais*. A postura dos ovos pela fêmea é feita no grão onde a larva completa o seu desenvolvimento, passa ao estágio de pupa até a emergência do adulto no seu interior.



Fonte: WFP (2009)

Atualmente diversos agrotóxicos são utilizados através da fumigação, que consiste na aplicação de inseticidas apresentados em forma sólida, esse método é capaz de eliminar todas as fases de desenvolvimento dos insetos, pois age no sistema respiratório promovendo a eliminação dos mesmos, entretanto o uso contínuo desenvolve a resistência das pragas (diminui a eficácia), prejudica insetos benéficos, aumenta a toxicidade e poluição ambiental, e gera o acúmulo de resíduos tóxicos para consumo humano levando a preocupações com a saúde (MOURA, 2018)

Nesse contexto o uso de métodos mais seguros, baratos e ecologicamente corretos são uma alternativa para o gerenciamento ao ataque dessa praga. O uso de materiais vegetais, como óleos e extratos de plantas podem ser uma alternativa de proteção os grãos dos danos causados pelos insetos (SOIJANYA, 2016).

Figura 6 - Danos em grãos de milho e arroz causados por *Sitophilus zeamais*.

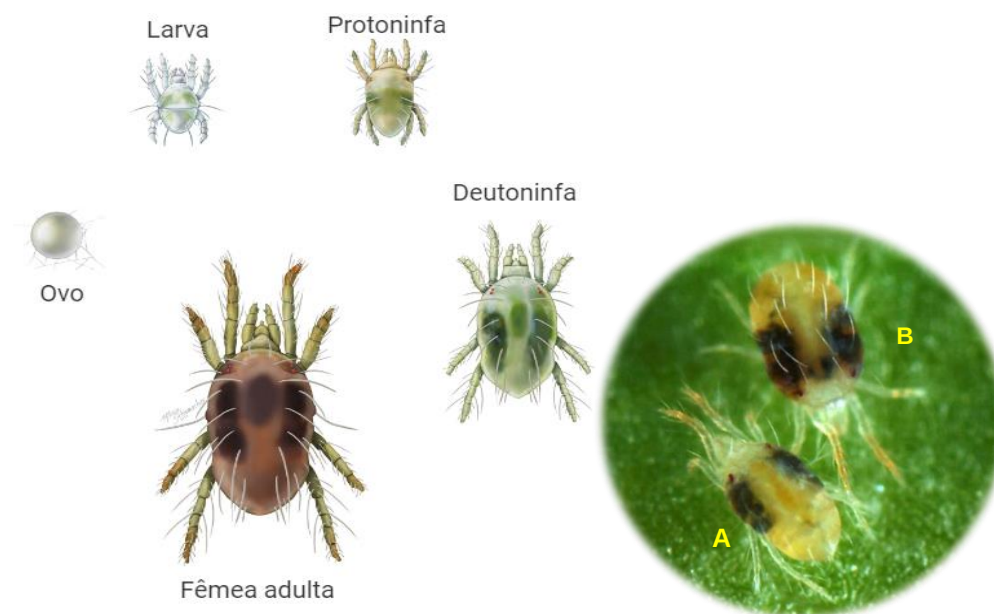


Fonte: LIANOS (2008).

2.3.1.4 Tetranychus urticae Koch: Ácaro rajado

Tetranychus urticae conhecido popularmente como ácaro rajado, cujo ciclo de vida completo dura cerca de 14 dias, apresenta alta capacidade reprodutiva, colocam até 100 ovos (cerca de 10 por dia), esféricos de coloração amarelada. São insetos hemimetábolos, ou seja, sofrem metamorfose entre as fases, quando jovem e adulto, diferi apenas pelo tamanho. Apresentam três pares de patas na fase de larva e quatro nas fases de ninfa. Os adultos podem ser vistos a olho nu e apresentam acentuado dimorfismo sexual (ISMAIL *et al.*, 2019). Suas fêmeas são de maior tamanho e corpo mais volumoso, com cerca de 0,46mm de comprimento apresentam no dorso coloração amarelo-esverdeada escura, coberto por longas setas e possui duas manchas escuras em cada lado, os machos medem, aproximadamente, 0,25mm de comprimento, tendo a parte posterior do corpo mais afilada (Figura 7). Após a colonização da planta, a fêmea produz teia na parte abaxial das folhas, um entrelaçado de fios de seda que, posteriormente, apresenta característica de uma teia, onde ocorrerá a oviposição (Figura 8) (BENSOUSSAN *et al.*, 2018).

Figura 7. Fases de desenvolvimento do *Tetranychus urticae* (ácaro rajado). Ovos: translúcidos, postura ocorre entre os fios de teia. Larvas: são incolores e do tamanho do ovo, caracterizando-se por apresentar três pares de patas. Protoninfa e deutoninfa: estágio móvel e imaturo possui quatro pares de patas. Fêmea adulta: apresenta duas manchas no dorso. O período de desenvolvimento de ovo a adulto pode variar entre 5 e 50 dias, dependendo dos fatores ambientais. Ácaros adultos (A) Macho, (B) fêmea.



Fonte: LA CRUZ (2018).

Para se alimentar, o ácaro ataca às folhas e suga a seiva vegetal, causando o amarelecimento da folha reduzindo a capacidade fotossintética da planta. Mesmo preferindo a parte abaxial das folhas, onde produz uma grande quantidade de teia, causando manchas branco-prateadas, seu dano direto também pode ser evidenciado com facilidade na face superior da folha, observando-se nesse caso puncturas cloróticas as quais evoluem até o secando da folha (SEIFI *et al.*, 2018). As gerações seguem umas às outras e o ácaro é encontrado em grande número. A disseminação ocorre pela passagem de uma planta para outra (por contato), por terra a pequenas distâncias, pelo transporte em objetos ou pessoas ou pelo vento (BADAWY *et al.*, 2018).

Esta espécie é cosmopolita e polífaga, atacando quase 200 hospedeiros diferentes, dentre eles, plantas selvagens, ornamentais, vegetais e frutos cultiváveis (OTIENO, 2018). De acordo com Santos *et al.* (2017), *T. urticae* pode reduzir tanto a qualidade como a quantidade de frutas e vegetais produzidos, por isso é considerado uma das mais importantes pragas agrícolas, infestando diversas culturas, como o algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.), morangueiro (*Fragaria ananassa* L.), santonilas (*Santonila chamaecyparissus* L.), tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), feijoeiro

(*Phaseolus vulgaris* L.), soja (*Glycine max* L.), pessegueiro (*Prunus persica* L.) entre outras (LOPES *et al.*, 2017). No Brasil, ocorre durante todo o ciclo da cultura do morangueiro, mais especialmente durante a época de frutificação e colheita de frutos, essa praga pode reduzir a produção de frutos em até 80%, no ponto máximo de desenvolvimento da população, pois causam infestações intensas nas folhas e reduzem o crescimento e a produtividade (KARLEC *et al.*, 2017). O ácaro rajado, também é citado como pragas na cultura do milho (*Zea mays* L.) no Estado da Flórida (EUA), com perda anual estimada na produção da ordem de 10 a 20 milhões de dólares, mesmo com a adoção de práticas culturais convencionais e uso de acaricidas (ABDELGALEIL *et al.*, 2019). Classifica-se também como uma das pragas-chave do mamoeiro *Carica papaya* infestando a cultura durante todo o ano, durante a infestação há redução da área fotossintética por causa da necrose de tecidos foliares e queda prematura de folhas, logo seu desenvolvimento e produtividade são restringidos e seus frutos ficam mais expostos ao sol, o que compromete a qualidade dos mesmos (MORO *et al.*, 2012). De acordo com, Cruz *et al.* (2014), em plantas ornamentais, há elevado dano econômico, em cultivos como rosas, crisântemo, gérbera e orquídeas, os impactos nesses cultivos provocam reduções na qualidade do produto final (figura 8).

O controle dessa praga agrícola global é dificultado pelo seu alto potencial reprodutivo, pela baixa eficiência dos produtos utilizados e principalmente devido à existência de várias populações desta espécie resistentes a acaricidas, este fato tem levado a uma pressão de seleção sobre as populações de ácaro a vários defensivos, em diversos países (RAYMOND *et al.*, 2009). Em trabalhos realizados pelo Instituto Biológico, constatou-se casos da resistência de *T. urticae* a acaricidas como dimetoato (CRUZ *et al.*, 2012), cihexatin (SANTOS 2016), naled (ALVAREZ, 2016), mevinfós (SANTOS 2017), e propargito (BARBOSA, 2015). Além disso, altos níveis residuais de acaricidas produtos agrícolas são uma ameaça ao meio ambiente e a saúde (PREMALATHA *et al.*, 2018.) Por estas razões, pesquisas direcionadas a busca de alternativas eficazes, naturais e por consequência ecologicamente corretas, através do uso de metabolitos secundários vegetais são extrema importância para lidar com o manejo desta praga.

Figura 8. Sintomas da infestação por *Tetranychus urticae*. (A) formação de teias pelas fêmeas para oviposição, (B) plantas de morango com grande quantidade de teia em alta infestação, (C) ataque ao milho, fêmeas e ovos na folha, (D) sintomas clorose causada por infestação do acaro rajado provocando danos no mamoeiro, folhas amareladas e aclorofiladas, (E) infestação em flores ornamentais.



Fonte: SATO, 1994.

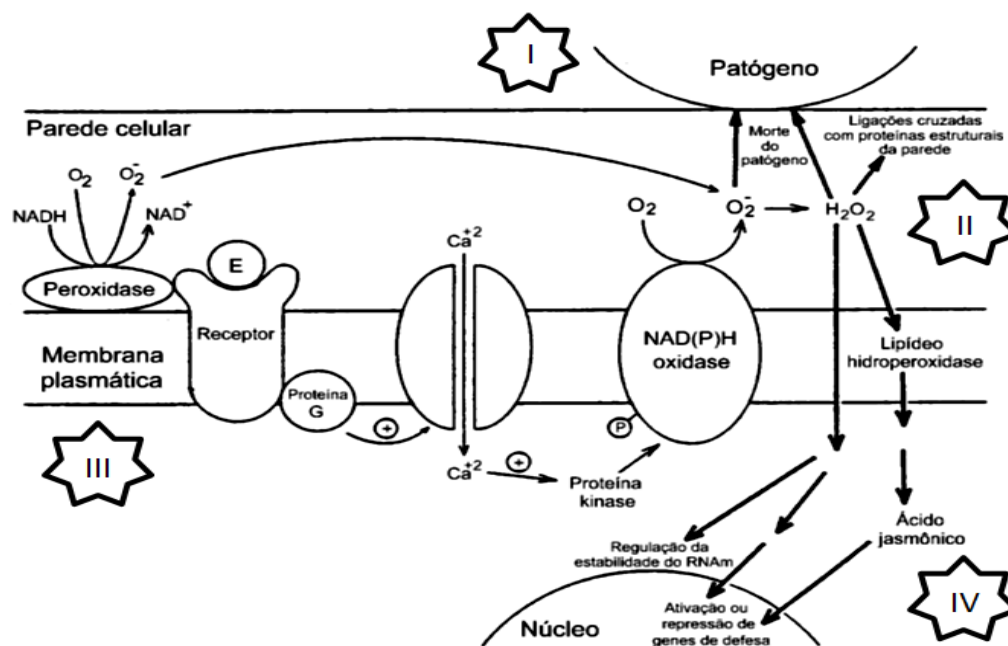
2.4 ESTRATÉGIAS VEGETAIS CONTRA O ATAQUE DE PATÓGENOS

2.4.1 Defesa vegetal

O sistema de defesa vegetal é multicomponente, atuando de maneira dinâmica e coordenada, no momento e local apropriados (GOODMAN *et al.*, 1986), logo, as plantas podem atuar de diferentes maneiras quando em contato com patógenos, a figura 9 demonstra alguns desses mecanismos: **I)** diretamente sobre o patógeno, inibindo seu desenvolvimento; **II)** fortalecendo a parede celular por favorecer a formação de ligações cruzadas com proteínas estruturais; **III)** peroxidação de lipídeos da membrana plasmática, fortalecendo sua integridade devido à redução da sua fluidez; **IV)** o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a espécie reativa de oxigênio mais estável é prontamente transportada através da membrana, pode regular a expressão de genes requeridos para a ativação da resistência ou pode formar ácido jasmônico, um

mensageiro secundário, a partir da atividade da enzima lipídio hidroxiperoxidase presente na membrana plasmática (DOOKE *et al.*, 1996).

Figura 9 - Componentes envolvidos nos efeitos sobre o patógeno ou sobre a ativação de mecanismos de defesa das plantas.



Fonte: STANGARLIN (2011).

Essa complexidade funcional, espacial e temporal inicia-se com o reconhecimento, pelo hospedeiro, de sinais exógenos provenientes do patógeno, ativando o mecanismo de transdução desses sinais resultando em extensa reprogramação do metabolismo celular vegetal, envolvendo mudanças na atividade gênica (WALTERS *et al.*, 2007).

Além desses mecanismos, novas medidas de proteção de plantas são desenvolvidas, ou seja, tecnologias voltadas para a agricultura de base agroecológica um exemplo disso é a indução de resistência, que é ativação de mecanismos de defesa vegetal para o controle de pragas e doenças. Atualmente, inúmeras pesquisas se concentram no fenômeno da especificidade entre o patógeno e o hospedeiro, fenômeno de reconhecimento, do papel das fitotoxinas e enzimas microbianas extracelulares na patogênese e dos fatores bioquímicos de resistência, como compostos fenólicos, fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese. Um dos métodos encontrados para obter essa proteção natural, é o uso de óleos essenciais e extratos de plantas, uma vez que os mesmos possuem compostos secundários que

tanto podem ter ação antimicrobiana direta, como elicitora (ação inditera), ativando mecanismos de defesa nas plantas (JOHAL *et al.*, 2015).

2.5 PRODUTOS NATURAIS COMO ALTERNATIVA À AÇÃO DE FITOPATÓGENOS.

Ao longo do tempo, diversos estudos permitiram fazer uma associação entre diferentes espécies medicinais e suas respectivas atividades biológicas, a partir da observação, descrição e investigação experimental (SORO, 2016). Tais estudos foram apoiados principalmente nos conhecimentos de botânica, química, bioquímica e farmacologia, contribuindo amplamente para a descoberta de produtos naturais bioativos (FARNSWORTH, 1994).

Devido à grande biodiversidade, muitas classes de princípios ativos têm sido isoladas a partir de plantas brasileiras (VALLI *et al.*, 2013). Nesse contexto, o Brasil representa um vasto potencial de descoberta de novos pesticidas naturais (OLIVEIRA *et al.*, 2013; PROCÓPIO *et al.*, 2015). Além disso, há um grande interesse no estudo de plantas com potencial biotecnológico justificado pela crescente necessidade de desenvolver uma agricultura sustentável e ao mesmo tempo reduzir os danos ambientais e à saúde humana provocados pela introdução de compostos químicos (agrotóxicos), e dessa forma encontrar alternativas ao uso de produtos sintéticos prejudiciais (TAIZ, 2012). Para tal, torna-se necessária a recuperação do conhecimento que a população detém sobre o uso dos recursos naturais, resgatando as informações que irão contribuir para a ciência contemporânea (VENDRUSCOLO *et al.*, 2005; LEITÃO *et al.*, 2009).

As principais vantagens relacionadas ao uso de produtos de origem natural para proteção de plantas devem-se ao fato de serem menos tóxicos, ter a capacidade de se degradar facilmente pelo ambiente, serem oriundos de recursos renováveis e por possuírem um amplo modo de ação (UHLENBROCK *et al.*, 2018). 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 (UHLENBROCK *et al.*, 2019). 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 (SIAH *et al.*, 2018).

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 (HASHIDOKO, 2018).

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 *Lonchocarpus* spp. (Leguminosae), a sabadina e outros alcaloides 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)

2.6 BIOTECNOLOGIA E AGRICULTURA

O estabelecimento de uma agricultura sustentável, que preserve o meio ambiente e proporcione segurança alimentar futura, é um fator primordial para o desenvolvimento da humanidade, frente às mudanças climáticas e o declínio das reservas energéticas não renováveis (BOJASE-MOLETA, 2018). Diante das previsões de crescimento populacional mundial, existe o desafio de criar métodos avançados e eficientes para aumentar a produção de alimentos sem esgotar os recursos naturais (Ash *et al.*, 2018).

Em 2050, o mundo provavelmente estará viverá sob a influência de três grandes crises anunciadas: a diminuição das reservas de petróleo, a escassez de água potável e a falta de alimentos para grande parte da população (SOMMERVILLE, 2017). Nesse cenário, a biotecnologia de controle a pragas vegetais, ocupa papel central na busca de soluções para atenuar os problemas, atuais e futuros, causados pelo estilo de vida adotado pelo homem (DEPPA, 2018).

Segundo a Organização das Nações Unidas (ONU), estima-se que há no mundo mais de 1,2 bilhões de pessoas sem acesso à água potável, representando cerca de 20% da população mundial (UNESCO, 2015). A agricultura é responsável por cerca de 70% do consumo de água do planeta e o uso descontrolado de pesticidas e fertilizantes contribui para a contaminação da água de lençóis freáticos e mananciais subterrâneos (Aquastat-FAO, 2014). Para aperfeiçoar a eficiência do uso da água na agricultura, a biotecnologia atua em duas frentes: no desenvolvimento de espécies tolerantes a seca, diminuindo a irrigação intensiva e conservando a água no solo, e no melhoramento genético de variedades para resistência a pragas e doenças, reduzindo a necessidade da utilização de produtos químicos nas lavouras (NAJIMI, 2013). Nesse contexto, a biotecnologia consiste no desenvolvimento e utilização de um sistema de processos e produtos de interesse econômico, social e sustentável (ROCHA, 2013).

O desenvolvimento de métodos alternativos no controle de fitopatógenos, com a finalidade de diminuir a dependência dos agrotóxicos, contribui para se praticar uma agricultura que seja mais adequada às novas necessidades globais (TAWFIKE, 2019). Dentre esses interesses biotecnológicos está a obtenção de metabólitos secundários, oriundos de extratos botânicos e óleos essenciais, que são de grande importância para novas descobertas de compostos praguicidas. Tais metabólitos, cuja produção é atribuída a vários genes, estão entre os produtos naturais mais importantes utilizados para inibir o crescimento de diversos fitopatógenos (PAMPHILE, 2017).

De acordo com Conceição et al. (2018) inúmeros trabalhos atestam o potencial de óleos e extratos vegetais de forma direta ou indireta induzindo o acúmulo de fenóis e fitoalexinas em tecidos vegetais infectados. Estes métodos de controle alternativos são viáveis e desejáveis quando comparados com o controle tradicional, principalmente por não deixarem resíduos tóxicos, quando aplicados em pré ou pós

colheita (SUZUKI, 2019). Desta forma, minimiza-se a preocupação com produtos contaminados com resíduos químicos tóxicos, microbiológicos ou com outros tipos de contaminação.

Outra alternativa simples e efetiva para controle fitossanitário, é a utilização de cultivares resistentes, esse manejo pode ser aplicado a partir do conhecimento genético da população do vegetal e do comportamento epidemiológico do patógeno, nesse contexto, técnicas moleculares têm permitido o desenvolvimento de novas estratégias de controle (DIÁNEZ, *et al.* 2018).

2.6.1 Metabólitos como precursores de novas moléculas praguicidas.

Plantas e pragas coexistem há aproximadamente 350 milhões de anos e desenvolveram uma série de relações as quais afetam esses organismos em todos os níveis, da bioquímica á genética. No entanto, essa relação longínqua, fez com que o vegetal desenvolvesse estratégias e mecanismos para tentar resistir ou escapar da ação de patógenos (ALMEIDA, 2017).

Algumas espécies vegetais acumulam níveis elevados de compostos que funcionam como defesas bioquímicas, esses processos ocorrem no interior da planta e em sua maioria demonstram extraordinária complexidade. Esses procedimentos constituem, em conjunto o metabolismo vegetal, capaz de permite o crescimento, desenvolvimento e reprodução, possibilitando assim a perpetuação das espécies (FU *et al.*, 2018).

As plantas produzem uma grande variedade de componentes orgânicos, que podem ser classificados em dois grupos de acordo com a via metabólica responsável pela sua síntese (GROENIGEN *et al.*, 2015), metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários são compostos por uma série de processos envolvidos na manutenção fundamental da sobrevivência e do desenvolvimento das plantas, como armazenamento de energia (PEREIRA, 2016). Envolvem compostos como os carboidratos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, e são responsáveis por processos metabólicos que desempenham uma função essencial (crescimento, desenvolvimento, manutenção das células, respiração, reprodução, fotossíntese) (DOMINGO, 2013).

Segundo Mueller, (2007) esses compostos apresentam distribuição universal, são uniformes e conservativos, e estão associados a todos os processos fotossintéticos que originam a formação de ácidos carboxílicos do ciclo de Krebs, aminoácidos, carboidratos, ácido graxos, proteínas e ácidos nucleicos, todos envolvidos nos processos vitais da planta. Kabera *et al.* (2014) referiram que os metabólitos primários possuem função estrutural, plástica e de armazenamento de energia, além disso são os grandes precursores dos metabólitos secundários, estes são encontrados principalmente em plantas, fungos e outros microrganismos, mas também estão presentes em animais.

Devido à condição sésil, as plantas tornam-se mais susceptível as pressões ambientais e situações estressantes, inclusive da ação dos herbívoros, portanto, utiliza como forma de defesa, estruturas físicas e composição química (HERNANDEZ, 2018). Nesse contexto os metabólitos secundários possuem importante função para a sobrevivência, competição no ambiente, ação protetora em relação aos estresses abióticos (deficiência de nutrientes minerais, temperatura, disponibilidade de água, entre outros) e bióticos (ataque de patógenos, herbivoria, competição entre plantas, atração de polinizadores); e, apresentam efeitos biológicos, com grande importância ecológica e taxonômica (ZHANG, 2011).

A tabela 1 correlaciona alguns fitoquímicos antimicrobianos que podem ser divididos em três grandes classes por meio da observação de sua estrutura química: compostos nitrogenados (alcaloides, aminoácidos não protéicos e glicosídeos cianogênicos), terpenoides (óleos essenciais, triterpenos, saponinas) e os fenólicos (ligninas, flavonoides e taninos) (RICKLEFS, 2003). Esses compostos atuam, sobretudo nos inimigos naturais, predadores e parasitoides, onde na maioria interferem nas vias metabólicas ou nos processos fisiológicos do patógeno (ZHAO, 2016).

Tabela 1. Principais classes de compostos antimicrobianos de plantas.

Classes	Subclasse	Compostos	Mecanismos	Ref.
Fenólicos	Fenóis simples	Catecol Epicatequina	Ruptura de membrana Destruição do substrato	PERES, 1997 TODA, 1992
	Quinonas	Hipercina	Inativa as enzimas, forma moléculas na parede celular	DUKE, 1985

Flavonoides	Chrysin	Inativa enzimas	PERRETT, 1995
Flavonas		Rompimento da parede celular	ROJAS, 1992
Taninos	Abissitona Ellagitannim	Inativa enzimas Liga-se a proteínas; Vincula a adesões; Inibição enzimática; Destruição de substrato; Rompimento parede celular; Ruptura de membrana	TANIGUCHI, 1993 STERN, 1996; SCALBERT, 1991; HASLAM, 1996; YOSHIKAWA, 1994; ROJAS, 1992
Cumarinas	Varfarina	Interação com DNA eucariótico (atividade antiviral)	KEATING, 1997
Terpenoides	Capsaicina	Ruptura de membrana	CICHEWICZ, 1996
O. Essencial	Berberina	Interfere na parede celular e/ou DNA	HOUGHTON, 1994
Alcaloides	Piperina		

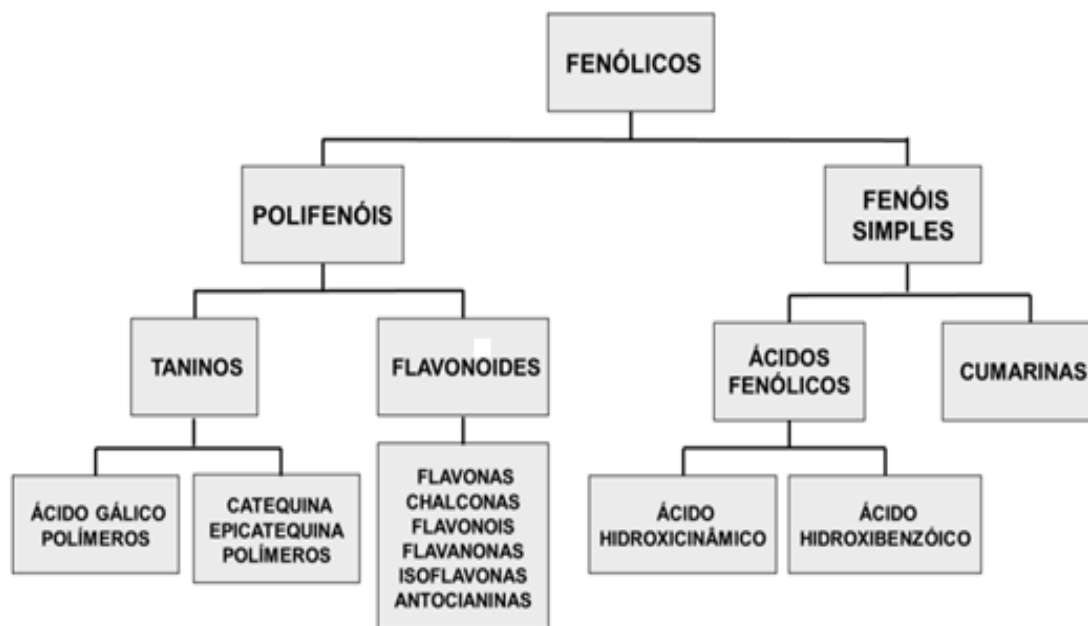
2.6.1.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são uma ampla classe de bioativos, resultantes do metabolismo secundário das plantas em resposta a estresses bióticos e abióticos, tais como seca, umidade, insetos e plantas hospedeiras (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Eles podem ser definidos como compostos químicos que possuem como estrutura básica um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxila, são classificados com base no número de unidades de fenol na molécula, e nesta classe destacam-se os flavonoides e os ácidos fenólicos (MOOZ *et al.*, 2012).

Diversos estudos mostram que os mesmos, têm vários efeitos positivos na saúde humana (ZHANG *et al.*, 2016). Além disso, evidências demonstram uma infinidade de efeitos antimicrobianos contra uma variedade de patógenos humanos (REYGAERT, 2014). No entanto, menos estudos testaram as atividades antimicrobianas dos compostos fenólicos em fitopatógenos.

O termo “fenólicos” engloba um grupo superabundante e diversificado de compostos químicos, que são subdivididos de acordo com o número de subunidades de fenol presentes na molécula, classificados entre polifenóis e fenóis simples (SCHAFRANSKI, 2019). As principais classes e subclasses de compostos fenólicos podem ser observadas na Figura 10.

Figura 10 - Classificação dos compostos fenólicos.



Fonte: Adaptado de LUTHRIA (2006).

Estão envolvidos na defesa contra organismos patogênicos, radiações ultravioletas, ferimentos e infecções (DAIUTO *et al.*, 2014). Apresentam diversas funções de defesa para as plantas, não somente contra agentes do meio ambiente (luz, temperatura e umidade), mas para fatores internos incluindo diferenças genéticas, nutrientes, hormônios, contribuindo para a sua síntese (RODRÍGUEZ-CARPENA *et al.*, 2011). Desempenham diversas funções, estando envolvidos na síntese de proteínas, atividades enzimáticas, fotossíntese, componentes estruturais, alelopatia e na captação de nutrientes (OLIVEIRA, 2015).

Devido aos potenciais riscos ambientais e à saúde causados por pesticidas químicos, o desenvolvimento de pesticidas botânicos têm despertado grande interesse entre os pesquisadores (YU *et al.*, 2015). Nesse contexto, os compostos fenólicos têm diversas propriedades antimicrobianas contra um amplo espectro de patógenos de plantas (YANG, *et al.*, 2017) podendo classificá-los como agentes de biocontrole, além disso, estima-se que o desenvolvimento de técnicas de aplicação contribui para o controle á fitopatógenos de uma maneira menos nociva para o meio ambiente do que os pesticidas químicos existentes (YANG; ZHANG, 2019).

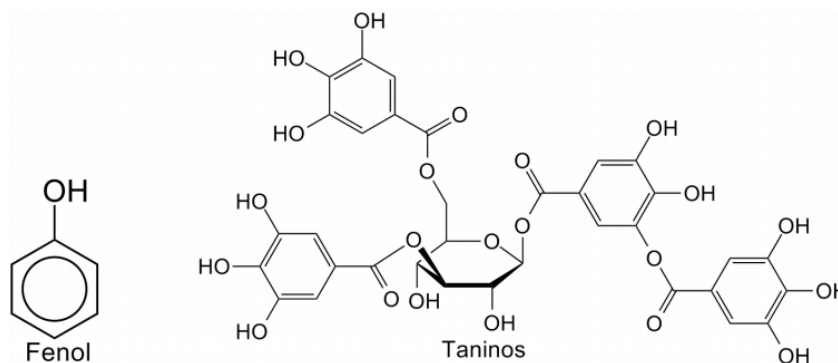
Diversos produtos naturais, entre os quais os óleos essenciais e extratos de plantas, têm mostrado a capacidade de controlar doenças em plantas, devido a sua atividade antimicrobiana (PEREIRA, 2011). Essa característica já foi comprovada por

diversos estudos que favorecem o manejo de uma agricultura sustentável (HARBORNE; WILLIAMS, 2000). Alguns produtos comerciais à base de extratos vegetais apresentam esse potencial, como é o caso do *Ecolife*, sendo este, um produto comercial para o controle de *Xanthomonas*, *Erwinia* e *Pseudomonas*. O mesmo é constituído por ácido ascórbico, cítrico, láctico, compostos fenólicos, flavonóides e fitoalexinas (ALVES, 2012). São fontes de substâncias fenólicas as frutas cítricas, frutas vermelhas, legumes, vegetais e outras plantas, constituídas principalmente de ácidos fenólicos, flavonoides e taninos (WEISSMAN, 2016).

Ocorrem em estruturas múltiplas, devido à grande diversidade de combinações que sucedem na natureza, que podem ser categorizadas em inúmeras classes. Entre os compostos fenólicos (Figura 11), existem moléculas simples, como ácidos fenólicos ou estruturas complexas, como taninos hidrolisáveis (HARBORNE et al, 1999).

Diversos pesquisadores têm trabalhado no isolamento, identificação, quantificação e utilização dos compostos fenólicos, enfrentando muitos problemas metodológicos, pois, além de englobarem uma gama de substâncias são, na maioria das vezes, de grande polaridade, muito reativos e susceptíveis à ação de enzimas (KYNGMI; EBELER, 2008).

Figura 11 - Diferenças em estruturas fenólicas.



Fonte: Adaptado SOTO et al. (2015)

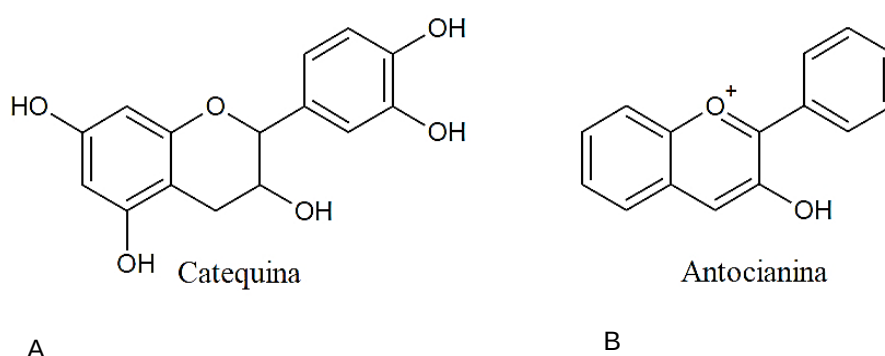
2.6.1.2 Flavonoides

Esta classe de compostos apresenta uma grande diversidade, com cerca de 8000 identificados (LAMPILA et al., 2018), constituindo o maior grupo de compostos fenólicos de plantas (NESELLO, 2015). Estão amplamente distribuídos nas frutas e nos vegetais, apresentando-se em dois grupos, do primeiro fazem parte os flavonóides (catequina) (Figura 12A), epicatequina e epigallocatequina), flavonóis (caempferol, quercetina e miricetina) e antocianinas (Figura 12B) e ao segundo grupo

pertencem os ácidos fenólicos, hidroxibenzóicos (ácido salicílico, gálico, elágico, protocatéico e vanílico) encontrados em morango, uva, laranja, limão e tangerina, e hidroxicinâmicos (ésteres, ácidos caféico, cumárico e felúrico) e estão presentes em alimentos como maçã, pêra, cereja e damasco (GOUVÊA, 2012).

Diversas funções vegetais são atribuídas aos flavonoides, dentre elas a coloração do aparato polinizador da planta (cor de flores e pétalas); proteção contra injúria provocada pela radiação UV; ação repelente contra animais herbívoros e insetos, devido a sua natureza tóxica; resistência a patógenos; barreiras estruturais e bioquímicas pré e pós-formadas e efeito alelopático através da liberação de compostos voláteis que podem estimular ou inibir o desenvolvimento de plantas vizinhas (HARBORNE; WILLIAMS, 2000, ZUANAZZI; MONTANHA, 2003; ROCKENBACH, 2008). Além de serem utilizados como marcadores taxonômicos, devida a sua especificidade em algumas espécies (ZUANAZZI, 2000).

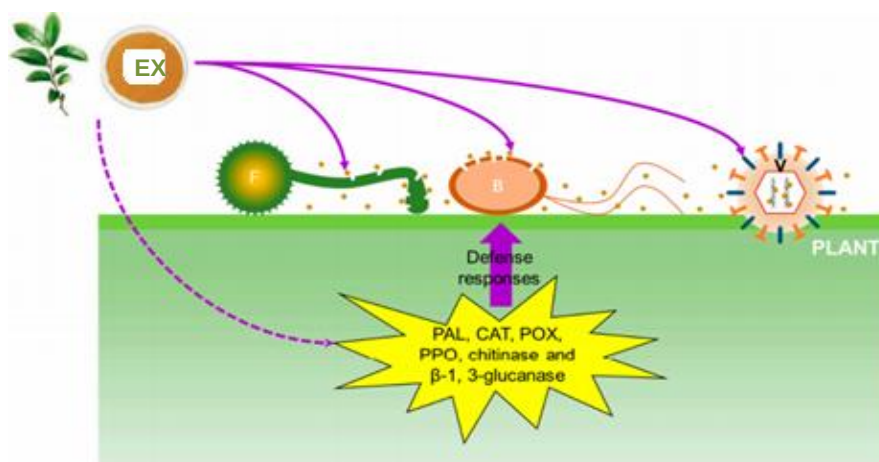
Figura 12 - Flavonoides, Estrutura química básica dos grupos mais encontrados.



Fonte: OLIVEIRA (2015)

Os flavonoides desempenham grande papel nas barreiras bioquímicas pré-formadas, essas barreiras atuam contra a invasão de fitopatógenos podendo ser sintetizados a partir da presença do patógeno ou de seus produtos, sendo induzidos por eliciadores ou inibidores alocados na superfície do microrganismo em interação com receptores presentes na planta por meio de fenômenos de reconhecimento. A figura 13 representa de forma esquemática o mecanismo antimicrobiano desse composto, onde os genes de alerta são ativados, resultando na síntese de novos compostos e no aumento da atividade enzimática, importantes para a defesa da planta, além de, formar barreiras estruturais e produzir compostos tóxicos, que resultam no atraso da infecção.

Figura 13. Representação esquemática dos mecanismos antimicrobianos, onde os pontos castanhos representam partículas de flavonoides. EX: extrato vegetal; F: fungos; B: bactérias; V: vírus; PAL: fenilalanina amônia-liase; CAT: catalase; POX: peroxidase; PPO: polifenoloxidase.



Fonte: Adaptado (YANG; ZHANG, 2019).

Essa característica o classifica com múltiplos efeitos biológicos, como inseticida, indutor de resistência e sinalizador. Nesse contexto, diversos estudos *in vitro* utilizando extratos vegetais ricos em flavonoides se destacam por apresentar um potencial como agentes de biocontrole ou biopreservador, além de ser uma alternativa como bioproduto promissor e sustentável. Dawidar et, al. (2015), constataram a atividade acaricida contra *Tetranychus urticae*, sendo a quercitina extraída da *Polygonum equisetiforme* o flavonóide mais tóxico quando aplicado contra larvas e adultos dessa praga agrícola. Outro inseticida natural, seguro para mamíferos, meio ambiente e aves, denominado Rotenona (isoflavona), foi extraído e identificado a partir dos extratos aquosos das folhas e sementes de Leguminosas do gênero *Derris* sp. (PATEL et al., 2015). Os flavonóides, isoglbratefrina, e glabratefrina, de *Tephrosia apollinea*, mostraram considerável atividade antifúngica contra *Alternaria alternata*, *Helminthosporium* sp., *Colletotrichum acutatum*, e *Pestalotiopsis* sp. sendo tóxico em pequenas concentrações (MARTINO, 2014). Além disso, os extratos de metanólicos e de acetato de etila das sementes de *Abrus precatorius* tiveram atividade de controle considerável contra *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Ralstonia solanacearum* e escabiose de *Streptomyces*. O trabalho resultou na identificação de dois flavonoides tephroapollin-F, e lanceolatin-A, como principais componentes ativos de ambos os extratos os quais foram responsáveis pelo efeito bactericida obtido (AMMAR, et, al. 2013)

2.6.1.3 Terpenos

Os metabólitos especiais terpenos originam-se principalmente da via do acetatomevalonato a partir de uma unidade de isopreno. São precursores de quatro classes hormonais de plantas, as citocininas (CKs), o ácido abscísico (ABA), as giberelinas (GAs) e os brassinoesteroides (BR) (BALDWINT, 2010). De acordo com Niero (2012) o maior grupo de metabólitos secundários presente no reino vegetal é o dos terpenoides, dos quais já foram isolados aproximadamente cerca de 30.000 terpenos, os quais podem ser classificados de acordo com a quantidade de resíduos de isopreno que sua estrutura possui (Tabela 2).

Tabela 2. Classificação dos terpenos baseada na quantidade de unidades de isopreno, com os respectivos exemplos.

Classificação	Bloco de isopreno	Quantidade de carbono	Exemplos
Hemiterpenos	1	5	Isopreno: monômero empregado na fabricação de borracha; Prenol: odor frutado e utilizado na fabricação de perfumes; Ácido isovalérico: aroma característico de chulé.
Monoterpenos	2	10	Limoneno: aroma de fruta cítrica; α-terpinol: aroma floral/pinho.
Sesquiterpenos	3	15	Farneseno: diesel da cana; produzido por meio de transformações genéticas em leveduras Bisabolol: essência de camomila.
Diterpenos	4	20	Esteviosídeo: Produção de adoçante natural a base de stevia; Sclareol: proveniente da sálvia – <i>Salvia sclarea</i> , aroma doce e balsâmico, usado como uma fragrância em cosméticos e perfumes e como aromatizante em alimentos.
Triterpenos	6	30	Esqualeno: encontrado no óleo do fígado de tubarão.
Tetraterpenos	8	40	Carotenoides: pigmento da cenoura; Zeaxantina: pigmento predominante em vegetais amarelos.
Politerpenos	>8	>40	Látex: borracha natural

Fonte: FELIPE, 2017

Dessas classes, monos e sesquiterpenos são os principais constituintes dos óleos essenciais e das resinas. Estima-se que existam quase 30.000 terpenos identificados, sendo 4.000 relativos a triterpenos (VERPOORTE, 2011). Os triterpenos têm despertado amplo interesse nas pesquisas devido a seu extenso espectro de atividade biológica, como antidiabética, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antitumoral, antiulcerogênica, anticariogênica, hepatoprotetora, neuroprotetora, antiparasítica, analgésica, anti-inflamatória e antioxidante (COLOMA *et al.*, 2011).

Os hemiterpenoides são o menor grupo dos terpenos, tendo o isopreno seu representante mais conhecido é um produto volátil isento nos tecidos fotossinteticamente ativos (NIINEMETS *et al.*, 2012). Os monoterpenoides são compostos por duas unidades de isopreno. Possui baixa massa molecular, por isso costumam ser voláteis, são constituintes das essências voláteis e óleos essenciais, agindo na atração de polinizadores. Hoje em dia são conhecidos mais de 1.000 monoterpenoides naturais e alguns têm sido aplicados na produção de especiarias, perfumes e fragrâncias e nas indústrias de alimentos e condimentos e na culinária, (MARTIN *et al.*, 2003). Os sesquiterpenos são hidrocarbonetos, compostos por três unidades isopreno, apresentando o oxigênio em sua composição, sendo chamados de hidrocarbonetos oxigenados. São encontrados em espécies vegetais e insetos como agentes de defesa e feromônios (LUCKER *et al.*, 2004).

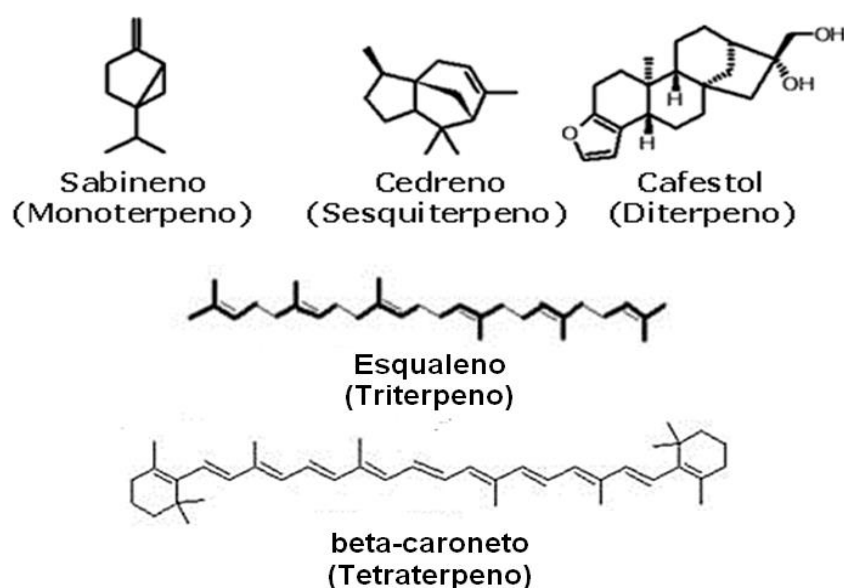
Os diterpenoides são importantes hormônios vegetais responsáveis pela expansão dos frutos de muitas espécies vegetais, pela germinação de sementes e pelo alongamento caulinar, incluem um amplo grupo de compostos não voláteis, tendo extensas atividades diferentes que incluem os hormônios, ácidos resínicos e agentes anticancerígenos (RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN & BORONAT, 2002).

Os terpenos de expressão constitutiva se compõem na estratégia de defesa prévia das plantas contra estresses bióticos e abióticos e se, por um lado, significam um gasto a mais de energia, por outro, devem ter um significado evolutivo compensador, favorecendo a seleção desses tipos de mutantes (figura 14). Entretanto, a defesa induzida, biologicamente, mais econômica, para que tenha valor adaptativo, deve ser extremamente eficiente, desde a rapidez da resposta e quantidade de metabólito produzido, até a eficiência da molécula de defesa. Com isto,

ganha em importância o estudo dos metabólitos secundários induzidos pelo sistema de defesa (MAIRESSE, 2005).

Os triterpenóides compõem as resinas, látex, ceras e cutículas das plantas. Dentre os triterpenos, estão uma enorme classe de substâncias, os esteróides. Outra classe importante são as saponinas. Nas plantas, as saponinas desempenham um papel relevante na defesa contra insetos e microorganismos (JOHNSON *et al.*, 2000). Os politerpenóides possuem mais de oito unidades de isopreno, com mais de 40 carbonos na sua estrutura, como polímeros localizados na borracha (McKAY *et al.*, 2003).

Figura 14 - Estrutura química de alguns terpenos.



Fonte: VIEGAS JR, 2004.

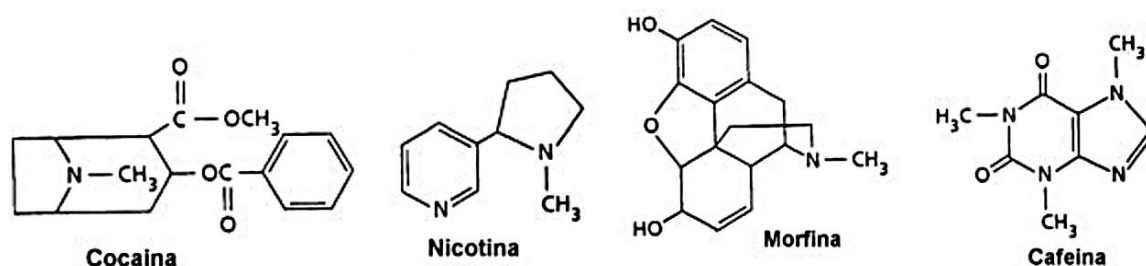
2.6.1.4 Alcaloides

Os alcaloides são substâncias de caráter alcalino que ocorrem naturalmente, sobretudo nas angiospermas e são originados, geralmente, a partir de aminoácidos. Basicamente são constituídos por um átomo de nitrogênio, oriundos dos aminoácidos e um anel heterocíclico. Podem ser classificados em alcaloides verdadeiros formados pelo átomo de nitrogênio pertencente ao anel heterocíclico, por protoalcaloides onde o não pertence ao anel heterocíclico e ou pseudoalcaloides são os compostos nitrogenados cujos precursores não são aminoácidos, mas sim outras substâncias como os terpenos e esteróides (HENRIQUES *et al.*, 2004).

Porém, segundo Altamar et al (2016), a produção dos alcaloides não deve ser entendida como sendo específica para a proteção das plantas. Isso porque, as plantas que não produzem teriam sido extintas. Desta forma há várias hipóteses com relação à função dos alcaloides nos vegetais: os alcaloides seriam produtos de detoxificação de substâncias nocivas geradas pelo metabolismo primário, funcionariam como uma reserva de nitrogênio e atuariam como hormônios de crescimento de forma a inibir a germinação devido ao seu poder citotóxico. Yang (2010) definiu alcalóide como substância orgânica, de origem natural, cíclica contendo um átomo de nitrogênio em um estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada dentro dos organismos vivos. Esta definição englobaria todos os compostos que foram considerados até o momento como alcaloides, mas excluiria compostos nitrogenados tais como: aminas simples, aminoácidos, peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos, nucleotídeos, porfirinas, vitaminas e compostos nitro e nitroso (PERES, 2017).

Alguns exemplos de alcaloides são apresentados na figura 15, onde pode-se notar que uma característica comum dos alcaloides é a presença de nitrogênio no anel carbônico. Essa estrutura indica que os alcaloides são derivados de aminoácidos. Desse modo, a cocaína é um alcalóide tropânico derivado de ornitina. A nicotina é um alcalóide pirrolidínico derivado de lisina. A morfina é um alcalóide isoquinolínico derivado de tirosina. A cafeína é um alcalóide purínico, a qual por sua vez é derivada de aminoácidos tais como glicina, ácido L- aspártico e L-glutamina (SIMÕES, 2010).

Figura 15 - Diferentes estruturas de alcaloides,



Fonte: LIU, 2004

Desde a antiguidade há referência ao uso dessa classe de compostos (VISOTTO *et al.*, 2015). Além disso, podem ser encontrados em todas as partes do vegetal, porém há locais onde ocorre acúmulo preferencial, como por exemplo, nos tecidos em crescimento ativo, células epidérmicas e hipodérmicas, bainhas vasculares e vasos lactíferos. Vale salientar que o local de estoque dos alcaloides é diferente

daquele onde é sintetizado, um exemplo disso, a nicotina formada nas raízes das plantas do tabaco, mas é transcolada para as folhas nas quais é armazenado (SIMÕES *et al.*, 2010).

A função dos alcaloides nas plantas ainda é controversa. O que se tem observado é que plantas ricas em alcaloides são evitadas por animais ou insetos em sua dieta, isto devido a sua toxicidade e/ou o seu gosto amargo. Entre alcaloides com ação farmacológica destacam-se, os alcaloides tropânicos como a atropina, a escopolamina, e a hiosciamina, todos com ação anticolinérgica. Nos alcaloides indólicos, citam-se substâncias como a reserpina (antihipertensivos), ioimbina (simpaticolítico), e fisostigmina (colinérgico). Já os alcaloides pirrolizidínicos têm ação de proteção da planta contra predadores, sendo substâncias muito tóxicas, agindo de maneira deletéria principalmente sobre hepatócitos (BETTIOL, 2009).

2.7 ÓLEOS ESSENCIAIS

Óleos essenciais (OEs), chamados óleos voláteis ou óleos etéreos, são secreções metabólicas naturais de plantas, cujo papel ainda não é totalmente compreendido pela ciência (RUTLEDGE, 2015). Alguns especialistas consideram que são verdadeiros hormônios vegetais, manifestações fluidas do sistema imunológico das plantas, no sentido de que contribuem para a remoção de pragas, atraindo, em vez disso, agentes polinizadores, que são alguns insetos e pássaros (PICKENS, 2011). Caracterizam-se por pequenas estruturas esféricas de cor clara são de fato, filamentos modificados, que se comportam como algumas glândulas secretoras. São responsáveis pela fragrância de plantas aromáticas, além de possuir propriedades medicinais curativas, como redução da febre, purificação do sangue e alívio da dor (ALMEIDA, 2017).

Óleos essenciais são produtos isolados de plantas ou órgãos através de um processo físico que possuem uma certa volatilidade (maior ou menor) e um odor agradável característico da fonte de onde provêm (VIZZOTTO *et al.*, 2010). São constituídos majoritariamente por terpenos ou seus derivados monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15). Tais substâncias constituem-se como um extenso grupo de moléculas orgânicas produzidas como metabólitos secundários - principalmente em plantas - para evitar injúrias promovidas por agentes externos (WINTER, 2012). Dessa

forma, os terpenos apresentam reconhecida atividade antimicrobiana (SANDHAR *et al.*, 2011). Além dos terpenos, uma variedade de fenois aromáticos, óxidos, éteres, álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas os quais determinam o aroma e o odor característico da planta doadora (BUTNARIU *et al.* 2018).

A característica mais importante dessas misturas, que também dá o valor econômico especial, é o cheiro específico. Esta é a base para seu uso em perfumaria, cosméticos e na indústria alimentícia. Muitos óleos essenciais têm qualidades terapêuticas especiais, algumas das quais são conhecidas e usadas desde a antiguidade (KLEMENT 2012). A combinação complexa de substâncias orgânicas que formam o óleo volátil dá a sua nota específica, que depende da espécie, do período de colheita, do clima, bem como da parte da planta da qual é extraído, (GOBBONETO; LOPES, 2007). Embora seu papel no organismo vegetal seja parcialmente conhecido, os óleos etéreos têm múltiplos usos. Existem mais de 3.000 óleos essenciais que são física e quimicamente caracterizados, cerca de 150 dos quais são fabricados em escala industrial (SILVA *et al.*, 2010).

2.8 ATIVIDADES BIOLÓGICA E MODOS DE AÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Óleos essenciais são conhecidos ao fato dos mesmos apresentarem múltiplos modos de ação, contra insetos dentre elas, a atividade repelente e anti-alimentar; inibição da respiração e muda; redução do crescimento e fecundidade; destruição da cutícula; e atividade na via octopamínica no sistema nervoso central (ROCKENBACH, 2008). E para microorganismos atuam na estrutura da parede celular do microorganismo, desnaturando e coagulando proteínas, essa ação ocorre, devido à alteração a permeabilidade da membrana citoplasmática devido ao seu caráter lipofílico, interrompendo os processos vitais da célula, como transporte de elétrons, translocação de proteínas, fosforilação e outras reações enzima-dependentes, e tais ações resultariam na perda do controle quimiosmótico da célula afetada, destruindo-a (GNATTA, 2016).

Os OEs apresentam baixa toxicidade a mamíferos e alta a insetos. O seu uso no controle de insetos-praga já é bem difundido, sendo aplicados de diferentes maneiras, e atuando nos insetos por ingestão, contato e fumigação (VARO *et al.*, 2017), podendo também exercer repelência, principalmente contra adultos

(ROCKENBACH, 2008). Vários monoterpenos contidos nos OEs são neurotóxicos para os insetos. Patel *et al.* (2015) descrevem vários tipos de receptores, incluindo os neuronais (GABA), que são os sítios de destino dos compostos encontrados nos OEs. A octopamina é uma amina biogênica multifuncional de origem natural que desempenha papel chave como neurotransmissora, neuromoduladora e neurohormônio no sistema de invertebrados (AYALA-ZAVALA *et al.*, 2011), de acordo com Coutinho *et al.* (2009) esse metabólito é um alvo da atividade dos óleos essenciais nos insetos, entre os modos de ação conhecidos são mencionados a inativação da mesma, provocando a paralisia do inseto. Além disso, caracterizam-se por ser bons penetrantes, capazes de aumentar sua própria biodisponibilidade, essa característica facilita a interrupção das bicamadas lipídicas das células favorecendo a inibição dos citocromos P450 em insetos, responsáveis para o metabolismo de fase I de xenobióticos, incluindo inseticidas (CHEN *et al.*, 2011).

O uso de óleos essenciais como fumigantes no controle de pragas é muito promissor, já demonstrado com muitos exemplos de sucesso com várias plantas (VOLP *et al.*, 2008). Ayala-Zavala *et al.* (2011) observaram nos OEs de *Hymenaea courbaril* que os monoterpenos limoneno e cineole proporcionaram altos índices de mortalidades 94,9% e 58,3% em *Tribolium castaneum* H. (Tenebrionidae), bem como Chen *et al.* (2011) que constataram a susceptibilidade das pragas de produtos armazenados *Nasutitermes corniger* (Termitidae) e *Tribolium castaneum* (Tenebrionidae) ao óleo essencial de *Illicium difengpi* por via tópica. O uso de óleos essenciais como agentes fumigante também foi abordado por Volp *et al.* (2008), onde observaram que o óleo de *Cupressus sempervirens* L. apresentou efeito de 100% de mortalidade em *S. zeamais* na concentração de 1,56 µg/ml após 96 horas, e o óleo de *Eucalyptus saligna* Smith mostrou o mesmo efeito com 72 horas. Jiménez *et al.* (2009) submeteram adultos de *N. corniger* ao óleo de *Baccharis salicifolia* Pers estimaram CL₅₀ de 0,83 mg/ml, em 24 horas, e também efeito repelente. Pietta *et al.* (2000) afirmaram que limoneno e cineole foram mais eficientes, quando aplicados em grãos de trigo em teste de contato, do que em papel filtro, destacando-se o cineole no controle de *T. castaneum* e *Rhyzopertha dominica* (Fabri).

Diante disso, é possível constatar que a atividade inseticida dos óleos essenciais é devida a vários mecanismos que afetam múltiplos alvos, alterando de maneira eficaz a atividade celular e os processos biológicos de insetos. Muitos óleos

essenciais têm propriedades inseticidas e antimicrobianas contendo vasto espectro de atividade contra diferentes tipos de organismos.

2.9 OS INSETICIDAS DE ORIGEM VEGETAL NO CONTROLE BIOLÓGICO

As Angiospermas têm normalmente pelo menos um tipo de composto secundário em concentrações suficientes, para desenvolver a sua própria defesa química contra o ataque de herbívoros e microrganismos, garantindo sua sobrevivência, essas substâncias podem estar presentes em determinadas famílias botânicas e em outras não (SANTANA, 2012). Das interações entre plantas e animais mais comuns na natureza, a interação inseto-planta é a que mais chama a atenção. Normalmente esta relação beneficiada pelo processo co-evolutivo decorre de uma série de alterações dinâmicas recíprocas em ambos os organismos (CARVALHO, 2013).

Ao longo da evolução, as plantas ampliaram suas defesas químicas, sintetizando metabólitos secundários com diversas propriedades, tais funções podem ser utilizadas como estratégia ao manejo de insetos, atuando na repelência, inibição de oviposição, alimentação, além de alterações no sistema hormonal, causando distúrbios no desenvolvimento, deformações, infertilidade e mortalidade nas diversas fases dos insetos caracterizando-se como inseticidas botânicos (PINO *et al.*, 2013),

A utilização de inseticidas botânicos é uma técnica utilizada há séculos, com mais de 2000 espécies de plantas conhecidas por suas propriedades inseticidas. Em todas as regiões do mundo, a utilização de plantas com fins medicinais, assim como inseticidas na agricultura, são hábitos comuns na cultura popular (ROEL, 2001; GALLO *et al.*, 2002; VIEGAS JÚNIOR, 2003). São utilizadas várias partes da planta, normalmente moída até ser reduzido a pó, ou seus produtos derivados obtidos por extração aquosa ou com solventes orgânicos, tais como álcool, éter, acetona, clorofórmio, etc. ou por destilação (WIESBROOK, 2004)

Diversos estudos apontam que têm efeitos profundos no comportamento alimentar, de oviposição e no crescimento dos insetos fitófagos (AGUIAR-MENEZES, 2015). Em geral considera-se que inseticidas atuem sobre os insetos do mesmo modo como atuam sobre os animais superiores, porém os insetos possuem um organismo menos complexo que os mamíferos; não possuem pulmões, fígado e sistema

cardiovascular; possuem apenas um tipo de nervo bioquímico (ZANDI-SOHANI, 2012).

A classificação dos inseticidas de acordo com os sintomas produzidos nos insetos é difícil de ser obtida. A natureza do inseto, o modo de penetração e a quantidade de inseticida consumido pelo organismo, altera bastante a resposta da ação inseticida. De um modo geral pode se estabelecer que os inseticidas orgânicos sintéticos atuam sobre o sistema nervoso do inseto e os sintomas apresentados obedecem a quatro estágios: excitação, convulsão, paralisia e morte. A maioria dos inseticidas atuam sobre o sistema nervoso. Tal fato deve-se a uma sensibilidade especial, pois mesmo com o rompimento temporário do sistema nervoso, os danos são irreversíveis (SALEM, 2018).

Algumas substâncias ou compostos podem atuar de várias formas, especialmente quando é um complexo que é responsável pela ação sobre o inseto (WIENS, 2015). Recentes estudos têm demonstrado que os metabólicos secundários podem agir como inibidores da alimentação de insetos ou de quitina ou perturbadores do crescimento, desenvolvimento, reprodução, diapausa e comportamento (STEENBERGEN, 2018).

No geral, podemos distinguir três tipos que descrevem o modo de ação de uma substância de origem botânica sobre os insetos (KATHRINA & ANTONIO, 2004): **Ação tóxica, repelente e/ou anti-alimentar:** causa a morte do inseto por intoxicação, mas, às vezes, são repelentes (fazem com que os insetos se afastem da planta, prevenindo a alimentação ou oviposição na mesma) ou agem como antialimentar (inibem o inseto a iniciar a alimentação). A ação tóxica dos extratos botânicos provém da ação de seus ingredientes ativos no sistema nervoso central dos insetos, interferindo na transmissão (sináptica ou axônica) normal dos impulsos nervosos, quando são denominados de neurotóxicos. **Ação sobre órgãos ou moléculas-alvo:** podem agir no sistema neuroendócrino, interferindo nos processos normais de troca de tegumento (ecdise) e/ou metamorfose, sendo denominados de reguladores de crescimento, ou podem interferir no metabolismo respiratório das células, interferindo na síntese de ATP. **Ação por contato ou ingestão:** As substâncias que atuam por contato, caracterizam-se pelo modo de ação de um inseticida que age e é absorvido pela pele (tegumento) do inseto, afetam o sistema nervoso central, alterando toda a

superfície do corpo do inseto ou pelas vias respiratórias, causando rapidamente a morte do mesmo. As substâncias que atuam por ingestão, penetram no organismo por via oral, afetam o sistema de digestão, o sistema de biosíntese dos hormônios da ecdise ou a formação da camada de quitina da cutícula do inseto. Esta forma de atuar é mais específica porque está restringida a insetos herbívoros e, portanto, não apresenta toxicidade aos seres humanos.

Dentre as vantagens da aplicação de inseticidas botânicos, destaca-se, o fato de ter (BUSS, 2002; 2004; WIESBROOK, 2004): degradação rápida_ possuem baixa resistência e reduzido risco para organismos benéficos não alvo, e são rapidamente degradados pela luz solar, ar, além disso, possuem baixo ou nenhum poder residual; ação rápida_ os insetos podem parar de se alimentar imediatamente após a aplicação do inseticida botânico, todavia a sua morte pode ocorrer em horas ou dias; custo e a disponibilidade_ podem ser fabricados na propriedade rural a baixo custo. Os produtos disponíveis no mercado são poucos disponíveis devido à carência de fornecedores comerciais. A utilização de extratos de plantas como inseticidas traz vantagens, quando comparada ao uso de produtos sintéticos. Os extratos podem ser produzidos facilmente pelos agricultores, para serem aplicados em pequenas áreas de cultivo, diminuindo os custos de produção, tornando seu uso adequado à agricultura sustentável e contribuindo para o aprimoramento da qualidade de vida das populações envolvidas (YUAN, 2015).

De um modo geral, podem ser reconhecidas duas abordagens quanto à utilização de plantas/substâncias inseticidas. Na primeira, a atividade é reconhecida, os compostos são isolados, identificados e, posteriormente, sintetizados em larga escala. Nesse processo, há a possibilidade de alterações químicas em grupos funcionais responsáveis pela atividade, de forma a acentuar os efeitos desejados ou diminuir a toxicidade, quando houver. No segundo caso, uma vez identificada a atividade inseticida em alguma espécie vegetal, sua utilização se dá na forma de extrato vegetal bruto (GEORGES, 2017).

2.10 LEGUMINOSAE

Leguminosae possui distribuição Pantropical, ou seja, está distribuída em todos os continentes, exceto da Antártica, circunscreve 727 gêneros e cerca de 19.325

espécies (LPWG 2017), dos quais 222 e 2.835, respectivamente, ocorrem no Brasil, onde a família figura como a de maior riqueza entre as Angiospermas (BFG 2015). Tradicionalmente, esta família compreendia as subfamílias Caesalpinioideae DC. Mimosoideae DC. e Papilionoideae L. (LPWG 2013), no entanto, sua circunscrição foi reformulada a partir dos estudos do LPWG (2017) e passou a incluir seis subfamílias: Caesalpinioideae, incluindo Mimosoideae (148 espécies e 4.400 gêneros), Cercidoideae (12 e 335); Detarioideae (84 e 760), Dialioideae (17 e 85); Duparquetioideae com apenas um gênero e uma espécie (*Duparquetia orchidacea* Baill.) e Papilionoideae (503 e 14.000), sendo as quatro primeiras e a última com distribuição Pantropical, e a quinta exclusiva da África (SOUSA, 2017) .

As Leguminosae são reconhecidas por possuir, frutos predominantemente do tipo legume, gineceu monômero, folhas alternas, compostas por um a muitos folíolos e flores 5-meras, bissexuais com androceu diplostêmones, uma extraordinária diversidade de hábitos e aspectos de crescimentos, padrões de simetria ou assimetria florais, diversidade de compostos químicos e capacidade de colonizar distintos, incluindo hostis ambientes, dado a sua eficiente capacidade de associação com bactérias fixadoras de nitrogênio ou fungos micorrízicos, fatores que em conjunto possibilitou sua excelente irradiação adaptativa e lhe confere o status de terceira maior família de Angiospermas (Lewis *et al.* 2005; LPWG 2013, 2017).

Dentre as famílias encontradas na Caatinga, Leguminosae 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 (QUEIROZ, 2009). Há muitas de suas espécies úteis e inúmeras delas são cultivadas desde a antiguidade devida 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).

Entre 500.000 espécies de plantas superiores na terra, apenas 6% estão em uso para atividades biológicas. A família Leguminosae é a segunda em importância em todo o mundo como alimento (GHAURI, 2018). Destaca-se por conter espécies

botanicamente importantes com diversas propriedades medicinais (MENSOR *et al.*, 2001). As espécies dessa família são amplamente submeteidas a triagens para atividade biológica, Izaguirre *et al.* (2003), associam essa característica a presença de metabólitos secundários do tipo compostos fenólicos, capazes de contribuir para ação antifúngica e antimicrobiana. Assim como, atuar como antioxidante, reduzindo os radicais livres no corpo (PERREIRA, 2019). Alcaloides, terpenoides e esteroides são exemplos de outras classes de substâncias na qual ocorrem em muitos exemplares da família, corroborando a ideia de que as leguminosas apresentam diversas propriedades funcionais bioativas (KHALIGHI-SIGAROODI *et al.* 2012). Diversos gêneros dessa família se destacam como inseticidas botânicos partir do uso de extratos e óleos essenciais, dentre as atividades destaca-se “*Antifeedants*”, antioviposição, repelente, atividade reguladora do crescimento e mortalidade (PIRES, 2017).

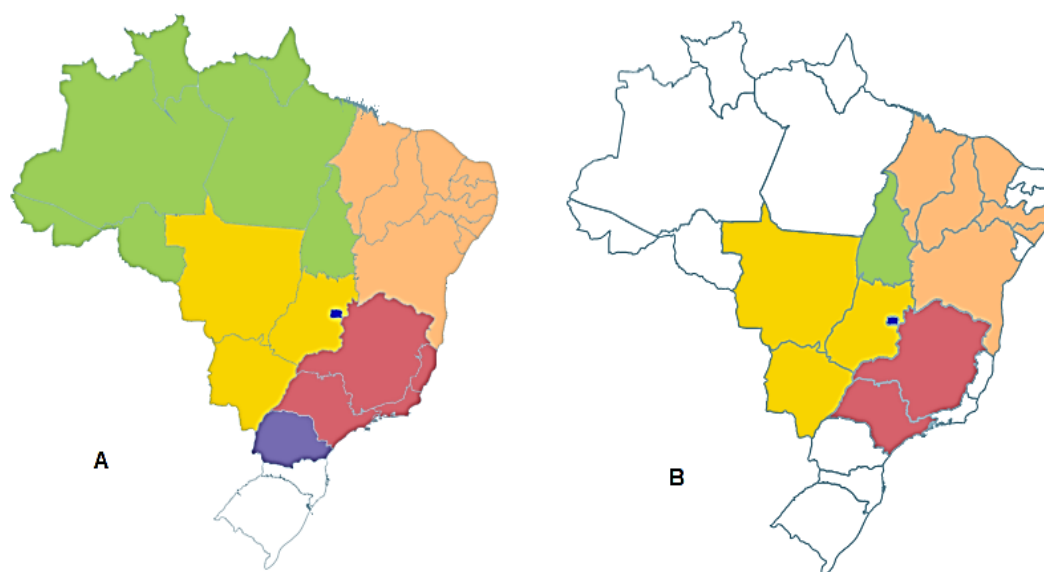
2.10.1 *Hymenaea courbaril* L.

Hymenaea é predominantemente neotropical, com distribuição na costa leste da África, onde ocorre apenas uma espécie (Lee & Langenheim 1975; Mackinder 2005). Atualmente, reúne 17 espécies (Mackinder 2005; Souza *et al.*, 2014; Ribeiro *et al.*, 2015), sendo 16 citadas para o Brasil, onde 11 são endêmicas, ocorrendo em áreas de Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (Flora do Brasil 2020). Além de importantes ecologicamente, como polinizadores (Gibbs *et al.*, 1999) e dispersores (Asquith *et al.*, 1999), suas espécies há muito são utilizadas por populações humanas que exploram sua madeira, resina, casca, folhas e frutos (Langenheim 1969; Lee & Langenheim 1975; Lewis *et al.*, 2005; Aquino *et al.* 2007).

Apresenta ampla distribuição geográfica, ocorrendo em diversos domínios fitogeográficos, Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal, Cerrado (lato sensu), Floresta Ciliar ou Galeria, Floresta de Terra Firme, Floresta Ombrófila (Floresta Pluvial) e Restingas (RIBEIRO, 2015). Os táxons de *Hymenaea* podem ser encontrados desde o sul do México até o Centro-Oeste do Brasil, (Figura 16), ocorrendo principalmente na Floresta Amazônica e Cerrado (LEE; LANGENHEIM 1975). Queiroz (2009) cita a ocorrência desta variedade também na Caatinga, no Nordeste do Brasil. Porém, Pestana (2010) enfatiza que essa variedade é mais frequente em ecossistemas mais secos tanto norte quanto ao Sul da Bacia

Amazônica. *Hymenaea courbaril* possui grande valor econômico, pois fornece muitos produtos de grande importância para a utilização humana. Esta espécie possui um amplo histórico de utilização pelos indígenas da floresta tropical e é popularmente conhecido como jatobá (LORENZI, 2002), jatobá de porco (LORENZI; MATOS, 2006) e árvore-copal-do-Brasil (PINTO; MADURO, 2003). Na figura 16, observa-se em detalhes a morfologia dessa espécie bem como, hábito (árvore), folhas compostas, inflorescência em panículas terminais e frutos em forma de vagens indeiscentes, duros e pardo-escuros (LORENZI, 2006).

Figura 16 - (A) Ocorrência natural de *Hymenaea courbaril* L. (B) suas variedades no Brasil.



Fonte: LIMA, 2015

A madeira é utilizada para construções por ser de alta durabilidade (SOUSA, 2016), assim como as sementes utilizadas para o artesanato (DA SILVA, 2017). Há também um potencial uso da polpa de frutas na indústria alimentícia, pois o mesmo possui endocarpo à base de farinha, podendo ser usada na formulação de lanches extrusados para alcançar sabor palatável na comida (CARDOSO, 2017). Além disso, é utilizado para enriquecer alimentos com fibras, tendo em vista os altos níveis de fibras dietéticas totais (LIMA, 2010). Dentro dos componentes funcionais importantes presentes na polpa do jatobá estão às fibras. Eles são o principal componente da polpa, a parte comestível do fruto (SANO, 2013). Essas fibras são importantes para o organismo humano estimular o crescimento da flora intestinal. Além de serem ricas em vitamina C, cerca de 120mg em 100g da polpa (GRISI, 2008). A resistência bacteriana aos antibióticos é atualmente um dos problemas de saúde pública mais

relevante a nível global, dado que apresenta consequências clínicas e econômicas preocupantes, estando associada ao uso inadequado de antibióticos (LOUREIRO, *et al.*, 2016). A polpa dos frutos do jatobá se mostra como potencial para ser aplicado no controle da resistência microbiana, pois de acordo com Tamayo *et al.* (2011), a mesma apresentou atividade inibitória contra a bactéria *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, em concentrações baixas 0,05mg/ml sendo comparadas a concentrações do controle padrão utilizado. Orsi *et al.* (2012) mostraram que o extrato metanólico da casca da árvore de jatobá e polpa da fruta aliviar os sintomas e ter um efeito de cura em úlceras, dor gastrointestinal e diarreia. Isto é devido à atividade antioxidante dos compostos presentes em ambos, como taninos e flavonóides.

Com base nos resultados apresentados por Sousa *et al.* (2013), α -tocoferol, β -sitosterol, ácido oléico e linoléico são as substâncias bioativas mais abundantes encontradas em óleos fixos extraídos da polpa e das sementes de jatobá, as mesmas apresentaram atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram-positivas. Fougère Danezan *et al.* (2010) afirmam que o óleo essencial das cascas e folhas de *H. courbaril*, composto por taninos, materiais resinosos e pécnicos, amido e açúcares, apresenta indicação como medicinal, sendo utilizados no tratamento de diarreias, cólicas intestinais, cistite, tosse, bronquite e asma. Além disso, vários estudos comprovam as atividades, como demonstrado na tabela 3 o que valida sua longa história de seu uso medicinal. *H. courbaril* tem sido usado não só nas indústrias madeireira e alimentícia, mas também na indústria farmacêutica, cosmética e defensivo agrícola.

Segundo Gorchoy *et al.* (2014) o extrato aquoso da polpa do jatobá é eficaz para o alívio dos sintomas de inflamação e dor, pois o mesmo atua na inibição das atividades das enzimas de peroxidação dos lipídios ciclooxigenase (COX), as duas enzimas, COX-1 e COX-2, catalisam um passo limitante na síntese de prostaglandina, que está relacionado à inflamação.

Existe um potencial para o uso do jatobá como defensivo agrícola e larvívoro. Estudos revelam que as resinas foliares extraídas do tronco e os extratos da casca são ricos em hidrocarbonetos sesquiterpênicos e em alguns casos, os sesquiterpenóides oxigenados, sabe-se que esses terpenos apresentam várias atividades biológicas, como proteção contra infecções e ataques de insetos (AGAREZ *et al.*, 1997).

Mackinder *et al.* (2005), avaliaram as frações bioativas do extrato da casca do jatobá, e as substâncias com atividade antimicrobiana (concentração inibitória mínima = CMI; concentração letal mínima = CLM) sobre bactérias fitopatogênicas de importância comercial, como *Acidovorax avenae* e *Pseudomonas cattleyae* e concluíram que pelo teste de difusão em ágar modificado houve inibição no crescimento dos isolados de *A. avenae* (CIM = CLM = 0,28% v/v) e *P. cattleyae* (CIM = 0,28% v/v; CLM = 0,56% v/v), sendo capaz de inviabilizá-las em 8 horas.

Tabela 3. Atividades biológicas realizadas com *Hymenaea courbaril* L.

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

As vagens de jatobá possuem sesquiterpenos com atividade larvicida efetiva (AGUIAR *et al.*, 2010). Estas são indicações sobre o potencial tanto das vagens quanto da polpa a serem usadas na indústria para controlar formigas cortadeiras, lagartas e patógenos relacionados a culturas agrícolas. No entanto, essas folhas contêm terpenos, taninos e glicosídeos, o que permite seu uso como fungicida e repelente contra algumas pragas agrícolas, como formigas cortadeiras e lagartas (SCHWARTZ, 2018).

Aguiar *et al.* (2010) testaram o óleo essencial de frutos verdes contra larvas de *Aedes aegypti* e apresentaram valores de concentração letal CL₅₀ de 28,4 ± 0,3 µg/mL representando uma contribuição para o controle do mosquito e foram identificados e isolados o ácido diterpenos zanzibarico e o sesquiterpeno cariolano-1,9β-diol. Stubblebine, et al (1977) testaram a resina foliar de *Hymenaea courbaril* como defesa contra a herbivoria da lagarta da beterraba (*Spodoptera exigua* Hübn), constataram que as mesmas atuam como toxinas, inibidores da digestão impedindo a ação de

herbívoros, os resultados sugerem que essa atividade se deve as propriedades tóxicas encontradas na resina.

Figura 17. Aspectos gerais de *Hymenaea courbaril* L. var. *courbaril* (A) Hábito da planta (árvore), (B) Folhas alternas, compostas e coriáceas, com dois folíolos (C) Flores brancas, hermafroditas e pentâmeras. (D) Frutos verdes tipo vagem lenhosa com resina e (E) Fruto maduro com sementes.

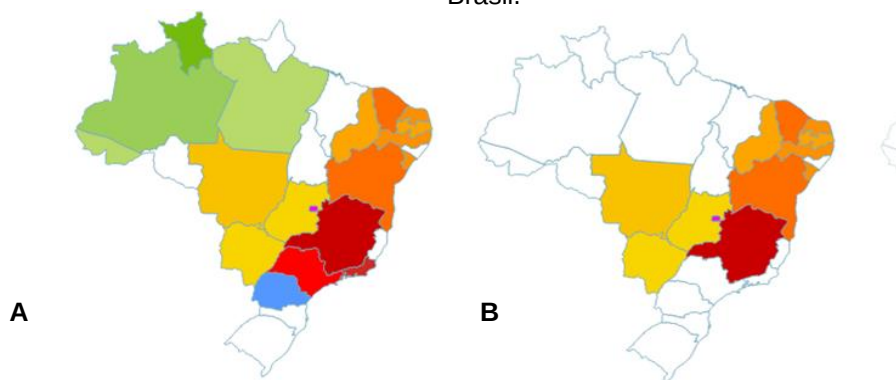


Fonte: Compilação do autor

2.10.2 *Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan

É popularmente conhecida como angico, angico vermelho, angico branco e curupay, ocorrem no Norte da Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Peru (PIETTA, 2000). Possui a maior abrangência geográfica do gênero, ocorrendo desde o sul da Bolívia até o norte da Argentina (MORIM, 2016). No Brasil (Figura 18) sua distribuição geográfica encontra-se no Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul, estando presente nos domínios fitogeográficos Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica. É uma árvore comumente utilizada na arborização de ambientes, construção, energia, fabricação de móveis e artefatos (CARVALHO, 2002; MATTOS; SEITZ, 2005; MONTEIRO *et al.*, 2006), e também muito empregada na confecção de tacos, ripas, lenha e carvão de boa qualidade (SILVA, 2014).

Figura 18 - (A) Ocorrência natural de *Anadenanthera colubrina* no Brasil. (B) suas variedades no Brasil.

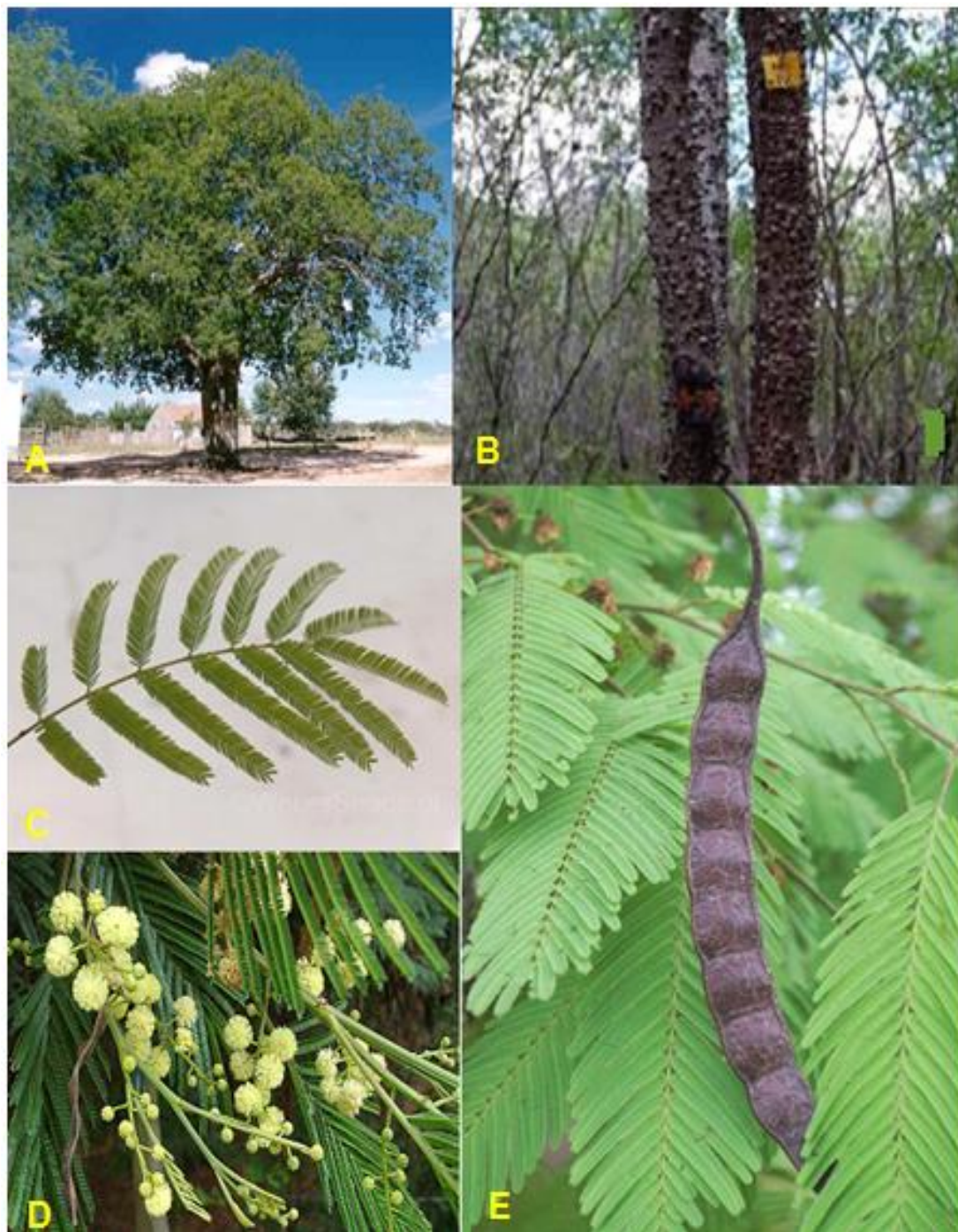


Fonte: MORIM, 2016.

Possui caule reto ou tortuoso com até 13 m de comprimento, casca interna fibrosa, marrom-clara e levemente avermelhada, folhas compostas com folíolo linear, flores diminutas, de coloração branca arredondada e estão agrupadas em inflorescências terminais globosas, exalando leve aroma quando abertas, frutos alongados do tipo vagem podendo chegar até 32 cm de comprimento na cor marrom escura quando maduros (Figura 19) (LORENZI, 2006). É considerada uma planta de potencial terapêutico, mas ainda pouco explorada do ponto de vista farmacológico, reconhecida pela medicina popular e muito empregada no tratamento de gripe, asma, bronquite, tosse, anemia, difteria, gastrite e distúrbios inflamatórios (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009). Estudos recentes demonstraram que *A. colubrina* possui promissoras propriedades terapêuticas, como antifúngicos, antisséptico, cicatrizante

anti-inflamatórias e antinociceptivas, sendo os dois últimos confirmados em modelo animal (WEBER, *et al.*, 2011; SILVA, 2019).

Figura 19. Aspectos gerais de *A. colubrina*; (A) árvore semicaducifolia, com copa bastante ramificada, (B) Casca levemente avermelhada, (C) Folhas compostas, (D) Flores agrupadas em inflorescências terminais globosas, (E) Frutos alongados do tipo vagem.



Fonte: Compilação do autor

O extrato da *A.colubrina* é caracterizado pela presença de componentes bioativos, representados principalmente por compostos fenólicos (ARAÚJO *et al.*, 2017; MOTA *et al.*, 2017). Esses compostos possuem comprovada atividade antimicrobiana contra diversas espécies de bactérias e fungos (SILVA *et al.*, 2013; ARAÚJO *et al.*, 2017), atividade antioxidante (ARAÚJO, *et al.*, 2017), expressiva atividade anticandida e antibiofilme (LIMA, 2018), e atividade inseticida (GUTIERREZ-LUGO *et al.*, 2004). De acordo com Suchal *et al.*, 2016 o angico também demonstra um potencial de ação antitumoral, através da redução de espécies reativas de oxigênio (ROS), além disso se investigou o efeito citostático inespecífico do extrato da casca de *A. colubrina* sobre diversas linhagens de células tumorais (LIMA *et al.*, 2014).

3 RESULTADOS

ARTIGO 1 - ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ORGANIC EXTRACTS AND SEMI PURIFIED OF LEGUMINOSAE AGAINST PHYTOPATHOGENIC BACTERIA

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

Qualis: B1

Normas de submissão: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2672.2002.00001.x>

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ORGANIC EXTRACTS AND SEMI PURIFIED OF LEGUMINOSAE AGAINST PHYTOPATHOGENIC BACTERIA

Paula Fernanda Figueiredo das Mercês^a, Cibele Maria Alves da Silva Bessa^a, Carolina Barbosa Malafaia^b, Ana Paula Sant'Anna da Silva^a, Daniel Rodrigo de Araújo Cavalcanti^a, Claudeana Sousa da Conceição^c, Elineide Barbosa de Souza^c, Vera Lúcia de Menezes Lima^a, 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.

^bCentro 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: pauladasmerces@gmail.com (PFF, Mercês), Avenida Av. Professor Luiz Freire, 01, Cidade Universitária, 50740-540, Recife, Pernambuco, Brasil. Tel/fax: +55 (081) 21268541.

ABSTRACT

Aims

Evaluate the antibacterial activity of the organic extracts and semi-purified of leaves of *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* and *Hymenaea courbaril* var. *courbaril*, collected in the Catimbau Valley National Park.

Methods and Results

Extracts from leaf 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 standards of terpenes, flavonoids, 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 concentration (MBC). It was used six pathogenic phytopathogens: *Acidovorax citrulli*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *X. campestris* pv. *malvacearum* and *X. campestris* pv. *viticola* economically important phytopathogens. All organic extracts were active against all evaluated bacteria. The EA extract showed MIC values ranging from 0.78 - 3.12 mg/ mL⁻¹ and MBC ranging from 1.56 to 6.25 mg/mL⁻¹ for *A. colubrina* var. *cebil*, and for *H. courbaril* var. *courbaril* the same organic extract presented MIC values (0.78 - 3.12 mg/mL⁻¹) and MBC (0.78 to 6.25 mg/mL⁻¹) compared to other extracts for the bacteria tested. EA extracts were followed for HPLC analysis because of the higher content of phenolic compounds visualized. The semi-purified fractions showed MIC and MBC 0.5 mg/mL⁻¹ for *X. campestris* pv. *campestris* and *A. citrulli* and MIC and MBC 0.5 mg/mL⁻¹ for *X. campestris* pv. *campestris*, and *X. campestris* pv. *malvacearum* thus allowing antimicrobial activity and can be used as a natural bactericide.

Conclusion

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

Keywords: *Anadenanthera colubrina*; *Hymenaea courbaril*; Phenolic compounds; Flavonoid.

1. INTRODUCTION

Population growth imposes the need for increased food production, which depends on good cropping practices and pest control, pre and post harvest. The pests cause significant damages to the crops, requiring the use of control agents, mostly chemically synthesized (LIMA, 2018). Most conventional pesticides are considered highly toxic including damage to environmental and human components. Due to the negative impacts of these substances, strategies and control alternatives associated to biotechnology are employed, among them the extraction, isolation and application of bioactive compounds, derived from secondary plant metabolites, stands out as promising with the potential to serve a biocontrol (SUBBANNA et al., 2019).

Brazil has a wide biodiversity, covering approximately 22% of the world's species in its territory, where most native plants remain scientifically unknown in terms of chemical composition and biological activity (LAZARINI et al., 2018). Phytochemical screening is fundamental for the characterization of its properties, as well as the knowledge of its potential (ADAM, et al., 2018).

Among these ecosystems, the Caatinga domain, located in the northeast of Brazil marked by a long drought season, has been widely used by the population due to its medicinal properties and insecticides (PIRES, 2017). This vegetation is seen as a source of bioactive molecules. In addition, the bioactive characteristics of the plants are related to seasonality, water availability, ultraviolet radiation, temperature and altitude, and are fundamental for the synthesis of secondary metabolites responsible for plant bioactivity (FERNANDES et al., 2018).

Many species are known and used in folk medicine and for manufacturing handicraft products, including *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschul

and *Hymenaea. courbaril* var. *courbaril* L. both belonging to the family Leguminosae classified as dominant in this domain, however little is known about its antifitopathogenic potentials.

Therefore, the objective of this study was to investigate the efficacy of different organic extracts of *A. colubrina* var. *cebil* and *H. courbaril* var. *courbaril* against phytopathogenic bacteria, in addition to identifying 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* and *Hymenaea courbaril* var. *courbaril* free from diseases, were collected at Catimbau National Park, Northeastern of Brazil. Two voucher specimens were 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

Leaves of both species 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. Yield was calculated using the formula: Extract yield= (% extract x total dry mass of leaves)/100.

2.3 Phytochemical screening

The organic extracts were evaluated by the presence of important secondary metabolites, the analyzes were performed by Thin Layer Chromatography using a silica gel plate (Merck), using several mobile phases and specific standards, among them alkaloids, coumarins, anthracene derivatives, cinnamic acid derivatives, flavonoids, hydrolysable tannins, catechin tannins, triterpenoids and reducing sugars, as described in Table 1.

Table. 1 **Chromatographic and revealing systems used for the phytochemical screening of the leaves extracts of *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* and *Hymenaea. courbaril* var. *courbaril*.**

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 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 Macheboeuf (Munier and Macheboeuf 1951).

2.4 Test microorganisms

The organic extracts were tested against six bacteria phytopatogens, *Acidovorax citrulli* (1.12), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (31), *Ralstonia solanacearum* (CM10R22), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (53), *X. campestris* pv. *malvacearum* (11.2.1) and *X. campestris* pv. *viticola* (137) were obtained by the Culture Collection of the Phytobacteriology Laboratory of the Agronomic Department of the Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Brazil. Were grown in nutrient yeast dextrose agar 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.

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 extract and 0.5 mg/mL for semi purified. Finally, 15 µL of the inoculum ($OD_{600} = 0.15 \pm 0.05$) was placed in the microplates and then incubated at 30°C for 24h. After incubate period 10µL of the solution from each inhibited well was collected and transferred to NYD-agar plates and

re-incubated as described above to check for bacterial growth. 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. Column chromatography

Preliminary tests antibacterial Were Performed for each extract, the best was selected for further investigations. With this, the fractionation was Performed by Sephadex LH-20 column adsorption chromatography, consisting of a vertical glass column of 60cm in diameter and 2.5cm (Strumeyer and Malin, 1975). The process was carried out at room temperature under atmospheric pressure, 1.5g of the portion of the active extract of Both species, previously solubilized in methanol, Were iseridos and eluted with the mobile phase (100% methanol). Seventy fractions (7 ml each) were obtained which were analyzed by thin layer chromatography (TLC), grouped into six fractions Were end (Fr-1, Fr.8, Fr.9, Fr.13, Fr.15 , Fr.27). The semi purified Were tested as in 2.5.

2.7. Analysis by high performance liquid chromatography (HPLC)

EAAcc and EAHcc extracts were analysed Column chromatography 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 were water (A) e acetonitrila (B) (LiChrosolv®,Merck) and temperature was 30°C for 30min.

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).

The extracts were compared to commercial standards following a linear gradient from 92% (A) to 65% (A), between 15 min, with flow of 2.4 mL / min and working chromatogram of 256 nm. The compounds identified had retention time and ultraviolet (UV), spectrum which were 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.

3. RESULTS

After extraction, 21.97% yield for Acc and 27.18% for Hcc of the initial dry mass were obtained in total. The methanolic and chloroform extracts had the highest and lowest yields, respectively, for both species (Table 2). The organic extracts were evaluated for the presence of important secondary metabolites, using various mobile phases and specific standards. Phytochemical screening (Table 3) showed that all extracts tested contained flavonoids and reducing sugars. Catechin tannins are absent only in CF extracts. The triterpenes were detected in extracts CHX, CF and EA for both species. The presence of coumarins was only detected in the CHX extract for Angico and Jatobá.

Table. 2 Production organic extracts of *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Acc) and *Hymenaea courbaril* var. *courbaril* (Hcc).

Organic extracts	Production (%)	
	Acc	Hcc
Cyclohexane	4.57	5.62
Chloroform	1.46	4.7
Ethyl Acetate	7.14	7.6
Methanol	8.80	9.26

Table 3: Phytochemical screening of *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Acc) and *Hymenaea. courbaril* var. *courbaril* (Hcc) extracts harvest at Catimbau Nacional Park.

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

The antimicrobial activity of the organic extracts of leaves of Acc and Hcc is shown in Table 4. In general, all leaf extracts exhibited broad spectrum antimicrobial activity, since they inhibited all tested bacteria. Cyclohexane extracts (CHX – *A.citrulli* and Hcc) showed significant MIC values ranging from 1.56 to 3.12 mg/mL⁻¹ and MBC 1.56 to 6.25 mg/mL⁻¹ for the *Xanthomonas* group. The CHX Acc extract was shown to be effective against all species. Among the bacteria tested, *A.citrulli* and *R. solanacearum* showed equal MBC values for chloroform (CF) extracts, with *X. campestris* pv. *campestris* and *X. campestris* pv. *malvacearum* being the best results for the extracts of *H. courbaril*. For the extracts of ethyl acetate (EA - Acc and Hcc), all bacteria showed sensitivity, with lower values in relation to the MIC (0.78 - 3.12 mg/mL⁻¹) and MBC (1.56 to 3.12 mg/mL⁻¹) and *X. campestris* pv. *campestris* the most significant mortality values. There were no significant differences between the results for methanolic extracts (MET - Acc and Hcc), mainly for *A. citrulli*, *R. solanacearum* and *X. campestris campestris*. All the phytopathogens tested showed sensitivity to the extracts of both species. DMSO did not affect bacterial growth at the highest concentration tested.

The identification of each compound through HPLC with UV spectrophotometry was based on a combination of retention time and spectral matching since the compounds absorb in the ultraviolet (UV) region. The extracts EAAcc and EAHcc were subjected to this technique and 41 and 32 compounds were visualized, respectively.

In the EAAcc (Fig. 1), four compounds were identified: peak 9 (Rt = 6.44min), peak 18 (Rf = 10 min), peak 21 (Rf = 10.9 min) and peak 34 (Rf = 15 min). Already in EAHcc (Fig. 2) six compounds were identified after the comparison: peak 3 (Rt = 4.18 min), peak 4 (Rt = 4.42 min), peak 7 (Rt = 7.57 min), peak 8 (Rt = 7.98 min), peak 11 (Rt = 8.35 min), peak 23 (Rt = 14.7 min). This were grouped into two classes of phenolic

compounds: (i) phenolic acids: Chlorogenic acids, Acid coumaric and (ii) flavonoids: Catechin, Rutin, Ellagic acid and Quercetin.

After the assays with the extracts, the six semi-purified fractions originating from the chromatographic fractionation of the column were analyzed. The semi-purified, denominated three, of extract EAAcc was tested and considered more efficient due to better results against bacteria *A. citrulli* and *X. campestris pv. campestris*, with MIC and MBC (0.5 mg/mL^{-1}) results for both bacteria (Table 5). However in the semi-purified, of extract ethyl acetate of Hcc the antimicrobial activity test for were positive for *X. campestris pv. campestris* and *X. campestris pv. malvacearum*, the fraction being six the best activity (Table 6).

Table 4: Antibacterial activity, Minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of organics extracts from *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Acc) and *Hymenaea. courbaril* var. *courbaril* (Hcc) against selected plant pathogenic bacterial.

Extracts		<i>Acidovorax citrulli</i>		<i>Pectobacterium carotovorum</i>		<i>Ralstonia solanacearum</i>		<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>		<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>malvacearum</i>		<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i>	
		Acc	Hcc	Acc	Hcc	Acc	Hcc	Acc	Hcc	Acc	Hcc	Acc	Hcc
CHX	MIC	3.12	6.25	3.12	12.5	1.56	6.25	1.56	3.12	1.56	3.12	1.56	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	

CH – cyclohexane; CF – chloroform; EA - etyl acetate; MET – methanol.

Figure 1. HPLC-UV chromatograms from ethyl acetate extract of *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*. 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).

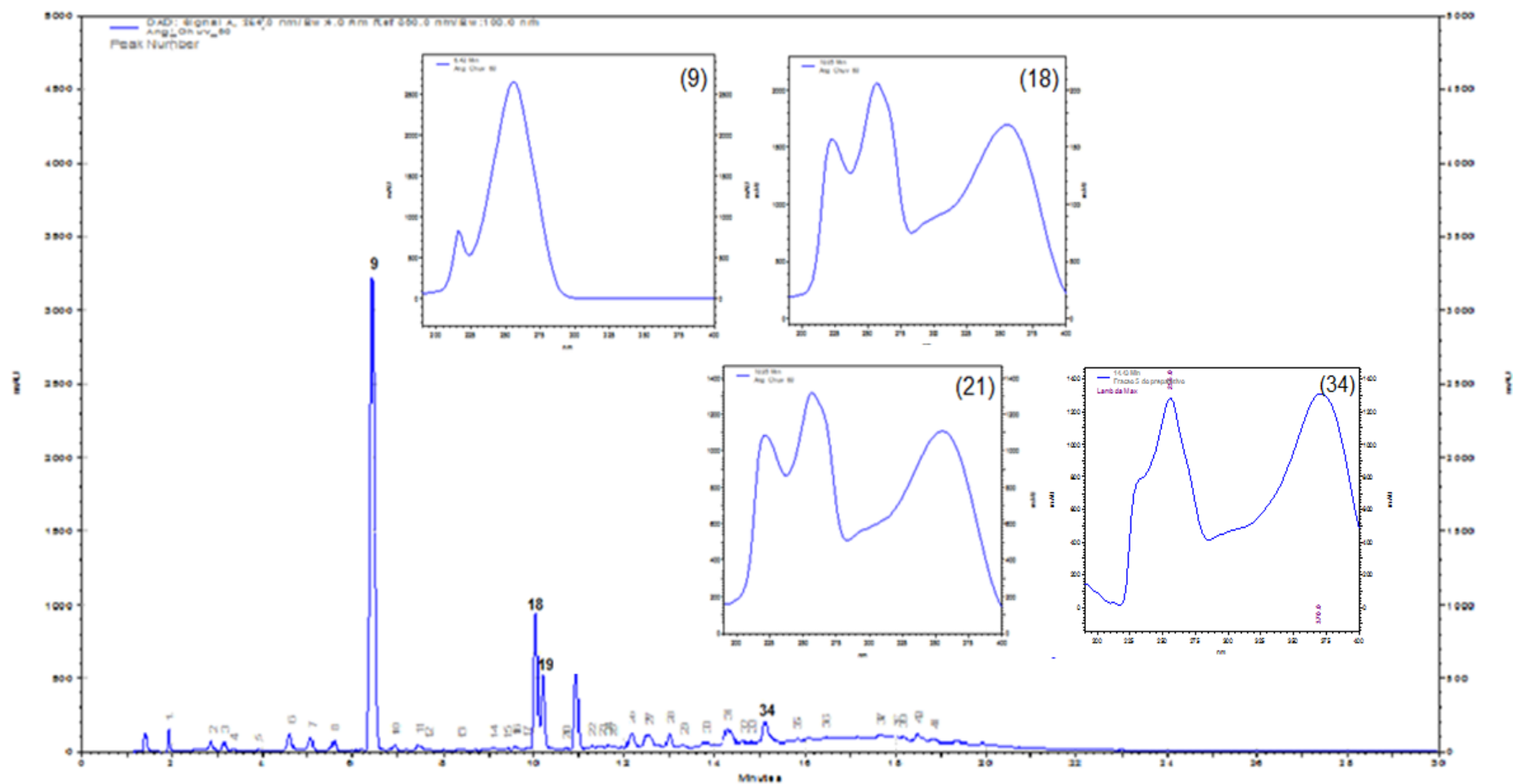


Figure 2. HPLC-UV chromatograms from ethyl acetate extract of *Hymenaea courbaril* var. *courbaril*. Detection at 254 nm. UV spectra analysis of the main peaks. Peak 3: Chlorogenic acids; peak 4: Catechin; peak 7: Acid coumaric; peak 8: Rutin; peak 11: Ellagic acid; peak 22: Quercetin (UV 190- 400nm).

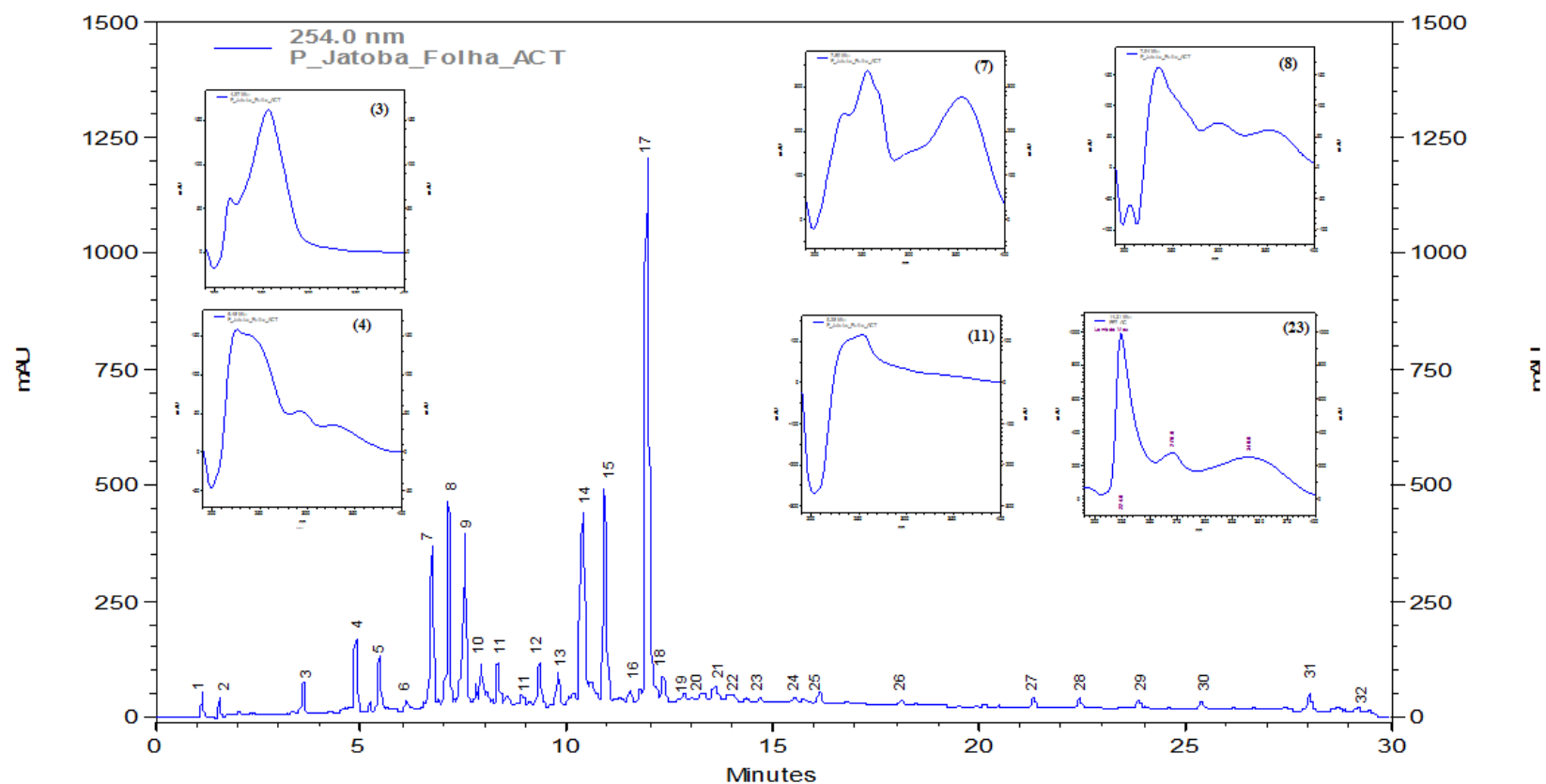


Table 5: Antibacterial activity, Minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of fractions semi purified the column chromatography of EAAcc (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*) extract against selected plant pathogenic bacterial.

Extracts (EAAcc)		<i>Acidovorax citrulli</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
Semi purified 1	MIC	>0.5	>0.5
	MBC	>0.5	>0.5
Semi purified 2	MIC	>0.5	>0.5
	MBC	>0.5	>0.5
Semi purified 3	MIC	0.5	0.5
	MBC	0.5	0.5
Semi purified 4	MIC	>0.5	>0.5
	MBC	>0.5	>0.5
Semi purified 5	MIC	>0.5	>0.5
	MBC	>0.5	>0.5
Semi purified 6	MIC	>0.5	>0.5
	MBC	>0.5	>0.5

Table 6: Antibacterial activity, Minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of fractions semi purified the column chromatography of EAHcc (*Hymenaea courbaril* var. *courbaril*) extract against selected plant pathogenic bacterial.

Extracts (EAHcc)		<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>malvacearum</i>
Semi purified 1	MIC	>0.5	>0.5
	MBC	>0.5	>0.5
Semi purified 2	MIC	>0.5	>0.5
	MBC	>0.5	>0.5
Semi purified 3	MIC	>0.5	>0.5
	MBC	>0.5	>0.5
Semi purified 4	MIC	>0.5	>0.5
	MBC	>0.5	>0.5
Semi purified 5	MIC	>0.5	>0.5
	MBC	>0.5	>0.5
Semi purified 6	MIC	0.5	0.5
	MBC	0.5	0.5

4. DISCUSSION

Although most studies in the field of biocompounds investigations are directed towards clinical use of secondary metabolites because of their biological activities, many of them are applicable in agriculture (Zhang et al., 2016). The agrochemical industry has been investing in the discovery of bioactive natural products for the control of pests and plant diseases due to the biodegradability and low toxicity of this type of substance (Nour et al., 2018).

It is known that angico and jatobá leaves present in their composition important compounds in the defense of plants and pathogenic microorganisms such as bacteria (Araújo et al., 2014) . Several authors have reported that the antimicrobial and insecticidal activity is related to the presence of chemical substances such as tannins, alkaloids, saponins and terpenes, produced by these plants (Bylka et al., 2004, Kuete et al.).

Among the bioactive molecules the flavonoids, derived from plants receive considerable interest due to their antioxidant potential and antimicrobial properties (Xie et al., 2015). In this study, it was observed in all the extracts of both species, the presence of this compound that in turn, may have a great potential to fight phytopathogenic microorganisms. Fascella et al. (2019) suggested that phenolic compounds are frequently extracted in large quantities in polar solvents and the higher molecular weight flavonols in plant materials are better extracted in methanol, however for the species studied there was the presence of flavonoids in any elutropic series.

Among flavonoids, catechin, rutin and Ellagic acid were detected. These compounds are known for their high antioxidant activity and ability to eliminate free radicals (Panaite, et al., 2019), data on the potential of these compounds in phytopathogens are scarce, however probably there is participation of these metabolites for the phytopathogenic activity.

The results obtained suggest that the phytochemical extracts have a broad spectrum of activity against phytopathogenic bacteria, quercetin, the compound found in the two species studied, according to Ziani et al. (2018) can act as antibiotics due to their ability to act with extracellular and soluble proteins and may act on the bacterial cell wall, often leading to its inactivation and loss of function. Many research papers identify this structure as having antibacterial activity (Wink, 2015).

In this context, among the plants studied, the ethyl acetate extract presented better activity, revealing the lower MIC values. This activity may be due to the presence of polar compounds present in the extract, since it had a high content of phenolic compounds in photochemical screening.

In previous studies with extracts of leaves and fruits of *A. colubrina* var. *cebil* was observed antimicrobial activity against *Alternaria alternata* (Person et al., 2012), clinical isolates of *Staphylococcus aureus* (Baker et al., 2016), multiresistant strains of *S. aureus* and *E. coli* (Smith 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* (Araujo et al, 2014; Lima et al., 2014.). For *H. courbaril* var. *courbaril*, the leaf extract presented antimicrobial activity against *Proteus mirabilis* and *S. aureus* isolates

(Gonçalves et al., 2005), strains of *E. coli* (Fernandes et al., 2005) and inhibition of strains of *Pseudomonas aeruginosa* (Garcia et al., 2011).

From these results, it can be suggested that the antimicrobial activity against phytopathogens from leaf extracts of *A. colubrina* var. *cebil* and *H.courbaril* var. *courbaril*, can be attributed to the presence of flavonoids, which have been known to have a strong microbicidal capacity, it is worth noting that this is the first record of this activity for these plant species, thus, gives suggested the fractionation and identification gives semi-purified fractions studied in the present research.

The present study highlights the importance of natural products in the discovery of novel bioactive compounds that can be successfully used as plant-based biocides after in vivo validation studies.

5. CONCLUSIONS

The extracts activity of *A. colubrina* var. *cebil* and *H.courbaril* var. *courbaril*, against phytopathogenic bacteria were confirmed and can be attributed the presence of flavonoids, in this case responsible for the increase of antimicrobial activity. Its extracts and semi-purified can be considered natural bactericide against several phytopathogens of 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.
- Barreto, H. M., Coelho, K. M., Ferreira, J. H., dos Santos, B. H., de Abreu, A. P., Coutinho, H. D., 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. *Natural product research*, 30,11, 1289-1292.
- Bylka W, Matlawska I, Pilewski NA. Natural flavonoids as antimicrobial agents. *JANA* 2004;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.
- Fascella, G., D'Angiolillo, F., Mammano, M. M., Amenta, M., Romeo, F. V., Rapisarda, P., & Ballistreri, G. (2019). Bioactive compounds and antioxidant activity of four rose hip species from spontaneous *Sicilian* flora. *Food Chemistry*, 289, 56–64.
- Fernandes, A.W.C, Aquino, S.Á.M.C., Gouveia, G.V., Almeida, J.R.G.S., Costa, M.M.. (2015). Atividade antimicrobiana in vitro de extratos de plantas do bioma caatinga em isolados de *Escherichia coli* de suínos. *Rev. bras. plantas med.*,17,4,3,1097-1102.
- Fernandes, M. F.; Queiroz, L. P. (2018) Vegetação e flora da Caatinga. *Cienc. Cult.* 70, 4, 51-56.

Fernandes, T.T. (2005). Atividade antimicrobiana das plantas *Plathymenia reticulata*, *Hymenaea courbaril* e *Guazuma ulmifolia*, *Revista de Patologia Tropical*, 34, 2,113-122.

Garcia, C.S. Avaliação da atividade antibacteriana in vitro de extratos hidroetanólicos de plantas sobre *Staphylococcus aureus* MRSA e MSSA.(2011).*Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 70,4, 589-98.

Gonçalves, A. L. (2005). Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. *Arquivos do Instituto Biológico*, 72, 3, 353-358.

Lazarini, J.G.; Sardi, J.C.O.; Franchin, M.; Nani, B.D; Freires, I. A.; Infante, J.; Paschoal, J. A. R.; Alencar, S. M.; Rosalen, P. L. (2018) Bioprospection of *Eugenia brasiliensis*, a Brazilian native fruit, as a source of anti-inflammatory and antibiofilm compounds. *Biomedicine and Pharmacotherapy*102, 132-139.

Lima, R. D. F. (2018) *Anadenanthera colubrina* (VELL.) Brenan: Perfil químico e atividade anticandida, antibiofilme, antitumoral e citotóxica, 2018.

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.

Mercês, P. F. F., da Silva-Bessa, C. M. A., Malafaia, C. B., de Câmara, C. A. G., Da Silva, M. M. C., Navarro, D. M. D. A. F., Oliva, M. L. V. (2018). Caracterização fitoquímica e avaliação do potencial acaricida e inseticida do óleo essencial de *Hymenaea courbaril* L. var. *courbaril* sobre o ácaro-rajado e o gorgulho do milho. *Journal of Environmental Analysis and Progress*, 3(4), 417-428.

- Nour, V., Panaite, T. D., Ropota, M., Turcu, R., Trandafir, I., Corbu, A. R. (2018). Nutritional and bioactive compounds in dried tomato processing waste. *CyTA-Journal of Food*, 16(1), 222-229.
- Pamphile, J. A., Costa, A. T., Rosseto, P., Polonio, J. C., Pereira, J. O., Azevedo, J. L. (2018). Aplicações biotecnológicas de metabólitos secundários extraídos de fungos endofíticos: o caso do *Colletotrichum* sp. *Revista Uningá*, 53,1.
- Pessoa, W. S., Estevão, L. R. D. M., Simões, R. S., Barros, M. E. G. D., Mendonça, F. D. S., Baratella-Evêncio, L., Evêncio-Neto, J. (2012). Effects of angico extract (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*) in cutaneous wound healing in rats. *Acta cirurgica brasileira*, 27(10), 655-670.
- Pires, E. Uma Visão Geral Sobre Antifeedants em Insetos. (2017) *RECEN-Revista Ciências Exatas e Naturais* 19 1 56-67.
- 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., Morris, D.A. (1982) Invertase activity, soluble carbohydrates and inflorescence development in the tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Ann Bot* 49, 89–98.
- 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.

Silva-Bessa, C. M. A., das Mercês, P. F. F., Malafaia, C. B., Napoleão, T. H., da Silva, M. M. C., da Câmara, C. A. G., Oliva, M. L. V. (2019). Evaluation of the insecticidal potential of leaf extracts of *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb) Altschul against *Tetranychus urticae* Koch and *Sitophilus zeamais* Mots. *Journal of Environmental Analysis and Progress*, 4(1), 048-056.

Strumeyer, D.H., and Malin, M.J. (1975). Condensed tannins in grain sorghum: Isolation, fractionation, and characterization. *J. Agric. Food Chem.* 23: 909–914.

Subbanna, A. R. N. S., Stanley, J., Rajasekhara, H., Mishra, K. K., Pattanayak, A., Bhowmick, R. (2019). Perspectives of Microbial Metabolites as Pesticides in Agricultural Pest Management. *Co-Evolution of Secondary Metabolites*, 1-28.

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.

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.

Zhang, H.W. et al. Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports*, v.23, p.753–771, 2016.

Ziani, B. E., Heleno, S. A., Bachari, K., Dias, M. I., Alves, M. J., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2019). Phenolic compounds characterization by LC-DAD-ESI/MSⁿ and bioactive

properties of *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. and *Ephedra alata* Decne. *Food Research International*, 116, 312-319.

4 CONCLUSÃO

De acordo com o presente estudo, os extratos ciclohexânico e acetato de etila das folhas apresentam resultados promissores, o que instigam a realização de novos estudos com esta espécie vegetal para a determinação de substâncias presentes no extrato, as quais contribuem para a atividade biológica. Afim de entender seu mecanismo de ação e avaliar através de outros ensaios sua toxicidade, visando uma possível aplicação farmacêutica.

REFERENCIAS

ABDELGALEIL, S. A.; BADAWY, M. E.; MAHMOUD, N. F.; MAREI, A. E. S. M. Acaricidal activity, biochemical effects and molecular docking of some monoterpenes against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). **Pesticide biochemistry and physiology**, v.156, p.105-115, 2019.

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

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. ed 5 th. Elsevier: Academic Press. 5ed. 2005. 922p.

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

AGUIAR, J.C.D.; SANTIAGO, G.M.; LAVOR, P. L.; VERAS, H. N.; FERREIRA, Y. S.; LIMA, M. A.; ALVES, P. B. Chemical constituents and larvicidal activity of *Hymenaea courbaril* fruit peel. **Natural product communications**, v.5, n. 12, 2010.

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>>. Acessado em 29 de novembro de 2018.

AGUIAR-MENEZES, E.L. Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola. **Seropédica: Embrapa Agrobiologia**, 2005. 58 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 205).

Almeida DFLS, Estudo das Vias Metabólicas das Plantas na Síntese de Pigmentos Naturais,

ALMEIDA, D.F.L.S. **Estudo das vias metabólicas das plantas na síntese de pigmentos naturais**, Ed by Pessoa UF, Porto, Portugal, p 61 2017.

ALVAREZ, S. Potential economic costs of invasive structural pests: conehead *Termites nasutitermes* corniger, in Florida†. **Journal of Environmental Planning and Management**, v. 59, n. 12, p. 2145–2162, 2016.

ALVES, A.O.; XAVIER, A.D.S.; CONCEIÇÃO, C.S.D.; MARIANO, R.D.L.R.; SOUZA, E.B.D. Survival of *Acidovorax citrulli* in infected melon tissues and in different edafoclimatic conditions. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 40, n. 5, 2018.

AMMAR, M.I.; NENAAH, G.E.; MOHAMED, A.H.H. Antifungal activity of prenylated flavonoids isolated from *Tephrosia apollinea* L. against four phytopathogenic fungi. **Crop Protection**, v. 49, p. 21–25, 2013.

AQUASTAT – FAO. 2010. Disponível em: <<http://www.fao.org/nr/water/aquastat/main/index.stm>>. Acessado em 10 março 2019

AQUINO, F.G.; RIBEIRO, J.F.; WALTER, B.M.T. Espécies vegetais de uso múltiplo em reservas legais de Cerrado, Balsas/MA. **Revista Brasileira de Biociências** 5(1): 147–149, 2007.

ARAÚJO, C. A. **Bibliometria**: evolução histórica e questões atuais. Em questão, v. 12, n. 1, 2015.

ARAÚJO, D.R.C.; DA SILVA, L.C.N.; HARAND, W.; FERNANDES, J.M.; DA CUNHA SOARES, T.; LANGASSNER, S.M.Z.; DOS SANTOS CORREIA, M.T. Effects of Rainfall on the Antimicrobial Activity and Secondary Metabolites Contents of Leaves and Fruits of *Anadenanthera colubrina* from Caatinga Area. **Pharmacognosy Journal**, v. 9, n. 4, 2017.

ASH, C. Feeding the future. **Science**, v.327, p.797, 2010.

ASQUITH, N.M.; TERBORGH, J.; ARNOLD, A.E.; RIVEROS, C.M. The fruits the agouti ate: *Hymenaea courbaril* seed fate when its disperser is absent. **Journal of Tropical Ecology** 15: 229–235, 1999.

Associação Brasileira da Indústria Química. Brasil. **A indústria química brasileira**. Disponível em: <<http://www.abiquim.org.br/pdf/indQuimica/AIndustriaQuimica-SobreSetor>> Acessado em: 22 de janeiro de 2014.

BADAWY, M. E.; ABDELGALEIL, S. A.; MAHMOUD, N. F.; MAREI, A. E. S. M. Preparation and characterizations of essential oil and monoterpene nanoemulsions and acaricidal activity against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). **International journal of acarology**, v.44, n. 7, p.330-340, 2018.

BALDWIN, I.T. Plant Volatiles. **Curr Biol**, v. 20, p. 392-397, 2010.

BARBOSA, E.A.S. **Efeitos de extratos de Casearia javitensis Kunth(Salicaceae) sobre Sitophilus zeamais Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae)**. 2015. 54 f. Dissertação (Ciências Biológicas (Entomologia) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2015.

BARBOSA, L.C.A. **Os pesticidas, o homem e o meio ambiente**. Viçosa: UFV, 2004.

BASTOS, G.M. In vitro determination of the antimicrobial potential of homemade preparations based on medicinal plants used to treat infectious diseases. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 113-120, 2011.

BATEY, I.L. The diversity of uses for cereal grains. In **Cereal Grains Press, New Delhi**, p. 45–58, 2017.

BENSOUSSAN, N.; ZHUROV, V.; YAMAKAWA, S.; O'NEIL, C. H.; SUZUKI, T.; GRBIC, M.; GRBIC, V. The digestive system of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Koch), in the context of the mite-plant interaction. **Frontiers in plant science**, v. 9, p.1206, 2018.

BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. Biocontrole de doenças de plantas. Uso e perspectivas. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, 2009. 332p, 2009.

- BFG - The Brazil Flora Group. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. **Rodriguésia** 66: 1085-1113, 2015.
- BOREL, B. When the pesticides run out. **Nature** 543:302–4, 2017
- BUTNARIU, M.; SARAC, I. Essential Oils From Plants. **Journal of Biotechnology and Biomedical Science**, v.1, n. 4, p. 35, 2018.
- BORTOLOTTO, O.C. The use of soybean integrated pest management in Brazil: a review. **Agronomy Science and Biotechnology**, v.1, n. 1, 2015.
- BRASIL - MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Caatinga**. Disponível em: [Link] acessado em: 11 de março de 2018.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Plano Agrícola e Pecuário 2016-2017 / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Política Agrícola. – Brasília: Mapa/SPA, 2016.
- BRASIL. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Decreto nº 4074, de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a LEI nº 7802, de 11 de julho de 1989. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decret/2002/d4074.htm>. Acessado em: 26 de janeiro de 2019.
- BRASIL. Projeções do Agronegócio. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A.: 103 p. 2017
- BURGER, J.; MOL, F.; GEROWITT, B. A "**extensão necessária**" do uso de **pesticidas** - Pensamentos sobre um termo-chave na política alemã de pesticidas. *Crop Prot*, v.27, p. 343-351, 2008.
- BUSBY, P.E.; SOMAN, C.; WAGNER, M.R.; FRIESEN, M.L.; KREMER, J. **Research priorities for harnessing plant microbiomes in sustainable agriculture**. *PLOS Biol.*,v.15, 2017.
- BUSS, E. A.; PARK-BROWN, S. G. Natural products for insect pest management. Gainesville: UF/IFAS, 2002. Disponível em: <http://edis.ifas.ufl.edu/IN197>. Acessado em: 2 mar 2018.
- CARDOSO, R.R. Efeito da incorporação de hidrogel em substratos na produção de mudas de jatobá-da-mata (*Hymenaea courbaril* Lee & Lang) e jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.). 2017.
- CARVALHO, M.G., MELO, A.G.N., ARAGÃO, C.F.S., RAFFIN, F.N., MOURA, T.F.A.L. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. *Rev. Bras. Plantas Med. (Botucatu)*, v.15, p.158–169, 2013.
- CARVALHO, P.E.R. **Angico branco**. Colombo: Embrapa Florestas, Embrapa Florestas. Circular técnica, v. 56, p.10, 2002.
- CECILIO, A.B. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. **J Ethnopharmacol**, v. 141, n. 3, p. 975-81, Jun 14 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22469769>>. Acessado em: 04 de março de 2018.

- CHEN, D.; WAN, S.B.; YANG, H.; YUAN, J.; CHAN, T.H.; DOU, Q.P. EGCG, green tea polyphenols and their synthetic analogs and prodrugs for human cancer prevention and treatment. **Advances in Clinical Chemistry**, v.53, p.155-77, 2011.
- CHIESA, M.A.; ROESCHLIN, R.A.; FAVARO, M.A.; UVIEDO, F.; CAMPOS-BENEYTO, L.; D'ANDREA, R.; MARANO, M. R. Plant responses underlying nonhost resistance of *Citrus limon* against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Molecular plant pathology**, v.20, n. 2, p. 254-269, 2019.
- CICHEWICZ, R.H.; THORPE, P.A. The antimicrobial properties of chile peppers (*Capsicum species*) and their uses in Mayan medicine. **J. Ethnopharmacol**, v. 52, p. 61–70, 1996.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Primeiro levantamento, Maio de 2016. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acessado em: 28 de fevereiro de 2018.
- COUTINHO, M.A.S.; MUZITANO, M.F.; COSTA, S.S. Flavonoides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241-56, 2009.
- DA CONCEIÇÃO, C.S.; SOUZA, B.V.; VIEIRA, J.M.B.D.; DOS SANTOS NASCIMENTO, J. Pathogen killing pathogen: antimicrobial substance from *Acinetobacter* active against foodborne pathogens. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 12, n. 05, p. 297-304, 2018.
- DA SILVA, S.P.M. Ocorrência de *Tricorynus* sp.(Coleoptera: Anobiidae) em frutos de jatobazeiro *Hymenaea courbaril* L.(Fabaceae) no município de Santo Antônio do Leverger, Mato Grosso. **Biodiversidade**, 16.1, 2017.
- DAIUTO, E.R.; TREMOCOLDI, M.A.; ALENCAR, S.M.; VIEITES, R.L; MINARELLI, P.H. Composição química e atividade antioxidante da polpa e resíduos de abacate 'Hass'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, n. 2, p. 417-424, 2014.
- DAWIDAR, A.M, ABDEL-MOGIB, M.; EL-NAGGAR, M.E.; MOSTAFA, M.E. Isolation and characterization of *Polygonum equisetiforme* flavonoids and their acaricidal activity against *Tetranychus urticae* Kokh. **Res J Pharm Biol Chem Sci**, v. 5, p. 140–148, 2014.
- DE SILVA, T; FORBES, S.L. Sustainability in the New Zealand horticulture industry. **Journal of Cleaner Production**, v. 112, 2016.
- DIÁNEZ, F.;SANTOS, M.; PARRA, C.; NAVARRO, M. J.; BLANCO, R.; GEA, F. J. Screening of antifungal activity of 12 essential oils against eight pathogenic fungi of vegetables and mushroom. **Letters in applied microbiology**, v.67, n. 4, p. 400-410, 2018.
- DIETRICH, F. Utilização de inseticidas botânicos na agricultura orgânica de Arroio do Meio/RS. **Revista brasileira de agrociência**, v.17, n.2-4, p.251-255, 2011.
- DOMINGO D.; LÓPEZ-BREA, M. Plantas con acción antimicrobiana. **Revista Española de Quimioterapia**, v.16, n. 4, p. 385-393, 2003.

DOUGLAS, A. E. Strategies for Enhanced Crop. **Annual Review of Plant Biology**, New York, v. 69, p. 24, novembro 2018.

DUKE, J. A. Handbook of medicinal herbs. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla, 1985

DUNLAP, T.R. Carson's Silent Spring: A Reader's Guide. **Journal of Historical Geography**, v.49, 2015.

EMBRAPA 2016. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/tema-controle-biologico/sobre-o-tema>>. Acessado em: 20 de fevereiro de 2018.

EPPO, 2013. PQR database. Paris, France: European and Mediterranean Plant Protection Organization. Disponível em: <http://www.eppo.int/DATABASES/pqr/pqr.htm>. Acesso em: maio. 2019.

FELIPE, L.O.; BICAS, J.L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nov na Esc**, v.39, n. 2, p. 120-30, 2017.

FERRARI, A. Agrotóxicos: a praga da dominação. 2ª ed. Porto Alegre, **Mercado Aberto**, 1986.

FIDELES, N. Impactos da Revolução Verde. Radioagencia NP, São Paulo, set. 2006. Disponível em: <<http://www.radioagencianp.com.br>>. Acessado em: 3 de janeiro de 2018.

Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acessado em: 04 de Março de 2018.

FOUGÈRE-DANEZAN, M.; HERENDEEN, P.S.; MAUMONT, S.; BRUNEAU, A. Morphological evolution in the variable resin-producing Detarieae (Fabaceae): Do morphological characters retain a phylogenetic signal? **Annals of Botany** 105: 311–325, 2010.

FRONZAGLIA, T. O futuro do controle biológico. **Análise e indicadores do agronegócio**, v. 1, n. 12, 2016.

FU, W.J.; LIU, J.; ZHANG, M.; LI, J. Q.; HU, J. F.; XU, L. R.; DAÍ. G.H. Isolation, purification and identification of the active compound of turmeric and its potential application to control cucumber powdery mildew. **The Journal of Agricultural Science**, v. 156, n. 3, p.358-366, 2018.

GALLO, D.; NAKANO, O.; NETO, S. S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; FILHO, E. B.; PARRA, J. R. P. **Entomologia agrícola**, Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

GEREMIA, B. **Agrotóxico**: o emprego indiscriminado de produtos químicos no ambiente de trabalho rural e a responsabilização por danos à saúde. 2011. 142 f. Dissertação (Mestrado em Direito) – Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, 2011.

GHAURI, A.O.; AHMAD, S.; REHMAN, T.; ABBASI, W.M.; BILAL, M.; ARSHAD, A. Screening of Biological Activities of Some Leguminosae (Fabaceae) Family Plants. **RADS J Pharm Pharm Sci**, v. 6, n. 2, p. 132, 2018.

GHINI, R.; BETTIOL, R. Proteção de plantas na agricultura sustentável. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v.17, n.1, p.61-70. 2000.

GIBBS, P.E.; OLIVEIRA, P.E.; BIANCHI, M.B. Postzygotic control of selfing in *Hymenaea stigonocarpa* (Leguminosae- Caesalpinioideae), a bat-pollinated tree of the Brazilian cerrados. **International Journal of Plant Science** 160: 72–78, 1999.

GNATTA, Juliana Rizzo et al . Aromaterapia e enfermagem: concepção histórico-teórica. **Rev. esc. enferm. USP**, São Paulo , v. 50, n. 1, p. 127-133, 2016 .

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

GOODMAN, R.N.; KIRÁLY, Z.; WOOD, K.R. **The biochemistry and physiology of plant disease**. Columbia, University of Missouri Press, 1986. 433p.

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

GOUVÊA, C.M.C.P. Aqueous extract of *Plinia edulis* leaves: Antioxidant activity and cytotoxicity to human breast cancer MCF-7 cell line. **South African Journal of Botany**, v. 81, p. 1-7, apr., 2012.

GRIGORI, P. **Governo libera registros de agrotóxicos altamente tóxicos**. Disponível em: <https://reporterbrasil.org.br/2019/01/governo-liberou-registros-de-agrotoxicos-altamente-toxicos/> Acesso em: 25 de maio de 2019.

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

GUEDES, R.N.C. Pesticide-Induced Stress in Arthropod Pests for Optimized Integrated Pest Management Programs. **Annual review of entomology**, n. 0, 2016.

GUERRA, M.L.; MALAFAIA, C.B.; MACEDO, A.J.; SILVA, M.V., MARIANO, R. L.; SOUZA, E.B. Biofilm formation by *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* affected by abiotic surfaces and culture media. **Tropical Plant Pathology**, n. 43, n..2, p. 146-151, 2018.

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

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992.

HASHIDOKO, Y. Studies on the metabolic regulation of denitrifying bacteria and phytopathogenic microorganisms using chemical agents found in chemical ecology-based phenomena. **Journal of pesticide science**, v. 43, n. 1, p. 47-54, 2018.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **J. Nat. Prod**, v. 59, p.205–215, 1996.

- HENRIQUES, A.T.; LIMBERGER, R.P.; KERBER, V.A.; MORENO, P.R.H. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. 5° ed., Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1102p., 2004.
- HERNANDEZ, D.M. et al . Efecto de la estructura molecular sobre el espectro electrónico vertical de la oxoglaucaína. **Rev .Colomb. Quim.**, Bogotá, v. 47, n. 1,p. 64-76, Apr. 2018.
- HOUGHTON, P. J.; WOLDEMARIAM, T.Z.; KHAN, A.I.; BURKE, A.; MAHMOOD, A. Antiviral activity of natural and semi-synthetic chromosome alkaloids. **Antiviral Res**, v. 25, p. 235–244, 1994.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas. 2013. Histórico: Buíque Pernambuco - PE. Disponível em <<http://cidades.ibge.gov.br/painel/historico.php?codmun=260280>>. Acessado em: 10 de março de 2018.
- ICMBio. Parque Nacional do Catimbau. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/unidadesdeconservacao/biomasbrasileiros/caatinga/unidades-de-conservacao-caatinga/2135-parna-do-catimbau>. Acesso em: 04 mar 2018.
- IGLESIAS-BERNABÉ, L.; MADLOO, P.; RODRÍGUEZ, V. M.; FRANCISCO, M.; SOENGAS, P. Dissecting quantitative resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in leaves of *Brassica oleracea* by QTL analysis. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, 2015.
- ILEKE, K.D.; ONI, M.O. Toxicity of some plant powders to maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) [Coleoptera: Curculionidae] on stored wheat grains (*Triticum aestivum*). **Afr. J. Agric. Res**, v. 6, n. 13, p. 3043-3048, 2011.
- ISMAIL, M. S. M.; TAG, H. M.; RIZK, M. A. Acaricidal, ovicidal, and repellent effects of Tagetes patula leaf extract against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **Journal of Plant Protection Research**, v. 59, n.2, 2019.
- ISMAN, M.B.; MIRESMAILLI, S.; MACHIAL, C. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. **Phytochem**, v. 10, p.197–204, 2011.
- JOHAL, G.S.; GRAY, J.; GRUIS, D.; BRIGGS, S.P. Convergent insights into mechanisms determining disease and resistance response in plant-fungal interactions. **Canadian Journal Botany**. v.73, p.468-474, 2015.
- JOHNSON, H.A.; ORBELIES, N.H.; ALALI, F.Q.; McLAUGHLIN, J.L. Thwarting resistance: annonaceous acetogenins as new pesticidal and antitumor agents. **Biologically active natural products: pharmaceuticals**, Boca Raton, London, New York, Washington: CRC Press, 2000, p.173-184.
- KABERA, J.N.; SEMANA, E., MUSSA, A.R.; HE, X. Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2, 377-392, 2014.

KALPANA, P.; CHELLAMUTHU, V.; JEYALAKSHMI, C. Screening of *Cotton hybrids* against bacterial blight incited by *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (Smith) Dye. **Crop Production**, v. 23, p. 373-374, 2014

KARLEC, F., FONSECA, A.D., OLIVEIRA, A.C.B. AND CUNHA, U.S. Development of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) in different strawberry cultivars. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.39, n. 1, p. 1-8., 2017.

KATHRINA, G. A.; ANTONIO, L. O. J. Controle biológico de insectos mediante extractos botánicos. In: CARBALL, M.; GUAHARAY, F. (Ed.). **Control biológico de plagas agrícolas**. Managua: CATIE, 2004. p. 137-160. (Serie Técnica. Manual Técnico/CATIE, 53).

KHALIGHI-SIGAROODI, F., AHVAZI, M.; HADJIAKHOONDI, A.; TAGHIZADEH, M.; YAZDANI, D.; KHALIGHI-SIGAROODI, S.; BIDEI, S. Cytotoxicity and antioxidant activity of 23 plant species of Leguminosae family. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v.11, n. 1,p. 295, 2012.

KLEMENT, T.; BÜCHS, J. Itaconic acid – A biotechnological process in change. **Bioresource Technol.**,v.135, p.422-431, 2013.

KROETZ, C.E.S. **Balanco Social: teoria e prática**. São Paulo: Atlas, 2015.

KYNGMI, M.S.; EBELER, E. Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 1, p. 96-104, 2008.

LA CRUZ, Márcia N. S. de et al . Terpenos em cupins do gênero *Nasutitermes* (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae). **Quím. Nova**, São Paulo, v. 37, n. 1, p. 95-103, 2018.

LAMPILA, P.; VAN LIESHOUT, M.; GREMMEN, B.; LAHTEENMAKI, L. Consumer attitudes towards enhanced flavonoid content in fruit. **Food Research International**, Essex, v. 42, n. 1, p. 122–129, 2018.

LANGENHEIM, J.H. Amber: a botanical inquiry. **Science** 163: 1157–1169, 1969.

LEE, Y.T.; LANGENHEIN, J.H. Systemetics of the genus *Hymenaea* L. (Leg. Caesalpinioideae, Detarieae). **University of California Publications in Botany** 69: 1-109, 1975.

LEFF, E. **Ecologia, capital e cultura**: a territorialização da racionalidade ambiental. Tradução Jorge E. Silva. Petrópolis, RJ: Vozes, 2009, p. 251.

LEMONS, T.L.G.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; CRAVEIRO, A.A.; CLARK, A.M.; McCHESNEY, J.D. Antimicrobial activity of essential oils of brazilian plants. **Phytotherapy Research**, v.4, n.2, p.82-84, 2017.

LEWIS, G.P.; SCHRIRE, B.D.; MACKINDER, B.A.; LOCK, J.M. Legumes of the world. **Royal Botanic Garden**, Kew. 577p, 2005.

LIMA, A.L.S.; ZANELLA, F.; CASTRO, L.D.M. Growth of *Hymenaea courbaril* L. var. *stilbocarpa* (Hayne) Lee et Lang. e *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong (Leguminosae) under different shading levels. **Acta amazônica**, 40.1: 43-48, 2010.

LIMA, R. D. F.; ALVES, É. P.; ROSALEN, P. L.; RUIZ, A. L. T. G.; TEIXEIRA DUARTE, M. C.; GÓES, V. F. F.; MELO DE BRITO COSTA, E. M. Antimicrobial and antiproliferative potential of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. Evidence-Based **Complementary and Alternative Medicine**, 2014.

LIMA, R. de F. ***Anadenanthera colubrina* (VELL.) Brenan: Perfil químico e atividade anticandida, antibiofilme, antitumoral e citotóxica.** 2018. 111f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Odontologia - PPGO) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2018.

Lima, Rennaly de Freitas. *Anadenanthera colubrina* (VELL.) Brenan: perfil químico e atividades anticandida, antibiofilme, antitumoral e citotóxica. 2018. 111f.; il. 30cm Tese (Doutorado em Odontologia) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Paraíba, 2018.

LORENZI, H. Manual de identificação e controle de plantas daninhas. 6.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda., 339p., 2006.

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

LORINI, I. **Manejo integrado de pragas de grãos e sementes armazenadas.** Brasília, DF: Embrapa Soja, 2015.

LOUREIRO, R.J., ROQUE, F., RODRIGUES, A.T., HERDEIRO, M.T., RAMALHEIRA, E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de saúde pública**, v. 34, n. 1, p. 77–84, 2016.

LPWG - The Legume Phylogeny Working Group. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *Taxon* 66: 44-77, 2017.

LPWG - The Legume Phylogeny Working Group. Legume phylogeny and classification in the 21st century: Progress, prospects and lessons for other species-rich clades. **Taxon** 62: 217-248, 2013.

LUCAS, G.C.; ALVES, E.; PEREIRA, R.B.; PERINA, F.J.; SOUZA, R.M.D. Antibacterial activity of essential oils on *Xanthomonas vesicatoria* and control of bacterial spot in tomato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n.3, p. 351-359, 2012.

LUCKER, J.; SCHWAB, W.; VAN HAUTUM, B.; BLAAS, J.; VAN DER PLAS, L. H.W.; BOUWMEESTER, H. J.; VERHOEVEN, H. A. Increased and altered fragrance of tobacco plants after metabolic engineering using three monoterpene synthases from lemon. **Plant Physiol.**, v.134, p.510-519, 2004.

LUTHRIA, D.L. Significance of sample preparation in developing analytical methodologies for accurate estimation of bioactive compounds in functional foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, n. 14, p. 2266–2272, 2006.

MACKINDER, B. Detarieae. In: LEWIS, G.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. (eds), Legumes of the World. **The Royal Botanical Gardens**, Kew, p. 69–71, 2005.

MAIRESSE, L.A.S. **Avaliação da bioatividade de extratos de espécies vegetais, enquanto excipientes de aleloquímicos**. Santa Maria, 2005, 340 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria.

MARANGONI, C. Utilização de óleos essenciais e extratos de plantas no controle de insetos. **Revista de Ciências Ambientais**, v.6, n.2, p.95-112, 2012.

MARTIN, D. M.; GERSHENZON, J.; BOHLMENN, J. Induction of volatile terpene biosynthesis and diurnal emission by methyl jasmonate in foliage of Norway spruce. **Plant Physiol.**, v.132, p.1586-1599, 2003.

MARTINO, V.S. Atividades biológicas de los flavonoides naturales. In: YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. (Org.) **Química de produtos naturais: novos fármacos e a moderna farmnacognosia**. 4. ed. UNIVALI: Itajaí, 2014.

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

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

McKAY, S.A.B.; HUNTER, W.L.; GODARD, K.; WANG, S.X.; MASRTIN, D.M.; BOHLMANN, J.; PLANT, A.L. Insect attack and wounding induce traumatic resin duct development and gene expression of ()-pinene synthase in sitka spruce. **Plant Physiol.**, v.133, p.368-378, 2003.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; SANTOS, T.C.DOS; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127–130, 2001.

MIOTTO, S.T.S.; LÜDTKE, R.; OLIVEIRA, M.L.A.A. A família Leguminosae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 6, n. 3, 2008.

MMA – Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. Avaliação e ação e prioritárias para a conservação da biodiversidade da Caatinga. Universidade Federal de Pernambuco/Fundação de apoio ao desenvolvimento, Fundação Biodiversitas, EMBRAPA/Semiárido, MMA/SBF, Brasília, 2002.

MOLINA, B.S.C.; MARTINS, M.P.; REYES, T.B.; QUEIROZ, M.M.C.; ESCALONA, A.J.C.; GARCÍA, D.J.; GUISADO, B.F. Effects of *Persea americana* Mill. seed extract

- on the postembryonic development of *Musca domestica* (Diptera: Muscoide). **J Pharm Pharmacogn Res.**, v. 6, n. 2, p. 96–107, 2018.
- MONTEIRO, J.M. Use and traditional management of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan in the semi-arid region of northeastern Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 2, n. 1, p. 7, 2006.
- MOOZ, E.D.; GAIANO, N.M.; SHIMANO, M.Y.H.; AMANCIO, R.D.; SPOTO, M.H.F. Physical and chemical characterization of the pulp of different varieties of avocado targeting oil extraction potential. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 32, p. 274-280, 2012.
- MORIM, M.P. Leguminosae arbustivas e arbóreas da floresta atlântica do Parque Nacional do Itatiaia, sudeste do Brasil: padrões de distribuição. **Rodriguésia**, v. 57, n. 1, p. 27-45, 2016.
- MORO, L. B.; POLANCZYK, R. A.; CARVALHO, J. R. D.; PRATISSOLI, D.; FRANCO, C. R. Biological parameters and life table of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) at papaya cultivars. **Ciência Rural**, v. 42, n. 3, p. 487-493, 2012.
- MOTA, G.S., SARTORI, C.J., MIRANDA, I., QUILHÓ, T., MORI, F.A.; PEREIRA, H. Bark anatomy, chemical composition and ethanol-water extract composition of *Anadenanthera peregrina* and *Anadenanthera colubrina*. **PloS one**, v. 12, n. 12, p. 263, 2017.
- MOURA, R.T.D.A.; GARRIDO, M.D.S.; SOUSA, C.D.S.; MENEZES, R.S.C.; Sampaio, E.V.D. S.B. Comparison of methods to quantify soil microbial biomass carbon. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 40, n. 02, 2018.
- MUELLER, G.M.; JOHN, P.S.; "Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict. **Biodiversity and Conservation**, v. 16, n. 1, p. 1-5, 2007
- AJIMI, B. Applications des marqueurs moléculaires dans l'amélioration du blé tendre pour la résistance aux maladies et aux insectes. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, v. 7, n. 1, p. 17-35, 2013.
- NARANJO, S.E.; ELLSWORTH, P.C.; FRISVOLD, G.B. Economic value of biological control in integrated pest management of managed plant systems. **Annual review of entomology**, v. 60, 2015.
- NESELLO, L.A.N. 1972- Avaliação fitoquímica e farmacológica de plantas frutíferas silvestres selecionadas da flora catarinense / Luciane Angela Nottar Nesello, 2015 148f. ; il.; fig.; tab.
- NIERO, R.; MALHEIROS, A. Terpenóides. In: YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. (Org.) **Química de produtos naturais: novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 3. ed. UNIVALI: Itajaí, 2012.
- NIINEMETS, U.; REICHSTEIN, M.; STAUDT, M.; SEUFERT, G.; TENHUNEN, J.D. Stomatal constraints may affect emission of oxygenated monoterpenoids from the foliage of *Pinus pinea*., **Plant physiol**, v. 130, p. 1371-1385, 2002.

OLIVEIRA, M.C.; PIO, R.; RAMOS, J.D.; LIMA, L.C.O.; PASQUAL, M.; SANTOS, V.A. Fenologia e características físico-químicas de frutos de abacateiros visando à extração de óleo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 3, p. 411-418, 2013.

ONU: The United Nations World Water Development Report 2019: Water for a Sustainable World. WWAP (United Nations World Water Assessment Programme). The United Nations, Paris, UNESCO, 2019.

ORSI, P.R.; BONAMIN, F.; SEVERI, J.A.; SANTOS, R.C.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C.A.; STASI, L.C.D. *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne: a brazilian medicinal plant with gastric and duodenal anti-ulcer and antidiarrheal effects in experimental rodent models. **J. Ethnopharmacol**, v.143, p. 81–90, 2012.

OTIENO, H.M.O. Impacts and management of termites (Isoptera: Termitidae) among smallholder farmers in East Africa. **Journal of Agriculture and Ecology Research International**, p. 1-12, 2018.

PAMPHILE, J.A.; COSTA, A.T.; ROSSETO, P.; POLONIO, J.C.; PEREIRA, J.O.; AZEVEDO, J.L. Biotechnological Applications Of Secondary Metabolites Extracted From Endophytic Fungi: The Case Of *Colletotrichum* sp. **Revista UNINGÁ**, vol.53 ,n.1, pp.113-119, Jul - Set 2017. ISSN: 2318-0579

PAPA, G. **Proteção de Plantas - Métodos de Controle de Pragas e Manejo Integrado**. Viçosa, 2014.

PATEL, A.V.; ROJAS-VERA, J.; DACKER, C.G. Therapeutic constituents and actions of *Rubus* species. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 11, p. 1501-12, jun.,2004.

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

PEREIRA, M.C. **Avaliação de compostos bioativos em frutos nativos do Rio Grande do Sul**. 2011. 131f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, 2011.

PEREIRA, R.B.; ANDRADE, P.B.; VALENTÃO, P. Chemical Diversity and Biological Properties of Secondary Metabolites from Sea Hares of *Aplysia* Genus. **Mar. Drugs**, n. 14, p. 39-72, 2016.

PERES, F.; MOREIRA, J. C.; DUBOIS, G. S. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. In: PERES, F. e MOREIRA, J. C. (org). *É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente*. Rio de Janeiro: Ed. FIOCRUZ. p. 21-41, 2013.

PERES, L.E.P. **Metabolismo Secundário**. Piracicaba – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/Universidade de São Paulo, p. 1-10. 2017.

PERES, M.T.L.P.; MONACHE, F.D; CRUZ, A.B; PIZZOLATTI, M.G; YUNES, A. Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). **J. Ethnopharmacol**, v. 56, p. 223–226, 1997.

PERRETT, S.; WHITFIELD, P.J.L.; BARTLETT, A. The plant molluscicide *Millettia thonningii* (Leguminosae) as a topical antischistosomal agent. **J. Ethnopharmacol**, v. 47, p. 49–54, 1995.

PESTANA, L.T.C. **Estudo Taxonômico de *Hymenaea L.*: complexo *H. courbaril*, *H. martiana* e *H. stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae: Detarieae)**. Dissertação de Mestrado. Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2010.

PICKENS, L.B.; TANG, Y.; CHOOI, Y.H. Metab. Eng. for the production of natural products. **Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.** 2, 211-236, 2011.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035-42, jul., 2000.

PIGNATI, W.A. Acidente rural ampliado: o caso das “chuvas” de agrotóxicos sobre a cidade de Lucas do Rio Verde – MT. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v.12, n. 1, 2012, p. 299-311

PINTO, A. A. D. C.; MADURO, C. B. Produtos e subprodutos da medicina popular comercializadas na cidade de Boa Vista, Roraima. **Acta Amazônica**, v. 33, n. 2, p. 281- 290, 2003.

PIRES, E. Uma Visão Geral Sobre Antifeedants em Insetos. **RECEN-Revista Ciências Exatas e Naturais**, v.19, n. 1, p.56-67, 2017.

PORTO, M. F.; MILANEZ, B. **Eixos de desenvolvimento econômico e geração de conflitos socioambientais no Brasil**: desafios para a sustentabilidade e a justiça ambiental. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v.14, n.6, p. 1983-1994, 2009.

PREMALATHA, K.; NELSON, S. J.; VISHNUPRIYA, R.; BALAKRISHNAN, S.; SANTHANA KRISHNAN, V. P. Acaricidal activity of plant extracts on two spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 6, n.1, p. 1622-1625, 2018.

QUEIROZ, L.P. **Leguminosas da Caatinga**. Feira de Santana, Universidade Estadual de Feira de Santana, 2009.

RAYMOND, A.; CLOYD, C. L.; GALLE, S. R.; KEITH, N.A.; KALSCHEUR, KENNETH, E. Effect of Commercially Available Plant-Derived Essential Oil Products on Arthropod Pests. **Journal of Economic Entomology**, v.102, n. 4, p.567-1579, 2009.

READER, M. The business and economic impacts of pest infestation; London, 2015.

Reflora. Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2016. <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>> Acessado em: 15 de fevereiro de 2018.

REYGAERT, W.C. The antimicrobial possibilities of green tea. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 434, 2014.

RIBEIRO FILHO M. Resultados que alimentam o mundo. **Revista Política Agrícola**, v. 20, n.4, 2011.

RIBEIRO, R.D.; CARDOSO, D.B.O.S.; LIMA, H.C. A new species of *Hymenaea* (Leguminosae: Caesalpinioideae) with a revised identification key to the genus in the Brazilian Atlantic Forest. **Systematic Botany** 40(1): 151–156, 2015.

- ROCHA, J.C.S. Direito Ambiental, Meio Ambiente do Trabalho Rural e Agrotóxicos. In Revista de Direito Ambiental. São Paulo, RT, ano 10, abr. 1998, p. 106.
- ROCHA, R.B. O mapeamento genético no melhoramento de plantas. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.30, p.27-32, jan./jun. 2003.
- ROCKENBACH, I.I. **Compostos fenólicos, ácidos graxos e capacidade antioxidante do bagaço da vinificação de uvas tintas (*Vitis vinifera* L. e *Vitis labrusca* L.)**. 2008. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis, 2008
- RODRÍGUEZ-CARPENA, J.; MORCUENDE, D.; ANDRADE, M.J.; KYLLI, P.; RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN, M.; BORONAT, A. Elucidation of the activity in foods and biological systems. **Food Science Technology International**, v. 8, n.3, p. 121-37, jun., 2002.
- RODRIGUEZ-CONCEPCION, M.; BORONAT, A. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol.*, v.130, p.1079–1089, 2002.
- ROEL, A. R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**, Campo Grande, v. 1, n. 2, p. 43-50, 2001.
- ROJAS, A.,L; HERNANDEZ, R. PEREDA-MIRANDA, R. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. **J. Ethnopharmacol**, v. 35, p. 275–283, 1992.
- RUTLEDGE, P.J.; CHALLIS, G.L. Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters. **Nat. Rev. Micro.** 13(8), 509-523, 2015.
- SAATH, K.C.D.O.; FACHINELLO, A.L. Crescimento da demanda mundial de alimentos e restrições do fator terra no Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 56, n.2, p. 195-212, 2019.
- SALEM, MOHAMED Z.M. Bioactivity of essential oils extracted from Cupressus macrocarpa branchlets and Corymbia citriodora leaves grown in Egypt. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 18.1: 23, 2018.
- SANDIPAN, P. B., PATEL, R. K., FALDU, G. O., PATEL, D. M., & SOLANKI, B. G. (2018). Relationship of Bacterial Leaf Blight Disease of Cotton with Different Weather Parameters Under South Gujarat Condition of India. *Cercetari Agronomice in Moldova*, 51(1), 45-50.
- SANO, S.M.; FONSECA, C.E.L. Estabelecimento de progênies de jatobá (*Hymenaea spp*) em plantios puros no Cerrado. Planaltina: Embrapa Cerrados, (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 110), 2013.
- SANTANA, J.S., SARTORELLI, P., GUADAGNIN, R.C., MATSUO, A.L., FIGUEIREDO, C.R., SOARES, M.G., DA SILVA, A.M., LAGO, J.H.G. Essential oils from Schinusterebinthifolius leaves – chemical composition and in vitro cytotoxicity evaluation. **Pharm. Biol.** v. 50, p.1248–1253, 2012

SANTOS, A.F. Filogeografia de *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae) na região Neotropical / Amanda de Farias Santos- São José do Rio Preto, 2016, 80 p.: il, tabs.

SANTOS, D.R. Atividade inseticida de extratos e óleos essenciais de espécies do Gênero *Lippia* contra *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1775) e *Nasutitermes corniger* (Motschulsky, 1855) / Daiane Rodrigues dos Santos – Feira d Santana, 2017, 105 f.:il.

SATO, M.E.; A. RAGA; L.C.CERÁVOLO; A.C. ROSSI; M.R. POTENZA. 1994. Ácaros predadores em pomar cítrico de Presidente Prudente, Estado de São Paulo. **An. Soc. Entomol. Brasil**, v. 23, p. 435-441, 1994.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry** v. 30, p. 3875–3883, 1991.

SCHAFRANSKI, KATHLYN. **Extração e caracterização de compostos fenólicos de folhas de amoreira preta (*Morus nigra* L.) e encapsulamento em esferas de alginato**. 2019. 100f.; il. 30 cm. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2019.

SCHWARTZ, G. Jatoba— *Hymenaea courbaril*. **Exotic Fruits**, p. 257-261, 2018.

SEIFI, R., MOHARRAMIPOUR, S.; AYYARI, M. Acaricidal activity of different fractions of *Moringa peregrina* on two spotted spider mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Industrial Crops and Products**, v.125, p. 616–621, 2018.

SIAH, A.; MAGNIN-ROBERT, M.; RANDOUX, B.; CHOMA, C.; RIVIÈRE, C.; HALAMA, P.; REIGNAULT, P. Natural agents inducing plant resistance against pests and diseases. In **Natural Antimicrobial Agents**, Springer, Cham, p. 121-159, 2018.

SILVA, C. M. A. **Metabólitos de plantas do semi-árido Pernambucano-uma inovação no controle de fitopatógenos**. 2014. 109f.; il. 30cm. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2014.

SILVA, D. R., ROSALEN, P. L., FREIRES, I. A., SARDI, J. D. C. O., LIMA, R. F., LAZARINI, J. G.; COSTA, E. M. M. D. B. *Anadenanthera Colubrina* vell Brenan: anti-*Candida* and antibiofilm activities, toxicity and therapeutical action. **Brazilian oral research**, v. 33, 2019.

SILVA, J.M.C.; SOUZA, M.A.; BIEBER, A.G.D.; CARLOS, C.J. 2003, Aves da Caatinga: status, uso do habitat e sensibilidade. In: LEAL, I.R.;TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. (eds.). **Ecologia e conservação da Caatinga**. pp. 237-273. Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

SILVA, M.B.; MORANDI, M.A.B.; PAULA JÚNIOR, T.J.; VENZON, M.; FONSECA, M.C.M. Uso de princípios bioativos de plantas no controle de fitopatógenos e pragas. **Informe Agropecuário**, v. 31, n. 255, p. 70-77, 2010.

- SILVA, M.F.O.; COSTA, L.M. A indústria de defensivos agrícolas. Química, **Cadernos BNDES Setoria**, v. 35, p. 233-276, 2011.
- SILVA, M.L.C.; COSTA, R.S.; SANTANA, A.S.; KOBLITZ, M.G.B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2016.
- SIMÕES, C.M.O. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 5ª edição. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC: Porto Alegre/Florianópolis, 2010.
- SINDIVEG - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal, Disponível em: < <http://www.sindiveg.org.br/sindiveg.php>.> Acessado em: 05 de março de 2019.
- SIQUEIRA FILHO, J.A. **A Floradas caatingas do Rio São Francisco**: histórias e conservação. Rio de Janeiro: Editora Jakobson, 2012.
- SOMMERVILLE, C.; DANGL, J. Genomics: Plant Biology in 2010. **Science**, v.290, p.2077-8, 2017.
- SOTO, M.L.; FALQUÉ, E.; DOMÍNGUEZ, H. Relevance of Natural Phenolic from Grape and Derivative Products in the Formulation of Cosmetics. **Cosmetics**, v. 2, n. 3, p. 259-276, 2015.
- SOUJANYA, P.L.; SEKHAR, J.C.; KUMAR, P., SUNIL, N.; PRASAD, C.V.; MALLAVADHANI, U. V. Potentiality of botanical agents for the management of post harvest insects of maize: a review. **Journal of food science and technology**, v. 53, n. 5, p. 2169-2184, 2016.
- SOUZA, I.M.; FUNCH, L.S.; QUEIROZ, L.P. Morphological analyses suggest a new taxonomic circumscription for *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae). **PhytoKeys**, v.38, p. 101–18, 2014.
- 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.
- STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; TOLEDO, M.V.; PORTZ, R.L.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; PASCHOLATI, S.F. **A defesa vegetal contra fitopatógenos**. Scientia Agrária Paranaensis, v.10, n.1, p.18-46, 2011.
- STEENBERGEN, M. Thrips Advisor: Exploiting Thrips-Induced Defences to Combat Pests on Crops. **Journal of Experimental Botany**, 2018.
- STERN, J.L.; HAGERMAN A.E.; STEINBERG, P.D.; MASON, K. Phlorotannin-protein interactions. **J. Chem. Ecol.**, v. 78, p. 1887–1899, 1996
- STRANGE, R.N.; SCOTT, P.R. Plant disease: a threat to global food security. **Annu. Rev. Phytopathol.**, vl. 43, p. 83-116, 2005.
- STUBBLEBINE, W. H.; LANGENHEIM, J. H. Effects of *Hymenaea courbaril* leaf resin on the generalist herbivore *Spodoptera exigua* (beet armyworm). **Journal of Chemical Ecology**, v. 3, n. 6, p. 633-647, 1977.

SUCHAL, K.; MALIK, S.; GAMAD, N.; MALHOTRA, R. K.; GOYAL, S. N.; BHATIA, J.; ARYA, D. S. Kampeferol protects against oxidative stress and apoptotic damage in experimental model of isoproterenol-induced cardiac toxicity in rats.

Phytomedicine, v. 23, n.12, p.1401-1408, 2016.

SUZUKI, M.; IWASAKI, A.; SUENAGA, K.; KATO-NOGUCHI, H. Phytotoxic activity of crop residues from Burdock and an active substance. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, p.1-6, 2019.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. Porto Alegre: **Artmed**, p.719, 2004.

TANIGUCHI, M.; KUBO, I. Ethnobotanical drug discovery based on medicine men's trials in the African savanna: screening of east African plants for antimicrobial activity II. **J. Nat. Prod.**, v. 56, p. 1539–1546, 1993.

TÁVORA, F.T.P.K. Pan Proteome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Isolates Contrasting in Virulence. **Proteomics**, v. 19, n.82, 2019.

TAWFIKE, A.F.; ROMLI, M.; CLEMENTS, C.; ABBOTT, G.; YOUNG, L.; SCHUMACHER, M.; EDRADA-EBEL, R. Isolation of anticancer and anti-trypanosome secondary metabolites from the endophytic fungus *Aspergillus flocculus* via bioactivity guided isolation and MS based metabolomics. **Journal of Chromatography B**, n. 1106, p. 71-83, 2019.

TODA, M.; OKUBO, S.; IKIGAI, H.; SUZUKI T.; SUZUKI, Y.; SHIMAMURA, T. The protective activity of tea catechins against experimental infection by *Vibrio cholerae* O1. **Microbiol. Immunol.**, v. 36, p. 999–1001, 1992.

UHLENBROCK, L., REINHARD D.; OCHEN S. "Process Engineering Accelerating an Economic Industrialization Towards a Bio-Based World." **Molecules** v. 24, n.10, p. 1853, 2019.

UHLENBROCK, L.; SIXT, M.; TEGTMEIER, M.; SCHULZ, H.; HAGELS, H.; DITZ, R.; STRUBE, J. Natural Products Extraction of the Future—Sustainable Manufacturing Solutions for Societal Needs. **Processes**, v. 6, p. 177-188, 2018.

UNESCO. International Symposium on 'New Directions in Urban Water Management, 2015. Disponível em:

<http://typo38.unesco.org/index.php?urban_water_07>. Acessado em: 02 de julho de 2019.

VAN GROENIGEN, J.W.; HUYGENS, D.; BOECKS, P.; KUYPER, T.W.; LUBBERS, I.M.; RUTTING, T.; GROFFMAN, P.M.; **The soil N cycle**: new insights and key challenges Soil, 1, pp. 235-256, 2015.

VARO, A.; MULERO-APARICIO, A.; ADEM, M., ROCA, L. F.; RAYA-ORTEGA, M. C.; LÓPEZ-ESCUADERO, F. J.; TRAPERO, A. Screening water extracts and essential oils from Mediterranean plants against *Verticillium dahliae* in olive. **Crop protection**, v. 92, p. 168-175, 2017.

VAZ, P.A.B. **O Direito Ambiental e os agrotóxicos**: responsabilidade civil, penal e administrativa. Porto Alegre: Livraria do Advogado Ed., 2016.

VENTUROSIO, L.R.; BACCHI, L.M.A.; GAVASSONI, W.L.; CONUS, L.A.; PONTIM, C.A.; BERGAMIN, A.C. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 1, p. 18-23, 2011.

VERPOORTE, R.; HEIJDEN, R.V.D.; HOOPEN, H.J.G.; MEMELINK, J. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. **Biotechnology Letters**, v. 21, n. 4, p.467-479, 2011.

VIEGAS JÚNIOR C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.

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

WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. Induced resistance for plant defence – a sustainable approach to crop protection. **Oxford: Blackwell** ,p. 258, 2007.

WANG, G.; KONG, J.; CUI, D.; ZHAO, H.; NIU, Y.; XU, M.; WANG, W. Resistance against *Ralstonia solanacearum* in tomato depends on the methionine cycle and the γ -aminobutyric acid metabolic pathway. **The Plant Journal**, v. 97, n. 6, p.1032-1047, 2019.

WEBER, C.R.; SOARES, C.M.L.; LOPES, A.B.D.; SILVA, T.S.; NASCIMENTO, M.S.; XIMENES, E.C.P.A. *Anadenanthera colubrina*: um estudo do potencial terapêutico. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 92, p.235-244, 2011.

WEISSMAN, K.J. Genetic engineering of modular PKSs: from combinatorial biosynthesis to synthetic biology. **Nat. Prod.**, v. 33, n. 2, p. 203-230, 2016.

WIENS JJ, LAPOINT RT, WHITEMAN NK. Herbivory increases diversification across insect clades. **Nat. Commun**, v. 6, p.8370, 2015.

WIESBROOK, M. L. Natural indeed: Are natural insecticides safer and better than conventional insecticides? **Illinois Pesticide Review**, Urbana, v. 17, n. 3, 2004.

WINTER, J.M., TANG, Y. Synthetic biological approaches to natural product biosynthesis. **Curr. Opin. Biot.**, v. 23, n. 5, p.736-743, 2012.

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

YANG, Y.; CHEN, Y.; CHEN, F.; YU, Y.; BI, C. Tea polyphenol is a potential antifungal agent for the control of obligate biotrophic fungus in plants. **Journal of Phytopathology**, v.165, n 7-8, p. 547-553, 2017.

YANG, Y.; ZHANG, T. Antimicrobial activities of tea polyphenol on phytopathogens: A review. **Molecules**, v. 24, n. 4, p. 816, 2019.

YOSHIKAWA, M.E.; HARADA, Y.; NAITOH, K.; INOUE, H.; MATSUDA, H.; SHIMODA, J.; YAMAHARA, N.M. Development of bioactive functions in *Hydrangeae dulcis folium*. III. On the antiallergic and antimicrobial principles of *Hydrangeae dulcis*

folium. (1) Thunberginol A, B and F. **Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)**, v. 42, p. 2225–2230, 1994.

YU, X.; LV, Z.; CHEN, J.; XU, H.; ZHENG, X.; CHEN, L.; SHENTU, X. Review on research and development of botanical pesticides in China. **Acta Agriculturae Zhejiangensis**, v.17, n.1, p. 42-48, 2005.

YUAN L, GROTEWOLD E. Metabolic engineering to enhance the value of plants as green factories. **Metab. Eng.** 27:83–91, 2015.

ZAIO, Y.P.; GATTI, G.; PONCE, A.A.; SAAVEDRA LARRALDE, N.A.; MARTINEZ, M.J.; ZUNINO, M.P.; ZYGADLO, J.A. Cinnamaldehyde and related phenylpropanoids, natural repellents, and insecticides against *Sitophilus zeamais* (Motsch.). A chemical structure-bioactivity relationship. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 15, p. 5822-5831, 2018.

ZENGERER, V.; SCHMID, M.; BIERI, M.; MÜLLER, D. C.; REMUS-EMSERMANN, M. N. P.; AHRENS, C. H. *Pseudomonas orientalis* F9: a potent antagonist against phytopathogens with phytotoxic effect in the apple flower. **Front. Microbiol.**, v. 9, p.145, 2018.

ZHANG, H.; BOGHIGIAN, B.A.; ARMANDO, J.; PFEIFER, B.A. Methods and options for the heterologous production of complex natural products. **Nat. Prod.**, v. 28, n.1, 125-151, 2011.

ZHANG, H; TSAO, R. Polifenóis alimentares, estresse oxidativo e efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios. **Curr. Opin. Food Sci.**, v. 8, p. 33-42, 2016.

ZHAO, H.; MEDEMA, M.H. Standardization for natural product synthetic biology. **Nat. Prod. Rep.** 33(8), 920-924, 2016.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. Flavonoides. In: SIMÕES, C.M.O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC p.577-614, 2004.

**APÊNDICE A – CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL ACARICIDA E INSETICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Hymenaea courbaril L. var. *courbaril* SOBRE O ÁCARO-RAJADO E O
GORGULHO DO MILHO.**

Manuscrito publicado no Periódico: Journal of Environmental Analysis and Progress-JEAP

Publicado em outubro de 2018

Qualis: B1



ISSN: 2525-815X

Journal of Environmental Analysis and Progress

Journal homepage: www.jeap.ufrpe.br/

10.24221/jeap.3.4.2018.2061.417-428



Caracterização fitoquímica e avaliação do potencial acaricida e inseticida do óleo essencial de *Hymenaea courbaril* L. var. *courbaril* sobre o ácaro-rajado e o gorgulho do milho

Phytochemical characterization and evaluation of the acaricide and insecticidal potential of the *Hymenaea courbaril* L. var. *courbaril* essential oil on the two-spotted spider mite and maize weevil

Paula Fernanda Figueiredo das Mercês^a, Cibele Maria Alves da Silva Bessa^a, Carolina Barbosa Malafaia^b, Cláudio Augusto Gomes da Câmara^c, Milena Martins Correia da Silva^c, Patrícia Cristina Bezerra-Silva^a, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro^a, Thiago Henrique Napoleão^a, Maria Tereza dos Santos Correia^a, Márcia Vanusa da Silva^a, Maria Luiza Vilela Oliva^d

^a Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Departamento de Bioquímica, Av. Professor Moraes Rego, n. 1235, Recife-PE, Brasil. CEP: 50.670-901. *Autor para Correspondência: paulaanandaa@hotmail.com.

^b Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste-CETENE, Av. Prof. Luís Freire, 01, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil. CEP: 50.740-540.

^c Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Química, Laboratório de Produtos Naturais Bioativos, Recife, Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, Brasil. CEP 52.171-900.

^d Universidade Federal de São Paulo UNIFESP, Departamento de Bioquímica, Rua 3 de Maio, n. 100, São Paulo, São Paulo, Brasil. CEP: 04021-001.

ARTICLE INFO

Recebido 25 Jul 2018

Aceito 03 Out 2018

Publicado 18 Out 2018

ABSTRACT

The insecticidal properties of essential oils are generally recognized over the centuries and have been confirmed scientifically in recent decades. Such products can be used in agriculture as an alternative for pest control. The objective of this work was to evaluate the phytochemical composition of the essential oil of *Hymenaea courbaril* var. *courbaril* and its effects the acaricide and insecticide. The essential oil derived from the leaves of *Hymenaea courbaril* L. var. *courbaril* was obtained by steam drag hydrodistillation and phytochemically characterized by gas chromatography/mass spectrometry; its acaricide and insecticide potential were evaluated against *Tetranychus urticae* and *Sitophilus zeamais*, respectively, plagues occurring in a wide variety of economically important crops throughout the world. After GC/MS analysis, 36 compounds were identified, being 46.42% of monoterpenes and 51.41% of sesquiterpenes. The insecticidal bioassays evaluated the interference of the essential oil in the nutritional physiology of the corn weevil and in the fumigation process of the mite. Assays indicated that the essential oil caused a significant mortality, promoting physiological damage to *S. zeamais*. The LC₅₀ value for *T. urticae* was 35.57 µL.mL⁻¹ of air; in addition, it was also observed that the oviposition was negatively affected by the essential oil. The essential oil of *H. courbaril* demonstrated to be a potential control for pests affecting metabolism and reproduction of both tested plague species.

Keywords: Jatobá, *Sitophilus zeamais*, *Tetranychus urticae*, opposition, mortality.

RESUMO

As propriedades inseticidas dos óleos essenciais são geralmente reconhecidas ao longo dos séculos e confirmadas cientificamente nas últimas décadas. Tais produtos podem ser usados na agricultura como uma alternativa para o controle de pragas. O objetivo deste trabalho foi avaliar e identificar a composição fitoquímica do óleo essencial de *Hymenaea courbaril* var. *courbaril* e os efeitos acaricida e inseticida. O óleo essencial derivado das folhas de *Hymenaea courbaril* L. var. *courbaril* foi

obtido por hidrodestilação com arraste a vapor e caracterizado fitoquimicamente por cromatografia gasosa/espectrometria de massa; seu potencial acaricida e inseticida foi avaliado contra *Tetranychus urticae* e *Sitophilus zeamais*, respectivamente, pragas que ocorrem em uma ampla variedade de culturas economicamente importantes em todo o mundo. Após a análise por CG/EM, foram identificados 36 compostos, sendo 46,42% dos monoterpenos e 51,41% dos sesquiterpenos. Os bioensaios inseticidas avaliaram a interferência do óleo essencial na fisiologia nutricional do gorgulho e no processo de fumigação do ácaro. Os ensaios indicaram que o óleo essencial causou uma mortalidade significativa, promovendo danos fisiológicos ao *S. zeamais*. O valor de CL_{50} para *T. urticae* foi de 35,57 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de ar; além disso, também foi observado que a oviposição foi afetada negativamente pelo óleo essencial. O óleo essencial de *H. courbaril* demonstrou ser um potencial controle de pragas por afetar o metabolismo e a reprodução de ambas as espécies de praga testadas.

Palavras-Chave: Jatobá, *Sitophilus zeamais*, *Tetranychus urticae*, oviposição, mortalidade.

Introdução

O ácaro rajado (*Tetranychus urticae* Koch) e o gorgulho de milho (*Sitophilus zeamais* Motschulsky) são considerados pragas artrópodes economicamente importantes no mundo, pois causam perdas no campo e no armazenamento dos grãos (Arena et al., 2017; Pavela et al., 2016). O ácaro-rajado se alimenta da seiva, isso causa o aparecimento de manchas cloróticas e a morte foliar e consequentemente diminuição da produção (Araújo Júnior et al., 2010). O gorgulho do milho infesta grãos de maior importância mundialmente, como o milho, e ainda é capaz de se alimentar de outros produtos como pêssegos, maçã, uva, marmelo e ameixa, além de produtos processados como macarrão e biscoitos (Botton et al., 2005; Fazolin et al., 2010).

Atualmente o controle destas pragas da agricultura é feito através do emprego de inseticidas convencionais, que trazem associados efeitos negativos como afetar organismos não alvos (Restello et al., 2009), diminuição da produtividade (Mazzoleni & Oliveira, 2010) e contaminação ambiental e dos alimentos e afeta também a saúde humana (Gnankiné & Bassolé, 2017). Visando sanar esses problemas associados ao combate de insetos na agricultura, muitos estudos vêm sendo desenvolvidos com vegetais, na busca de biomoléculas capazes de promover tal controle (Araújo Júnior et al., 2010; Kamanula et al., 2017; Pavela & Sedlák, 2018).

Sabe-se que as plantas produzem diversos compostos orgânicos, referidos como metabólitos secundários ou produtos naturais, que naturalmente desempenham um papel fundamental nas interações de defesa contra predadores e patógenos. Muitos destes apresentam atividades biológicas e têm sido utilizados na indústria farmacêutica e agroquímica (Pavarini et al., 2012). Entre os produtos alternativos para o combate de insetos-praga da agricultura, os óleos essenciais têm sido citados como eficazes no

combate de diversas pragas (Arena et al., 2017; Kamanula et al., 2017; Pavela & Sedlák, 2018). Estes apresentam uma composição complexa, com centenas de biomoléculas com diversas aplicações, mas só recentemente têm sido comercializados para o controle de pragas (Isman et al., 2011). Nas últimas décadas, têm sido amplamente investigados para o manejo integrado de várias pragas, ocupando um lugar de destaque na busca por alternativas aos pesticidas sintéticos (Coitinho et al., 2011; Siegwart et al., 2015).

Espécies do gênero *Hymenaea*, conhecidas popularmente como jatobá e jatobá do cerrado, estão entre os mais ricos da família das leguminosas como fonte de compostos bioativos (Orsi et al., 2012) e são relatadas como ricas em terpenóides (óleo essencial) e alcalóides (Dias et al., 2013). *Hymenaea courbaril* é utilizada pela medicina popular em diversas aplicações como no tratamento enfermidades nos tratos respiratório e gástrico, cicatrizante, anti-inflamatório anti-reumático e uricosúrico entre outros (Chaves, 2012; Heinrich, 1992; Cáceres et al., 1991; Milliken, 1997). Diversos estudos confirmaram sua caracterização bioquímica, farmacológica e biológica, como atividades antifúngica, antimicrobiana, antioxidante, larvicida e moluscicida (Buckeridge et al., 1997; Abdel-Kader et al., 2002; Imai et al., 2008; Suzuki et al., 2007; Coe, 2016). O óleo essencial do jatobá foi descrito como larvicida para *Aedes aegypti* (Coe, 2016) e tem sido amplamente utilizado para aplicações agrícolas, como bactericidas, fungicidas, antiparasitárias e inseticidas, assim como nas indústrias farmacêutica, cosmética, medicinal e alimentícia (Bakkali et al., 2008; Silva et al., 2015; Voon et al., 2012).

Apesar da grande quantidade de estudos relacionados à atividade biológica de *H. courbaril*, não existem até o momento, dados na literatura sobre seu potencial, inseticida e acaricida, revelando, dessa maneira, a importância

do presente estudo. Diante do exposto, o objetivo foi caracterizar fitoquimicamente o óleo essencial extraído das folhas de jatobá (*Hymenaea courbaril* L. var. *courbaril*) e avaliar o potencial inseticida contra o ácaro rajado e o gorgulho do milho.

Material e Métodos

Coleta do material botânico

Folhas de jatobá foram coletadas no Parque Nacional do Catimbau (Latitude: 8°32'47.7"; Longitude: 37°15'0.76"), em fevereiro de 2016, armazenadas em sacos plásticos e mantidas, sob refrigeração, até o momento da extração do óleo essencial. Um exemplar foi identificado e tombado pelo Herbário do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), sob voucher IPA-80348.

Extração do óleo essencial

O óleo essencial foi extraído a partir de folhas frescas (300 g) trituradas e submetidas à hidrodestilação 1:10 (m/v), em aparelho tipo Clevenger por 5 h. O óleo foi cuidadosamente coletado com pipeta Pasteur, utilizando sulfato de sódio anidro para remoção de toda a água do óleo e armazenado em recipientes âmbar, selados à 4°C. O rendimento (m.m⁻¹) dos óleos foi calculado com base no peso do material fresco.

Análises por Cromatografia Gasosa (CG) acoplada à Espectrometria de Massas (EM)

O óleo essencial foi analisado em cromatógrafo gasoso Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA), 5975C series, com sistema de detecção quadrupolo, equipado com coluna apolar DB-5 9Agilent J&W, 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm. Foram injetadas no cromatógrafo gasoso, acoplado com espectrômetro de massa, alíquotas de 1 µL em split 1:50 do óleo essencial com concentrações variando entre 2000 a 3000 ppm. Posteriormente, injetou-se 1 µL em split (1:50) da mistura de padrões de hidrocarbonetos: C9-C30. Por fim, injetou-se a mistura do óleo essencial e a mistura de padrões de hidrocarbonetos, 1 µL (0,2 µL de alcanos e 0,8 µL do óleo) sob o modo splitless. A temperatura do CG foi mantida em 60°C por 3 min, depois foi aumentando de 2,5°C.min⁻¹ até 240°C e mantida por 10 min nesta temperatura. O fluxo de hélio foi mantido em pressão constante de 100 kPa. A interface do EM foi definida em 200°C e injetor 250°C e os espectros de massa registrados em 70 eV (em modo EI) com uma velocidade de escaneamento de 0,5 scan-s de m/z 20-350. A partir da análise dos tempos de retenção dos compostos presentes na amostra do óleo essencial, dos padrões de

hidrocarboneto e a combinação do óleo essencial com a mistura de padrões foram calculados os índices de retenção para cada componente do óleo, segundo a equação de Van Den Dool & Kratz (1963). Os compostos foram identificados a partir de comparação de seus espectros de massa e tempos de retenção àqueles de padrões autênticos disponíveis nas bibliotecas de referência MassFinder 4, NIST08 e Wiley Registry™ 9th Edition, integradas ao software Agilent MSD Productivity ChemStation (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA). As amostras de óleo foram quantificadas em cromatografia gasosa com detector de ionização de chamas (CG-DIC), nas mesmas condições do CG-EM, em triplicata para cálculo de desvio padrão. Isso foi utilizado para determinar a proporção dos compostos no óleo.

Insetos

Criação do *Tetranychus urticae*

O ácaro rajado utilizado foi obtido da criação mantida em plantas de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformes* L.) do Laboratório de Acarologia Agrícola do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Brasil). Os insetos foram mantidos em recipientes de vidro, fechados com tecido fino (tipo tule) para permitir as trocas gasosas, a temperatura de 25 ± 1°C, com 65 ± 3% de umidade relativa e fotoperíodo de 12h:12h claro:escuro. Dez fêmeas adultas foram liberadas em início de postura. Foram utilizadas quatro repetições por tratamento.

Criação do *Sitophilus zeamais*

Colônias de Gorgulho do milho foram obtidas do Laboratório de Bioquímica de Proteínas do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco (Recife, Brasil) e mantidas em recipientes de vidro cobertos com voal, à temperatura de 28 ± 2°C, com 70% de umidade relativa e fotoperíodo de 12:12h claro:escuro. A dieta consistiu em grãos de milho selecionados de acordo com a integridade, condições sanitárias, tamanho, e ausência de contaminação por insetos. Insetos adultos (30 a 60 dias de idade) foram utilizados nos experimentos.

Teste de Contato Residual – Fumigação

O teste de fumigação foi feito, de acordo com Arena et al. (2017), com modificações para avaliar a toxicidade de contato residual do óleo essencial de jatobá contra o ácaro rajado. As concentrações utilizadas variaram de 2 a 100 µL.mL⁻¹, sendo as soluções preparadas através da diluição dos óleos em metanol. Três discos foliares de feijão-de-porco (2,5 cm) foram imersos

nas soluções previamente preparadas. Após secagem os discos foram condicionados de forma equidistantes em placas de Petri contendo um disco de papel de filtro saturado com água para evitar a fuga dos ácaros e manter a turgidez das folhas. Em cada disco de folha foram colocadas 10 fêmeas adultas e a mortalidade foi determinada após 24 h de exposição. Os ácaros foram considerados mortos quando incapazes de caminhar uma distância superior ao comprimento do seu corpo após um leve toque com a extremidade de um pincel de cerdas finas. Para avaliar a oviposição após a exposição ao óleo, quantificou-se o número de ovos dos tratamentos e do controle. Os discos controle foram tratados com metanol (controle negativo) ou Eugenol (controle positivo). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados foram analisados pelo modelo de Probit através do Software POLO-PC para a determinação dos valores da CL_{50} , com intervalos de confiança a 95%, validados através do programa estatístico SAS e gerados na forma de gráfico através do software SigmaPlot.

Avaliação da toxicidade por ingestão do óleo essencial

Os testes foram realizados de acordo com Napoleão et al. (2013). Cada bioensaio consistiu em uma placa de Petri contendo cinco discos de uma mistura de farinha de trigo com o óleo essencial das folhas do jatobá. Foram avaliadas concentrações de 20 a 100 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. Para preparação dos discos, o óleo foi misturado a 2 g de farinha autoclavada e em seguida, a mistura foi solubilizada em água para volume final de 5mL. Após homogeneização por 5 min, 5 alíquotas de 200 μL foram dispostos em placas de Petri de forma equidistante e mantidas em estufa a 56°C por 24 h e, em seguida, a massa dos discos foi registrada.

Grupos de 20 insetos adultos de *S. zeamais* com peso conhecido foram transferidos para cada placa. Os bioensaios foram mantidos a 28 $\pm$ 2°C e realizados em triplicata. Tween®80 a 1% foi utilizado como controle negativo. Após

sete dias de experimento, foi determinada a taxa de mortalidade, observando-se a motilidade dos insetos a olho nu e foram aferidos os pesos dos discos da dieta e dos insetos, para determinação do índice de deterência.

Bioensaio

O índice de deterência 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 ($20\% < IDA \leq 50\%$), deterrente moderado ($50\% < IDA \leq 70\%$) ou deterrente forte ($IDA \geq 70\%$) (Procópio et al., 2015).

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

Resultados

O rendimento do óleo essencial extraído das folhas do jatobá foi de 0,53% (m.m^{-1}), mesmo apresentou cor esverdeada e forte aroma.

As análises cromatográficas realizadas em CG/EM permitiram a detecção de 36 compostos, dos quais 26 foram identificados, representando 76,03% dos constituintes do óleo. Essa análise revelou o óxido de cariofileno e β -cariofileno como compostos majoritários no óleo essencial desta espécie, 20,63 $\pm$ 0,18% e 16,78 $\pm$ 0,54%, respectivamente. O índice de retenção e a percentagem de compostos detectados constam na Tabela 1.

Tabela 1. Composição química do óleo essencial de folhas de *Hymenaea courbaril* L. var. *courbaril*.

Nº	Composto ^a	Índice de retenção		Total de óleo (%)
		Calculado ^b	Literatura ^c	
1	α -Cubebeno	1351	1345	0,86 $\pm$ 0,04
2	α -Copaeno	1377	1374	2,41 $\pm$ 0,11
3	β -Elemeno	1393	1389	1,28 $\pm$ 0,06
4	Cipereno	1401	1398	2,74 $\pm$ 0,11
5	β -Cariofileno	1421	1417	16,78 $\pm$ 0,054

6	β -Copaeno	1431	1430	0,30 $\pm$ 0,01
7	<i>trans</i> - α -Bergamoteno	1437	1432	0,88 $\pm$ 0,03
8	Aromadendreno	1441	1439	0,45 $\pm$ 0,02
9	α -Humuleno	1456	1452	2,54 $\pm$ 0,03
10	γ -Muuroloeno	1479	1478	2,63 $\pm$ 0,07
11	Germacreno D	1483	1484	3,94 $\pm$ 0,04
12	β -Selineno	1488	1489	3,66 $\pm$ 0,08
13	α - Selineno	1497	1498	2,18 $\pm$ 0,04
14	<i>trans</i> - β -Guaieeno	1503	1502	1,26 $\pm$ 0,02
15	γ -Cadineno	1516	1513	1,11 $\pm$ 0,03
16	δ -Cadineno	1525	1522	2,99 $\pm$ 0,05
17	α -Calacoreno	1545	1544	0,31 $\pm$ 0,01
18	Sesquiterpenos não identificados	1555	1542	0,94 $\pm$ 0,04
19	<i>trans</i> - Nerolidol	1565	1561	0,87 $\pm$ 0,08
20	Sesquiterpenos não identificados	1569	15,48	0,59 $\pm$ 0,01
21	Sesquiterpenos não identificados	1580	1584	4,53 $\pm$ 0,06
22	óxido de cariofileno	1586	1582	20,63 $\pm$ 0,18
23	CNI	1591	-	0,64 $\pm$ 0,02
24	Salvial-4(14)-em-1-ano	1596	1594	0,69 $\pm$ 0,02
25	CNI	1607	-	0,35 $\pm$ 0,03
26	epóxido de Humuleno II	1612	1608	2,76 $\pm$ 0,10
27	Sesquiterpenos não identificados	1628	1620	13,46 $\pm$ 0,34
28	Sesquiterpenos não identificados	1631	1625	1,32 $\pm$ 0,04
29	Sesquiterpenos não identificados	1634	1628	0,87 $\pm$ 0,07
30	Cariofila-4(12),8(13)-dien-5-ol	1639	1639	0,62 $\pm$ 0,09
31	τ -Muurolol	1645	1640	0,55 $\pm$ 0,11
32	α -Cadinol	1657	1652	1,22 $\pm$ 0,13
33	CNI	1660	-	0,75 $\pm$ 0,05
34	Cariofileno <14-hydroxy-9-epi(E)->	1673	1668	1,89 $\pm$ 0,15
35	Eudesma-4(15),7-dien-1-ol	1689	1687	0,49 $\pm$ 0,07
36	CNI	1968	-	0,54 $\pm$ 0,06
	Monoterpenos			46,32
	Sesquiterpenos			51,41
	Compostos não identificados (CNI)			2,27
Total				100

^a Constituintes listados por ordem de eluição em uma coluna não-polar DB-5; ^b Índices de retenção (IR) calculados a partir dos tempos de retenção em relação aos de uma série de n-alcanos C9-C30 em uma coluna capilar DB-5 de 60 m; ^c Valores retirados de Adams (2009).

Em 24 horas de exposição foi detectada toxicidade do óleo contra o ácaro rajado, com CL₅₀ em uma concentração de 35,27 μ L.mL⁻¹ de ar (Tabela 2). O óleo das folhas do jatobá mostrou-se com eficiência significativa, pois a mesma aumentou diretamente com o aumento da

concentração e do tempo de exposição, caracterizando o efeito fumigante. Resultados semelhantes foram encontrados por Aslan et al. (2004) com óleos essenciais de outras espécies do gênero *Hymenaeae*.

Tabela 2. Toxicidade por contato residual (CL₅₀ em μ L.mL⁻¹) do óleo essencial de *Hymenaea courbaril* L. var. *courbaril* e eugenol sobre *Tetranychus urticae*. n = número de indivíduos; GL = grau de liberdade; χ^2 = quiquadrado; RT = razão de toxicidade.

Parâmetros	<i>Hymenaea courbaril</i>	Eugenol
------------	---------------------------	---------

n	540	540
GL	4	4
Inclinação da reta	3,51 (3,19 - 3,83)	9,14 (7,90 - 10,38)
CL ₅₀ (IC 95%)	35,57 (31,44 - 39,88) ^a	26,26 (22,11 - 28,62) ^b
χ^2	2,91	7,04
RT (IC 95%)	1,36 (1,09 - 1,69)	-

O óleo do jatobá foi tóxico ao *T. urticae* por contato residual, causando respostas fisiológicas e comportamentais, pois houve

aumento da mortalidade e diminuição da oviposição à medida que as concentrações eram aumentadas (Figura 1).

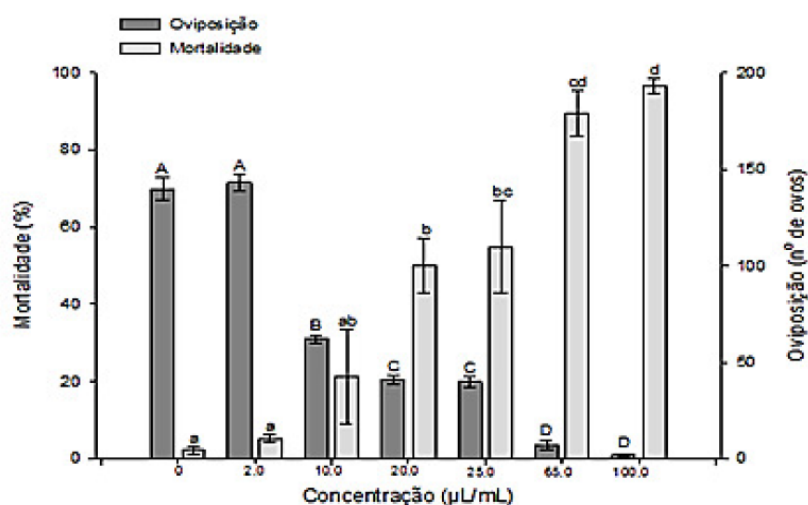


Figura 1. Mortalidade e oviposição de *Tetranychus urticae* em discos de folhas pulverizados com diferentes concentrações do óleo das folhas de *Hymenaea courbaril* L. var. *courbaril*.

É possível observar que sob a concentração de 10 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ ocorreu redução de 40% na fecundidade. As concentrações de 20 e 25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ reduziram a fecundidade em 26,8 e 18,4%, respectivamente. Na maior concentração de 100 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, a mortalidade chegou a 100%. Verificou-se a toxicidade do óleo para essa praga, onde foi possível inferir que desde a menor concentração testada houve redução na população. A curva de concentração-mortalidade do ácaro rajado exposta ao óleo essencial do jatobá, foi utilizada para definir a CL₅₀ no valor de 43,7 $\mu\text{L.mL}^{-1}$.

O óleo essencial do jatobá aumentou significativamente a mortalidade de *S. zeamais* em comparação com o controle, sendo as concentrações acima de 50% em uma concentração de 60 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (Figura 2A).

As taxas de consumo relativo (Figura 2B) verificadas para *S. zeamais* não foram diferentes em relação ao controle indicando que não houve rejeição da dieta pré e pós-ingestão, pois os valores da taxa de consumo relativo (TCR) não foram significativamente alterados. Houve efeito

deterrente apenas na concentração de 60 $\mu\text{L.g}^{-1}$ indicando que o óleo essencial apresentou um fraco efeito na deterrencia alimentar, indicando que a dieta foi consumida pelos insetos. Contudo, a ingestão da dieta contendo o óleo essencial provocou uma perda significativa de peso do inseto, observada através da taxa de ganho de biomassa relativa nos tratamentos com o óleo, sendo significativamente mais baixo do que o controle (Figura 2C). Esses resultados indicam que a ingestão dos discos contendo o óleo induziu distúrbios nutricionais, em todas as concentrações testadas.

Os valores da eficiência de conversão do alimento ingerido (ECAI), que demonstram quanto do alimento foi ingerido e convertido em biomassa do inseto, apresentaram valores negativos (Figura 2D) nos tratamentos em todas as concentrações testadas indicando que a incorporação do mesmo à dieta levou a um desbalanço na fisiologia do inseto, mostrando que o alimento ingerido foi insuficiente para contrabalancear os prejuízos causados no metabolismo, pela presença do óleo na dieta. Esse

resultado pode ser evidenciado no controle, onde o alimento ingerido sem a presença do óleo permitiu um ECAI de 12,02%, porém esse parâmetro diminuiu na primeira concentração

testada para -13,5 a -30,5% indicando que o alimento ingerido foi insuficiente para contrabalancear o prejuízo causado pela presença do óleo na dieta.

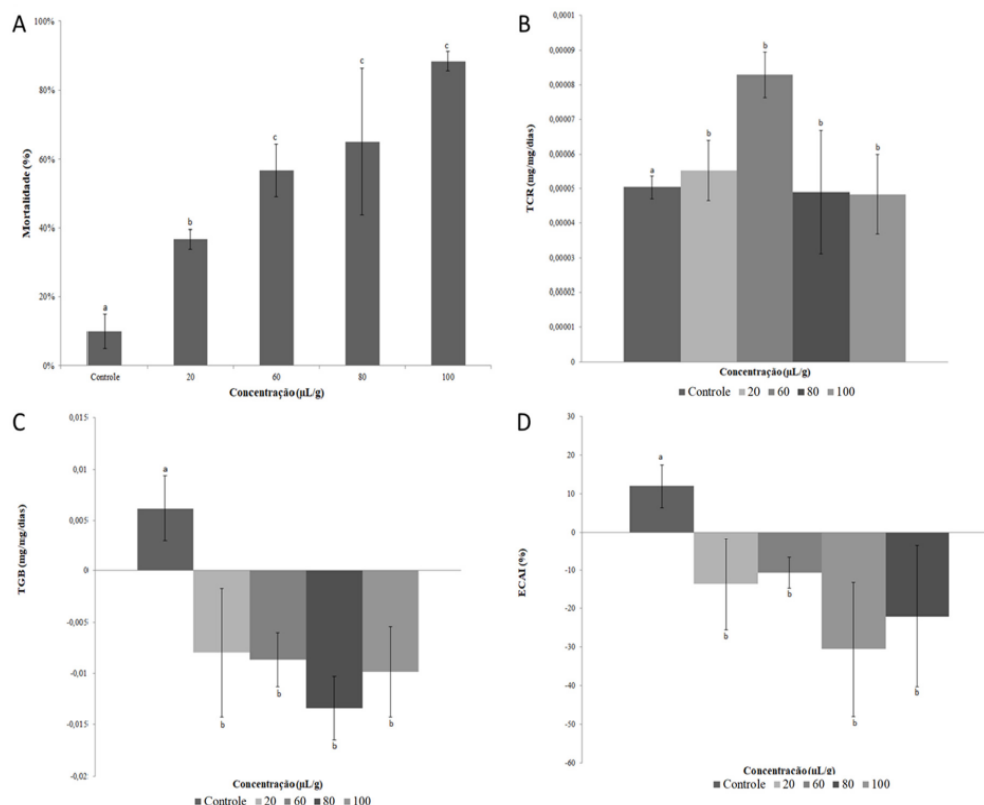


Figura 2. Parâmetros nutricionais de adultos de *Sitophilus zeamais* criados em dietas artificiais. A. Mortalidade; B. taxa de consumo relativo indica a quantidade de alimentos consumido em $\mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$ por mg de peso corporal por dia de insetos; C. ganho de biomassa em relação taxa indica a quantidade de biomassa obtida em todos os dias por $\mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$ de corpo inicial peso; D. eficiência de conversão do alimento ingerido (%) indica a quantidade de alimentos ingeridos pelos insetos e incorporada como biomassa. Letras diferentes indicam $p < 0,05$.

Discussão

O gênero *Hymeneae* têm oferecido diversas moléculas bioativas, cerca de 130 compostos foram identificados a partir de extratos brutos, óleos essenciais e derivados. Como observado em *H. stigonocarpa*, *H. palustris*, *H. intermedia* e *H. courbaril*, estas espécies são descritas na literatura como apresentando atividade antimicrobiana contra *S. aureus* (Rodrigues et al., 2012), *Enterococcus faecalis* e *Neisseria gonorrhoeae* (Pettit et al., 2003), *Mycobacterium tuberculosis* (Oliveira, 2011), *Cladosporium cucumerinum*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (Cáceres et al., 1991). *Hymeneae martiana*, utilizada no tratamento de inflamações e reumatismo, se destacou como a representante mais importante do grupo de plantas usadas no

tratamento de doenças dos tecidos esquelético, muscular e conjuntivo (Oliveira et al., 2012).

Os óleos essenciais de várias espécies do gênero *Hymeneae* têm sido caracterizados como misturas complexas, cuja composição predominante é de compostos pertencentes às classes de monoterpenos e sesquiterpenos (Meccia et al., 2000). Os terpenos abrangem uma grande variedade de substâncias de origem vegetal e sua importância ecológica como defensivos de plantas encontram-se bem estabelecida. Dentro desse grupo os sesquiterpenos, β -cariofileno e óxido de cariofileno são compostos encontrados em diversos óleos essenciais, e ambos possuem interessantes propriedades biológicas (Harborne, 1993), dentre elas, a toxicidade frente a diferentes espécies de insetos. Lee et al. (2008) observaram que β -cariofileno é altamente tóxico para diversos

insetos via fumigante e contato residual. Esse fato pode explicar a ação tóxica do óleo essencial do jatobá, causando efeito negativo na mortalidade e oviposição sobre os ácaros que sobreviveram.

Entretanto, a composição química se identificou 46,32% de monoterpenose o efeito acaricida do óleo também pôde ser atribuído a estes, uma vez que inibem a enzima acetilcolinesterase e o citocromo P450 monooxigenase-dependente e agem no sistema nervoso octopaminérgico (Ryan & Byrne, 1988; De-Oliveira et al., 1997). Estes eventos contribuem para que ocorra redução populacional da praga na próxima geração. Pontes et al. (2007) avaliou o óleo essencial do fruto de *Protium heptaphyllum* (Burseraceae) que também causou repelência do ácaro-rajado, reduzindo a alimentação e, consequentemente, a fecundidade.

Estudos sobre os efeitos letais dos óleos essenciais são de grande relevância nos programas de controle de pragas, pois as concentrações podem influenciar de modo positivo ou negativo o desempenho das espécies nos agroecossistemas, como por exemplo, no comportamento sexual alimentar, crescimento populacional, reprodução e longevidade (Foerster & Nakama, 2002).

Os inseticidas botânicos contêm inúmeros compostos biologicamente ativos capazes de interações diversas sobre populações de pragas. A ação contra algumas pragas foi sugerida por um modo de ação neurotóxico, e há evidências que indicam a interferência do óleo sobre o neuromodulador octopamina (Kostyukovsky, et al., 2002) e com canais de cloreto controlados pelo GABA (Ácido gama-aminobutírico) (Priestley, et al., 2003). Essa característica permite que esses metabólitos sejam usados para proteção de produtos armazenados, susceptíveis a ação de pragas. Além disso, na sua maioria os óleos essenciais apresentam baixa toxicidade para mamíferos, aves e peixes (Isman, 2011).

A mortalidade observada nos ácaros rajado pode ocorrer devido à constituição complexa dos óleos essenciais, capazes de reduzir o número de ovos e a inibição da oviposição alterando a reprodução dos insetos (Krinski et al., 2018). Estudos anteriores relatam a capacidade dos óleos essenciais em reduzir a fecundidade em *T. urticae* (Pontes et al., 2010; Ribeiro et al., 2016), mas sem indicação se esta redução na fecundidade se devia às propriedades dos óleos ou à morte de ácaros.

O óleo do jatobá atuou sobre o comportamento do ácaro rajado através da ingestão desse complexo de constituintes, visto que o artrópode escarifica o tecido vegetal para se alimentar, dessa forma, os diversos constituintes

do óleo essencial atuam no sistema nervoso central e o organismo do artrópode não consegue desenvolver mecanismos suficientes para agir contra o ataque dessas diversas substâncias (Moreira, 2004). Esse resultado pode ser explicado devido aos diferentes modos de ação que esses metabólitos especiais podem apresentar para diferentes espécies, sem excluir o possível efeito sinérgico de outros constituintes do óleo, em pequenas quantidades, que podem ter mascarado a reconhecida atividade acaricida de ambos os monoterpenos, descritos por Sutherst et al. (1982).

A fumigação é o método mais comumente utilizado para o controle de pragas em produtos armazenados porque é geralmente barato, rápido, eficaz contra insetos em todas as fases da vida e aplicação direta de insetos é possível (Nenaah, 2014; Arena et al., 2017). Produtos naturais podem ser utilizados em pequena escala por agricultores para proteger grãos armazenados de infestação dos insetos. Diversas plantas aromáticas têm sido usadas para proteger grãos e leguminosas armazenados de pragas (Ngamo et al., 2007; Qin Li et al., 2011).

A perda de peso observada para o gorgulho do milho pode ser explicada devido ao consumo do óleo, alterando os processos de ingestão e a absorção, de modo que o inseto começa a metabolizar as suas reservas corporais para sobreviver. Esses resultados indicam que os insetos não conseguiram incorporar a dieta e que a quantidade de comida ingerida não foi suficiente para compensar os efeitos deletérios causados pelo óleo, resultando em perda de biomassa. Logo isso demonstrou que a incorporação do óleo das folhas do jatobá na dieta dos insetos, levou a um desequilíbrio no crescimento e na fisiologia do inseto (Napoleão et al., 2013).

O óleo de jatobá foi menos eficaz do que o brometo de metila, que é capaz de matar adultos *S. zeamais* com CL_{50} de $0,67 \mu\text{L.mL}^{-1}$ (Liu & Ho, 1999). No entanto, esses inseticidas fumigantes utilizados atualmente são altamente tóxicos para humanos (Nath et al., 2011), indicando que o óleo de jatobá seria uma alternativa eficiente, menos tóxica e mais ecologicamente correta na substituição do brometo de metila. 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-específicas (Ateyyat et al., 2009). O cálculo dos valores do índice de deterência alimentar (IDA) indicou efeito leve de deterência alimentar nas maiores concentrações. O efeito deterrente alimentar de preparações

vegetais e produtos inseticidas pode ocorrer devido à presença de componentes deletérios, associados ao aparelho bucal do inseto ou de um processo de intoxicação com grande potencial em impedir a ação danosa da praga, bem como causar morte (Napoleão et al., 2013).

Conclusão

Através da caracterização química do óleo de jatobá foi possível averiguar a presença de diversos componentes descritos na literatura com efeitos inseticidas. Na atividade acaricida, o óleo causou alterações na redução da eficiência reprodutiva e da longevidade, afetando o comportamento do ácaro rajado. Pode-se concluir também que tal óleo é fonte de compostos com ação deletéria sobre a fisiologia nutricional do gorgulho de milho adulto, pois pode causar interferência tóxica nas funções bioquímicas e fisiológicas de ambas as pragas estudadas.

Agradecimentos

Agradecemos à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo indispensável apoio e financiamento para o desenvolvimento desta pesquisa.

Referências

ABDEL-KADER, M.; BERGER, J. M.; SLEBODNICK, C.; HOCH, J.; MALONE, S.; WISSE, J. H.; WERKHOVEN, M. C. M.; MAMBER, S.; KINGSTON, D. G. I. 2002. Isolation and Absolute Configuration of ent-Halimane Diterpenoids from *Hymenaea courbaril* from the Suriname Rain Forest I. J. Nat. Prod., v. 65, n. 1, p. 11-15.

ADAMS, R. P. 2005. Identification of essential oil components by gas chromatography-quadrupole mass spectroscopy. Allured Pub. Corp., 4th Edition.

ARAÚJO JÚNIOR, C. P.; CAMARA, C.A.G. DA; NEVES, I. A.; RIBEIRO, N. DE C.; GOMES, C. A.; MORAES, M. M. DE; BOTELHO, P. DE S. 2010. Acaricidal activity against *Tetranychus urticae* and chemical composition of peel essential oils of three Citrus species cultivated in NE Brazil. Nat. Prod. Commun., v. 5, n. 3, p. 471-476.

ARENA, J. S.; PESCHIUTTA, M. L.; CALVIMONTE, H.; ZYGADLO, J. A. 2017. Fumigant and repellent activities of different essential oils alone and combined against the

maize weevil (*Sitophilus zeamais* Motschulsky). MOJ Bioorganic Org. Chem., v. 1, p. 1-6.

ASLAN, I.; ÖZBEK, H.; ÇALMAŞUR, Ö.; ŞAHİN, F. 2004. Toxicity of essential oil vapours to two greenhouse pests, *Tetranychus urticae* Koch and *Bemisia tabaci* Genn. Ind. Crops Prod., v. 19, n. 2, p. 167-173.

ATEYYAT, M. A.; AL-MAZRA, 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*. J. Insect Sci., v. 9, n. 15, p. 1-7.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. 2008. Biological effects of essential oils—a review. Food and Chemical Toxicology, v. 46, n. 2, p. 446-475.

BOTTON, M.; LORINI, I.; AFONSO, A. P. S. 2005. *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae) Damaging Vineyards in Rio Grande do Sul, Brazil. Neotrop. Entomol., v. 34, n. 2, p. 355-356.

BUCKERIDGE, M. S.; CROMBIE, H. J.; MENDES, C. J. M.; REID, J. S. G.; GIDLEY, M. J.; VIEIRA, C. C. J. 1997. A new family of oligosaccharides from the xyloglucan of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae) cotyledons. Carbohydr. Res., v. 303, n. 2, p. 233-237.

CÁCERES, A.; JAUREGUI, E.; HERRERA, D.; LOGEMANN, H. 1991. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal infections. 1: Screening of 38 plant extracts for anticandidal activity. J. Ethnopharmacol., v. 33, n. 3, p. 277-283.

CHAVES, E. M. F.; BARROS, R. F. M. 2012. Diversidade e uso de recursos medicinais do carrasco na APA da Serra da Ibiapaba, Piauí, Nordeste do Brasil. Rev. Bras. Plantas Med., v. 14, n. 3, p. 476-486.

COE, F. G.; ANDERSON, G. J. 2016. Ethnobotany of the garífuna of Eastern Nicaragua. New York Bot. Gard. Press, v. 50, n. 1, p. 71-107.

COITINHO, R. L. B. DE C.; OLIVEIRA, J. V.; GONDIM, M. G. C.; CÂMARA, C. A. G. 2011. Toxicidade por fumigação, contato e ingestão de óleos essenciais para *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1885 (Coleoptera: Curculionidae). Cienc. e Agrotecnol., v. 35, n. 1, p. 172-178.

- DE-OLIVEIRA, A. C. A. X.; RIBEIRO-PINTO, L. F.; PAUMGARTTEN, F. J. R. 1997. *In vitro* inhibition of CYP2B1 monooxygenase by β -myrcene and other monoterpenoid compounds. *Toxicol. Lett.*, v. 92, n. 1, p. 39-46.
- DIAS, L. S.; LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. 2013. Physicochemical and bioactive properties of *Hymenaea courbaril* L. pulp and seed lipid fraction. *Ind. Crops Prod.*, v. 49, p. 610-618.
- FAZOLIN, M.; COSTA, C. R.; DAMACENO, J. E. DE O.; DE ALBUQUERQUE, E. S.; CAVALCANTE, A. S. DA S.; ESTRELA, J. L. V. 2010. Fumigation of maize for weevil control using *Tanaecium nocturnum* (Bignoniaceae). *Pesqui. Agropecu. Bras.*, v. 45, n. 1, p. 1-6.
- FOERSTER, L. A.; NAKAMA, P. A. 2002. Efeito da estocagem em baixa temperatura na capacidade reprodutiva e longevidade de *Trissolcus basal* (Wollaston) e *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Scelionidae). *Neotrop. Entomol.*, v. 31, n. 1, p. 115-120.
- GNANKINÉ, O.; BASSOLÉ, I. L. H. N. 2017. Essential oils as an alternative to pyrethroids' resistance against anopheles species complex giles (Diptera: Culicidae). *Molecules*, v. 22, n. 10, p. 23.
- HARBORNE, J. B. 1993. Recent Advances in chemical Ecology. *Nat. Prod. Rep.*, v. 6, n. 2, p. 85-109.
- HEINRICH, M.; RIMPLER, H.; BARRERA, N. A. 1992. Indigenous phytotherapy of gastrointestinal disorders in a lowland Mixe community (Oaxaca, Mexico): Ethnopharmacologic evaluation. *J. Ethnopharmacol.*, v. 36, n. 1, p. 63-80.
- ISMAN, M. B.; MIRESMAILLI, S.; MACHIAL, C. 2011. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. *Phytochem. Rev.*, v. 10, n. 2, p. 197-204.
- KAMANULA, J. F.; BELMAIN, S. R.; HALL, D. R.; FARMAN, D. I.; GOYDER, D. J.; MVUMI, B. M.; MASUMBU, F. F.; STEVENSON, P. C. 2017. Chemical variation and insecticidal activity of *Lippia javanica* (Burm. f.) Spreng essential oil against *Sitophilus zeamais* Motschulsky. *Ind. Crops Prod.*, v. 110, p. 75-82.
- KOSTYUKOVSKY, M.; RAFAELI, A.; GILEADI, C.; DEMCHENKO, N.; SHAAYA, E. 2002. Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: Possible mode of action against insect pests. *Pest Manag. Sci.*, v. 58, n. 11, p. 1101-1106.
- KRINSKI, D.; FOERSTER, L. A.; DESCHAMPS, C. 2018. Ovicidal effect of the essential oils from 18 Brazilian piper species: Controlling *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera, Erebidae) at the initial stage of development. *Acta Sci. Agron.*, v. 40, n.1, p.10.
- LEE, E. J.; KIM, J. R.; CHOI, D. R.; AHN, Y. J. 2008. Toxicity of cassia and cinnamon oil compounds and cinnamaldehyde-related compounds to *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). *J. Econ. Entomol.*, v. 101, n. 6, p. 1960-1966.
- LIU, Z. L.; HO, S. H. 1999. Bioactivity of the essential oil extracted from *Evodia rutaecarpa* Hook f. et Thomas against the grain storage insects, *Sitophilus zeamais* Motsch. and *Tribolium castaneum* (Herbst). *J. Stored Prod. Res.*, v. 35, n. 4, p. 317-328.
- MAZZOLENI, E. M.; OLIVEIRA, L. G. DE. 2010. Inovação tecnológica na agricultura orgânica: estudo de caso da certificação do processamento pós-colheita. *Rev. Econ. e Sociol. Rural.*, v. 48, n. 3, p. 567-586.
- MECCIA, G.; ROJAS, L. B.; ROSQUETE, C.; SAN FELICIANO, A. 2000. Essential oil of *Croton ovalifolius* Vahl from Venezuela. *Flavour Fragr. J.*, v. 15, n. 3, 144-146.
- MILLIKEN, W. 2016. Traditional Anti-Malarial Medicine in Roraima, Brazil. *Econ. Bot.*, v. 51, n. 3, p. 212-237.
- MOREIRA, M. D.; PICANÇO, M. C.; BARBOSA, L. C. DE A.; GUEDES, R. N. C.; SILVA, É. M. 2004. Toxicity of leaf extracts of *Ageratum conyzoides* to lepidoptera pests of horticultural crops. *Biol. Agric. Hort.*, v. 22, n. 3, p. 251-260.
- NAPOLEÃO, T. H.; BELMONTE, B. DO R.; PONTUAL, E. V.; DE 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). *J. Stored Prod. Res.*, v. 54, p. 26-33.

- NATH, N. S.; BHATTACHARYA, I.; TUCK, A. G.; SCHLIPALIUS, D. I.; EBERT, P. R. 2011. Mechanisms of phosphine toxicity. *J. Toxicol.*, v. 2011, p. 9.
- NENAAH, G. E. 2014. Chemical composition, toxicity and growth inhibitory activities of essential oils of three *Achillea* species and their nano-emulsions against *Tribolium castaneum* (Herbst). *Ind. Crops Prod.*, v. 53, p. 252-260.
- NGAMO, L.; GOUDOU, A.; MARTIN, N.; MAPONGMETSEM, B.; LOGNAY, G.; MALAISSE, F.; HANCE, T. 2007. Chronic toxicity of essential oils of 3 local aromatic plants toward *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera:Curculionidae). *African J. Agric. Res.*, v. 2, n. 4, p. 164-167.
- OLIVEIRA, V. B.; YAMADA, L. T.; FAGG, C. W.; BRANDÃO, M. G. L. 2012. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. *Food Res. Int.*, v. 48, n. 1, p. 170-179.
- ORSI, P. R.; BONAMIN, F.; SEVERI, J. A.; SANTOS, R.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A.; DI STASI, L. C. 2012. *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne: A Brazilian medicinal plant with gastric and duodenal anti-ulcer and antidiarrheal effects in experimental rodent models. *J. Ethnopharmacol.*, v. 143, n. 1, p. 81-90.
- PAVARINI, D. P.; PAVARINI, S. P.; NIEHUES, M.; LOPES, N. P. 2012. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v. 176, p. 5-16.
- PAVELA, R.; SEDLÁK, P. 2018. Post-application temperature as a factor influencing the insecticidal activity of essential oil from *Thymus vulgaris*. *Ind. Crops Prod.*, v. 113, n. 8, p. 46-49.
- PAVELA, R.; DALL'ACQUA, S.; SUT, S.; BALDAN, V.; NGAHANG KAMTE, S. L.; NYA, P. C. B.; CAPPELLACCI, L.; PETRELLI, R.; NICOLETTI, M.; CANALE, A.; 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). *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, v. 101, n. 1, p. 1-8.
- PETTIT, G. R.; MENG, Y.; STEVENSON, C. A.; DOUBEK, D. L.; KNIGHT, J. C.; CICHACZ, Z.; PETTIT, R. K.; CHAPUIS, J. C.; SCHMIDT, J. M. 2003. Isolation and structure of palstatin from the amazon tree *Hymenaea palustris*. *J. Nat. Prod.*, v. 66, n. 2, p. 259-262.
- PONTES, W. J. T.; OLIVEIRA, J. C. G.; CÂMARA, C. A. G.; LOPES, A. C. H. R.; GONDIM-JÚNIOR, M. G. C.; OLIVEIRA, J. V.; BARROS, R.; SCHWARTZ, M. O. E. 2007. Chemical composition and acaricidal activity of the leaf and fruit essential oils of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand (Burseraceae). *Acta Amaz.*, v. 37, n.1, p. 103-109.
- PONTES, W. J. T.; SILVA, J. M. O.; DA CAMARA, C. A. G.; GONDIM-JÚNIOR, M. G. C.; OLIVEIRA, J. V.; SCHWARTZ, M. O. E. 2010. Chemical composition and acaricidal activity of the essential oils from fruits and leaves of *Protium bahianum* daly. *J. Essent. Oil Res.*, v. 22, n. 3, p. 279-282.
- PRIESTLEY, C. M.; WILLIAMSON, E. M.; WAFFORD, K. A.; SATTELLE, D. B. 2003. Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABA A receptors and a homo-oligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*. *Br. J. Pharmacol.*, v. 140, n. 8, p. 1363-1372.
- PROCÓPIO, T. F.; BELMONTE, B. DO 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*, v. 1, p. 24-27.
- QIN LI, H.; QI BAI, C.; CHU, S.; ZHOU, L.; SHAN DU, S.; LIU, Z. L.; QI-ZHI, L. 2011. Chemical composition and toxicities of the essential oil derived from *Kadsura heteroclita* stems against *Sitophilus zeamais* and *Meloidogyne incognita*. *J. Med. Plant Res.*, v. 5, n. 19, p. 4943-4948.
- RESTELLO, R. M.; MENEGATT, C.; MOSSI, A. J. 2009. Efeito do óleo essencial de *Tagetes patula* L. (Asteraceae) sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). *Rev. Bras. Entomol.*, v. 53, n. 2, p. 304-307.
- RIBEIRO, N.; CAMARA, C.; RAMOS, C. 2016. Toxicity of essential oils of *Piper marginatum* Jacq. against *Tetranychus urticae* Koch and *Neoseiulus californicus* (McGregor). *Chil. J. Agric. Res.*, v. 76, n. 1, p. 71-76.

- RYAN, M. F.; BYRNE, O. 1988. Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. *J. Chem. Ecol.*, v. 14, n. 10, p. 1965-1975.
- SIEGWART, M.; GRAILLOT, B.; BLACHERE LOPEZ, C.; BESSE, S.; BARDIN, M.; NICOT, P.C.; LOPEZ-FERBER, M. 2015. Resistance to bio-insecticides or how to enhance their sustainability: a review. *Front. Plant Sci.*, v. 6, n. 6, p. 1-19.
- SILVA, L. L.; GARLET, Q. I.; KOAKOSKI, G.; OLIVEIRA, T. A.; BARCELLOS, L. J. G.; BALDISSEROTTO, B.; HEINZMANN, B. M. 2015. Effects of anesthesia with the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. in parameters of fish stress. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 17, n. 2, p. 215-223.
- SUTHERST, R. W.; JONES, R. J.; SCHNITZERLING, H. J. 1982. Tropical legumes of the genus *Stylosanthes* immobilize and kill cattle ticks. *Nature*, v. 295, p. 320.
- SUZUKI, R.; MATSUSHITA, Y.; IMAI, T., SAKURAI, M.; HENRIQUES DE JESUS, J. M.; OZAKI, S. K.; FINGER, Z.; FUKUSHIMA, K. 2008. Characterization and antioxidant activity of Amazonian woods. *J. Wood Sci.*, v. 54, n. 2, p. 174-178.
- VAN DEN DOOL, H. & DEC. KRATZ, P., 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr.*, v. 11, n. 3, p. 463-471.
- VOON, H. C.; BHAT, R.; RUSUL, G. 2012. Flower extracts and their essential oils as potential antimicrobial agents for food uses and pharmaceutical applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 11, n. 1, p. 34-55.

**APÊNDICE B – EVALUATION OF THE INSECTICIDAL POTENTIAL OF
LEAF EXTRACTS OF *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (GRISEB)
ALTSCHUL AGAINST *Tetranychus urticae* KOCH AND *Sitophilus zeamais*
MOTS.**

Manuscrito publicado no Periódico: Journal of Environmental Analysis and
Progress-JEAP

Em Janeiro de 2019

Qualis:B1



ISSN: 2525-815X

Journal of Environmental Analysis and Progress

Journal homepage: www.jeap.ufrpe.br/

10.24221/jeap.4.1.2019.2304.048-056



Evaluation of the insecticidal potential of leaf extracts of *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb) Altschul against *Tetranychus urticae* Koch and *Sitophilus zeamais* Mots

Cibele Maria Alves da Silva-Bessa^{a*}, Paula Fernanda Figueiredo das Mercês^a, Carolina Barbosa Malafaia^b, Thiago Henrique Napoleão^a, Milena Martins Correia da Silva^c, Cláudio Augusto Gomes da Câmara^c, Maria Tereza dos Santos Correia^a, Márcia Vanusa da Silva^a, Maria Luiza Vilela Oliva^d

^a Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Departamento de Bioquímica, Av. Professor Moraes Rego, n. 1235, Recife-PE, Brasil. CEP: 50.670-901. *Autor de Correspondência: cibelealves2@gmail.com.

^b Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste-CETENE, Av. Prof. Luís Freire, 01, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil. CEP: 50.740-540.

^c Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE, Departamento de Química, Laboratório de Produtos Naturais Bioativos, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, Brasil. CEP: 52.171-900.

^d Universidade Federal de São Paulo UNIFESP, Departamento de Bioquímica. Rua 3 de Maio, n. 100, São Paulo, São Paulo, Brasil. CEP: 04021-001.

ARTICLE INFO

Received 10 Dez 2018

Accepted 25 Jan 2019

Published 28 Jan 2019

ABSTRACT

The deterioration and degradation of crops by insects causes economic losses of several billion dollars and affects food security. *Sitophilus zeamais* and *Tetranychus urticae* are two economically important species of crops around the world. The high toxicity of synthetic insecticides and the development of insect resistance to currently used chemicals stimulate the investigation of plant-derived insecticides as new alternatives for pest control. The insecticidal properties of secondary metabolites have been recognized, and have been confirmed scientifically in the last decades. The extract in cyclohexane (Ch) and ethyl acetate (Ea) of the leaves of *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* collected in the dry and rainy seasons were evaluated for the survival and nutritional physiology of *S. zeamais* (maize weevil) and the acaricidal effect front *T. urticae* (two-spotted spider). All extracts induced mortality of *S. zeamais*; however, only cyclohexane dry season (Chd) and ethyl acetate in the rainy season (Ear) caused significant mortality ($p < 0.05$), more than 50%, promoting physiological damage to insects in all concentrations tested. In the mortality tests with the spider mite, extracts Chd and Ear showed an LC_{50} of 52.75 and 156.42 mg.mL⁻¹. Still, in the same test, it can be observed that oviposition was also susceptible to extracts. Therefore, the extracts of *A. colubrina* are a source of compounds capable of interfering with and impairing the metabolism of the two studied pests.

Keywords: Natural insecticides, toxicity, two-spotted spider, maize weevil

Introduction

The insect infestation in cultivation and storage regions cause considerable economic losses to agricultural production worldwide (Amante et al., 2017). Among the most damaging species are *Tetranychus urticae* (Two-spotted spider) and *Sitophilus zeamais* (Maize weevil) (Baker et al., 2017). These insects are cosmopolitan and attack various economically essential crops such as corn, wheat, and others. Two-spotted spider causes a decrease in production by directly attacking the plant, feeding on the sap, causing the

appearance of chlorotic spots causing leaf death (Mercês et al., 2018). Maize weevil mainly attacks grains directly but also consumes processed products (Fazolin et al., 2010).

Traditional chemical insecticides are currently the primary form of control of these pests. However, its excessive and indiscriminate use has rendered pest insect populations resistant and, in addition to other problems associated with damage to non-target organisms, such as other non-harmful insects (e.g. pollinators) (Restello et al., 2009) of global crop production (Mazzoleni & Oliveira,

2010), besides being environmental contaminants, of food and affecting human health (Kodavanti & Loganathan, 2016). Recently several studies on molecules searches in plants that can act as an alternative method of combating insects have been developed (Pavela et al., 2016; Mercês et al., 2018).

Plants interact with the environment through the production of organic compounds, called secondary metabolites, which naturally deplete various biological functions and among them some molecules are responsible for protection against insect attack (Pavarini et al., 2012). Among alternative products for combating insect pests from agriculture, several plant extracts, organic and aqueous have been cited as effective in combating various pests (Benelli et al., 2017). They present a complex composition, with hundreds of biomolecules with diverse applications, and represent an ecologically correct alternative in the fight against pests in agriculture (Raliya et al., 2018).

Anadenanthera colubrina var. *cebil* (Griseb) Altschul is a tree widely distributed throughout Brazil, native to South America and Northeast Brazil. It is popularly known as angico, belongs to the Fabaceae family and can reach up to 7 m in height (Agra et al., 1993; Barretto & Ferreira, 2011). The presence of the flavonoid Anadanthoflavone can inhibit lipoxigenase (Gutierrez-Lugo et al., 2004). Routine and quercetin are also compounds found in the fruit. It presents a hallucinogenic and poisonous action in the hydroalcoholic extract demonstrating antioxidant and photoprotective activity of DNA (de Sousa Araújo et al., 2008). In the aqueous extract, it was observed the larvicidal activity (Farias et al., 2010). Phytochemical studies revealed that the leaves present tannins, flavonoids, and proanthocyanidins, proving the antimicrobial activity against strains of *Staphylococcus aureus* (Araújo et al., 2014).

Material and Methods

Plant material

Leaves of *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* were collected in the Catimbau National Park, in the Northeast of Brazil, in January and June (dry and rainy season, respectively). The collected material was oven dried at 45°C for 72h, then ground to obtain a thin powder, stored in an airtight container and kept at 4°C until use. One specimen was identified and registered by the Herbarium of the Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), under voucher IPA - 80350.

Organic extracts

Organic extracts were obtained from 100 g of the powder of the sheets subjected to eluotropic series of organic solvents: cyclohexane (Ch), chloroform (Cf) and ethyl acetate (Ea) in Soxhlet at a temperature below the boiling temperature of the solvent, and each was kept under reflux for 24h. The extracts were then filtered, and the solvents were entirely removed on a rotary evaporator at 45°C under reduced pressure. The extracts were stored at room temperature in a desiccator. In this study, extracts obtained by extraction with cyclohexane and ethyl acetate were tested.

Insects

Sitophilus zeamais

Maize weevil colonies were obtained from the Protein Biochemistry Laboratory of the Department of Biochemistry of the Federal University of Pernambuco (Recife, Brazil) and kept in glass containers covered with voal at 28 ± 2 °C, with 70% relative humidity and light 12:12h photoperiod: dark. The diet consisted of corn grains selected according to the integrity, sanitary conditions, size, and absence of contamination by insects. Adult insects (30 to 60 days old) were used per treatment.

Tetranychus urticae

The harvested mite was obtained from the rearing kept in bean (*Canavalia ensiformes* L.) plants of the Agricultural Acarology Laboratory of the Departamento de Agronomia of the Universidade Federal Rural de Pernambuco (Brazil). The insects were kept in glass containers, closed with delicate fabric (tulle type) to allow gas exchanges, at a temperature of 25 ± 1 °C, with 65 ± 3 % relative humidity and a photoperiod of 12h: 12h light: dark. Ten adult females were released at baseline. Four replicates were used per treatment.

Evaluation of toxicity by ingestion of organic extracts

The tests were performed according to Napoleão et al. (2013). Each bioassay consisted of a Petri dish containing five discs of a mixture of wheat flour with the extracts of the dop angico leaves. Concentrations of 250 to 750 mg.g⁻¹ were evaluated. The disks were prepared using extracts mixed with 2 g of autoclaved flour, and solubilized in water to a final volume of 5 ml. After homogenization for 5 min, five aliquots of 200 µL were arranged in Petri dishes equidistantly and maintained in an oven at 56°C for 24 h, and then the mass of the discs was recorded.

Groups of 20 adult *S. zeamais* insects of known weight were transferred to each plate. The

bioassays were maintained at $28 \pm 2^\circ\text{C}$ and carried out in triplicate. Dimethylsulfoxide 1% was used as a negative control. After seven days of the experiment, the mortality rate was determined, observing the motility of the insects to the naked eye and the weights of the diet discs and the insects were measured to determine the index of deterrence.

Bioassay

The food deterrence index (FDI) was calculated according to the formula: $\text{FDI} = 100 \times [(\text{MI}_c - \text{MI}_t) / \text{MI}_c]$, where MI_c corresponds to the mass ingested in the control and MI_t to the mass ingested in the test. According to FDI values, the effect of the sample was classified as: non-deterrent ($\text{FDI} < 20\%$), weak deterrent ($20\% < \text{FDI} \leq 50\%$), moderate deterrent ($50\% < \text{FDI} \leq 70\%$), or ($\text{FDI} \geq 70\%$) (Procópio et al., 2015).

The following nutrient indices were also calculated: Relative consumption rate (RCR) = (ingested mass) / (initial biomass of insects x days), Relative biomass gain rate (RBGR): (biomass acquired / (initial biomass of insects x days)). For statistical analysis, significant differences ($p < 0.05$) were calculated between treatments and were calculated using the Tukey's test. Data were expressed as mean $\pm$ standard deviation.

Residual contact test – Fumigation

The fumigation test was done, according to (Arena et al., 2017), with modifications to evaluate the residual contact toxicity of the organic extracts of *A. colubrina* var. *cebil* against the mite. The concentrations used ranged from 9 to 102.6 mg.mL^{-1} for extracts Ch and 9.5 to 500 mg.mL^{-1} for extracts Ea, the solutions being prepared by solubilizing extracts in methanol. Three leaf disks of bean (2.5 cm) were immersed in solutions previously prepared. After drying the discs were conditioned equidistantly in Petri dishes containing a filter paper disk saturated with water to prevent mite leakage and to maintain the turgidity of the leaves. Ten adult females were placed on each leaf disc, and mortality was determined after 24 hours of exposure. Mites were considered dead when unable to walk a distance greater than the length of their body after a slight touch with the end of a brush of fine bristles. The evaluation of the oviposition after exposure to extracts will be done after the number of eggs from the treatments and the control be quantified. The Azamax botanical

acaricide was used as positive control and methanol with negative control. All experiments were performed in triplicate. The data were analyzed by the Probit model through the POLO-PC Software for the determination of the LC_{50} values, with 95% confidence intervals, validated through the SAS statistical program and generated in graphic form through SigmaPlot software.

Results

After the exposure of *S. zeamais*, the extracts for seven days observed that all presented a significant difference in insect mortality when compared to the control (Figure 1). It is important to note that the extracts EaR and ChD caused death above 50%. However, we observed that the former showed a higher efficiency with activity already from the lowest concentration tested (250 mg.mL^{-1}).

The relative consumption rates (RCR) of diets with *S. zeamais* extract were zero or lower than the control consumption, differing significantly from the control. These data suggest the rejection of the pre-ingestion diet (Figure 2), showing that there was a strong effect deterrent caused by the extracts tested, indicating that they were able to prevent the consumption of the diet when used to *A. colubrina*.

The rates of relative biomass gain in the treatments with all the extracts (Figure 3) were negative, indicating that the insects lost biomass, since the insects because they did not feed on the diet, consumed its body reserves. The calculation of the FDI values indicated a strong food deterrence effect in all the extracts and concentrations tested. Thus, leaf extracts of *A. colubrina* contain compounds capable of causing diet rejection.

The concentration-mortality responses of the split mite subjected to the ChD and EaR extracts as well as the Azamax, used as a positive control, were compared regarding the difference of the estimated LC_{50} . Table 1 shows that ChD and EaR extracts tested were toxic to *T. urticae* by residual contact after 24 hours of exposure, but Azamax showed superior efficiency due to a small concentration of LC_{50} . The susceptibility of the spider mite was higher for the ChD extract, which was about 1.39 times more toxic than the EaR extract. Azamax was about 170 times more toxic than the ChD extract and about 236 times more toxic than the EaR extract.

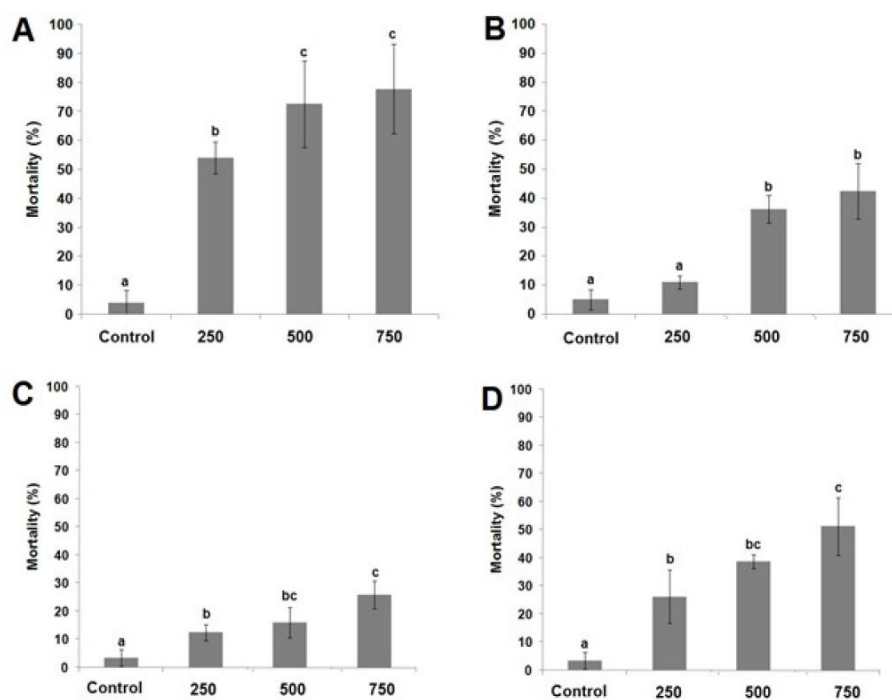


Figure 1. Mortality Rate (%) of *Sitophilus zeamais* under the effect of EaD (A), EaR (B), ChD (C), ChR (D) in different concentrations (mg.g⁻¹).

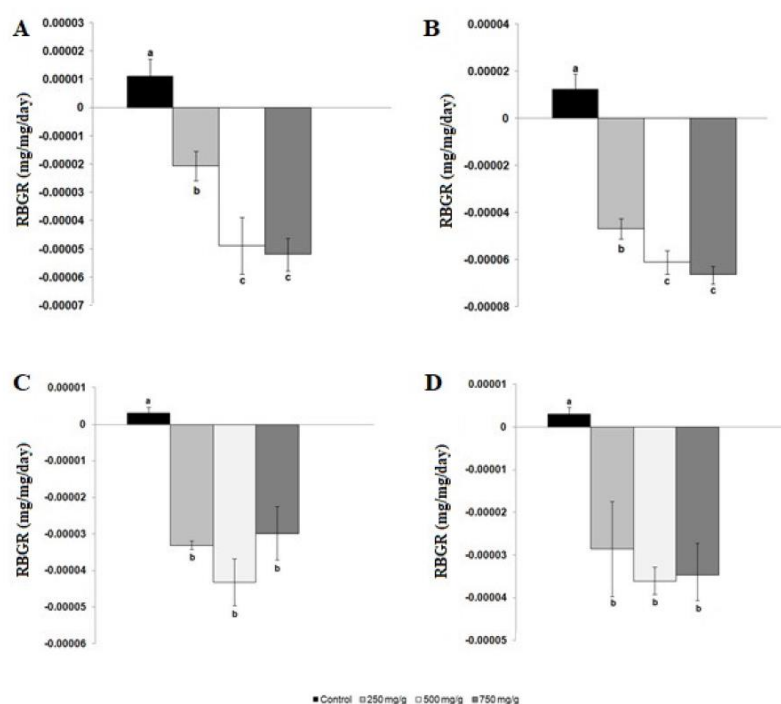


Figure 2. Relative consumption rate of artificial diets containing: EaD (A) EaR (B), CfD (C) CfR (D) from *Anadenanthera colubrina* by adult insects of *Sitophilus zeamais*. Different letters indicate significant differences among treatments.

However, it was observed that in sublethal concentrations the extracts of *A. colubrina* affected the fecundity in *T. urticae*. As the concentrations for both extracts were increased survival decreased, causing an effect, consequently reducing oviposition.

As can be seen in Figure 4, ChD extract at the concentration of 40 mg.mL⁻¹ caused mortality

of about half of the individuals with a 10% reduction in fecundity. At the highest concentration of 102.6 mg.mL⁻¹, mortality reached 100%. Regarding the EaR extract, the concentration capable of killing 100% of the individuals was 416 mg.mL⁻¹.

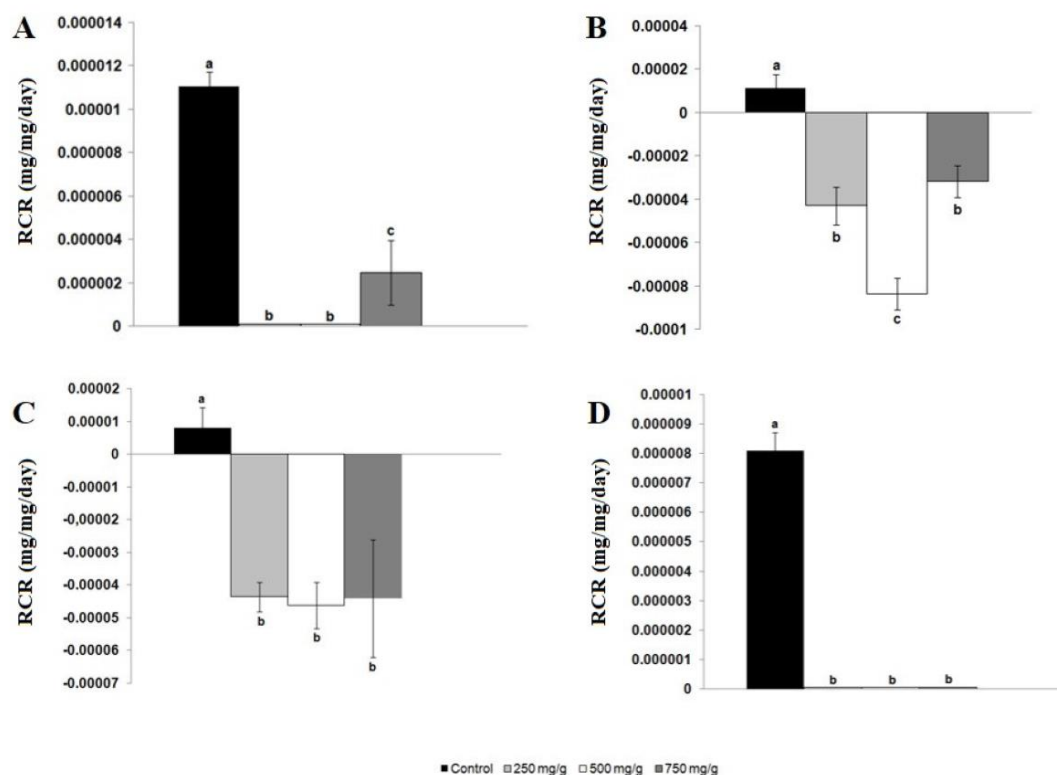


Figure 3. Relative gain rate of the biomass of *Sitophilus zeamais* adult insects kept in artificial diets containing: EaD (A) EaR (B), CfD (C) CfR (D) from *Anadenanthera colubrina*. Different letters indicate significant differences among treatments.

Table 1. Residual contact toxicity (LC₅₀ in mg.mL⁻¹) of the extracts ChD and EaR from the leaves of *Anadenanthera colubrina* var. cebil and Azamax on *Tetranychus urticae*. N = individuals' Number; DF = Degree of Freedom; χ^2 = qui-square; TR = Toxicity Reason; RI = Reliability Index.

Extract	N	DF	Slope	LC ₅₀ (RI 95%)	χ^2	TR (RI 95%)
ChD	540	4	5.61 (5.12 – 6.10)	52.75 (46.28 – 59.86)	7.67	170.71 (150.50 – 193.64)
EaR	810	7	2.35 (2.06 – 2.64)	73.27 (65.41 – 81.39)	8.8	237.11 (203.00 – 276.98)
Azamax	630	5	2.46 (2.08 – 2.84)	0.31 (0.28 – 0.35)	8.3	-

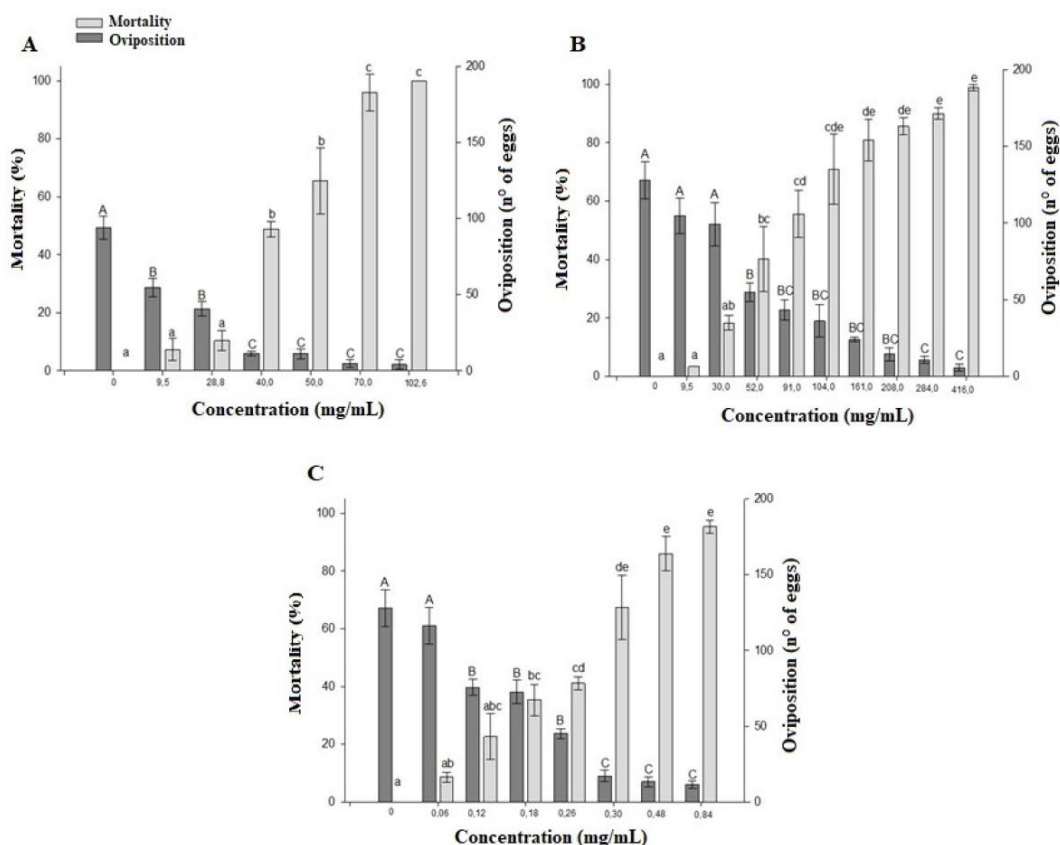


Figure 4. Mortality and oviposition of *Tetranychus urticae* on leaf discs treated with different concentrations of ChD (A), EaR (B) from *Anadenanthera colubrina* and control with Azamax (C).

Discussion

Natural plant products can be used on a small scale by farmers to protect stored grains and vegetables against pests (Ngamo et al., 2006). In recent years, there has been considerable effort to evaluate the potential of secondary plant metabolites as sources of control agents and consequently new sources for the design of target-specific molecules (Ateyyat et al., 2009).

Secondary metabolites present in plants with insecticidal effects may act as inhibitors of insect feeding or hinder growth, development, and reproduction (Spochacz et al., 2018). The deterrent effect of an insecticidal product has great potential in preventing the harmful action of the pest as well as can cause death by starvation (Mello & Silva-Filho, 2002). Thus, the data obtained in this study can be explained due to the nature of the compounds present in the extracts that alter the processes of ingestion and absorption of nutrients, so that the insects begin to metabolize their body reserves to survive (Napoleão et al., 2013).

Changes in insect feeding behavior, as observed in *S. zeamais* results, may be the

consequence of a process mediated by gustatory sensitivity (pre-ingestion effect). Due to the lack of ingestion of the disks containing the extracts, the observed nutritional disorders occur. In addition, the effect of deterrence may be related to intoxication (post-ingestion effect), where the insect avoids feeding after ingesting a small amount of food that activates the rejection response (Michiels et al., 2010; Napoleão et al., 2013; Sauvion et al., 2004; Sprawka & Goławska, 2010).

Several plants have insecticidal activities related to their composition of secondary metabolites, such as *Adathoda vasica*, *Cynodon dactylon*, *Eclipta alba*, *Morinda pubescens*, *Ocimum tenuiflorum*, *Phyllanthus amarus*, *Sesbania grandiflora*, *Solanum surattense*, *S. trilobatum* and *Vinca rosae* (Moshi & Matoju, 2017). Classes of compounds such as tannins and flavonoids have been related to those responsible for such activity, because they act in defense of plants against herbivores, causing a deterrent effect. *A. colubrina* presents these compounds as part of the phytochemical composition (Araújo et al., 2014). Tannins and other secondary

metabolites may interfere with specific metabolic pathways or insect physiological processes (Lessard, 2004). Studies have shown that the number of metabolites with insecticidal activity has been increasing in recent years. Plants of the genus *Capsicum* contain substances such as alkaloids, flavonoids, coumarins, saponins and essential oils from secondary metabolism with high insecticidal potential and repellency (Ayil-Gutiérrez et al., 2018).

Previous studies have reported the ability of plants to reduce fecundity in *T. urticae* (Pontes et al., 2010; Ribeiro et al., 2016), but without indicating whether this reduction in fecundity was due to the phytochemical properties of the extracts used or to the death of mites. Reduction of egg numbers and inhibition of oviposition are essential effects of plant extracts on insect reproduction (Costa et al., 2004).

The use of plants or its extracts with insecticidal activity has an essential application in public health and agriculture (Matias et al., 2002). It is the first report of acaricidal activity of extracts of *A. colubrina*. Both extracts show promise for direct use of this plant matrix, cost and benefit studies in the preparation of formulations to be applied in open environments, in addition to the effects on predatory mites.

Conclusion

The leaf extract of *A. colubrina* is a natural source of insecticides, which acts against adults of *Sitophilus zeamais* and *Tetranychus urticae*. These extracts have the potential to be used to control both the maize weevil, dissuading the consumption and leading the insects to death by starvation, as in the brindle mite, killing the insects through the ingestion of compounds in the extracts.

Acknowledgements

Authors expresses gratitude to the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for indispensable support and funding for the development of this research.

References

AGRA, M. DE F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F. DE; BARBOSA-FILHO, J. M. 1993. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Brazilian J. Pharmacogn.*, v. 1518, n. 3, p. 3472-508.

AMANTE, M.; SCHÖLLER, M.; SUMA, P.;

RUSSO, A. 2017. Bethylids attacking stored-product pests: an overview. *Entomol. Exp. Appl.*, v. 163, n. 7, p. 251-264.

ARAÚJO, D. R. C. DE; SILVA, L. C. N. DA; SILVA, A. G. DA; ARAÚJO, J. M. DE; MACÊDO, A. J.; CORREIA, M. T. DOS S.; SILVA, M. V. DA. 2014. Comparative analysis of anti-*Staphylococcus aureus* action of leaves and fruits of *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschul. *African J. Microbiol. Res.*, v. 8, n. 7, p. 2690-2696.

ARENA, J. S.; PESCHIUTTA, M. L.; CALVIMONTE, H.; ZYGADLO, J. A. 2017. Fumigant and repellent activities of different essential oils alone and combined against the maize weevil (*Sitophilus zeamais* Motschulsky). *MOJ Bioorganic Org. Chem.*, v. 1, p. 1-6.

ATEYYAT, M. A.; AL-MAZRA, M.; ABU-RJAI, T.; SHATNAWI, M. A. 2009. Aqueous extracts of some medicinal plants are as toxic as Imidacloprid to the sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci*. *J. Insect Sci.*, v. 9, n. 15, p. 1-7.

AYIL-GUTIÉRREZ, B. A.; SÁNCHEZ-TEYER, L. F.; VASQUEZ-FLOTA, F.; MONFORTE-GONZÁLEZ, M.; TAMAYO-ORDOÑEZ, Y.; TAMAYO-ORDOÑEZ, M.; RIVERA, G. 2018. Biological effects of natural products against *Spodoptera* spp. *Crop Prot.*, v. 114, p. 195-207.

BAKER, S.; VOLOVA, T.; PRUDNIKOVA, S. V.; SATISH, S.; PRASAD, N. 2017. Nanoagroparticles emerging trends and future prospect in modern agriculture system. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, v. 53, p. 10-17.

BARRETTO, S. S. B.; FERREIRA, R. A. 2011. Aspectos morfológicos de frutos, sementes, plântulas e mudas de leguminosae mimosoideae: *Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan e *Enterolobium contortisiliquum* (Vellozo) MORONG. *Rev. Bras. Sementes*, v. 33, n. 2, p. 223-232.

BENELLI, G.; CANALE, A.; TONIOLO, C.; HIGUCHI, A.; MURUGAN, K.; PAVELA, R.; NICOLETTI, M. 2017. Neem (*Azadirachta indica*): towards the ideal insecticide? *Nat. Prod. Res.*, v. 31, n. 4, p. 369-386.

COSTA, E. L. N.; SILVA, R. F. P.; FIUZA, L. M. 2004. Efeitos, aplicações e limitações de extratos de plantas inseticidas. *Acta Biol. Leopoldensia*, v. 26, p. 173-185.

- DE SOUSA ARAÚJO, T. A.; ALENCAR, N. L.; DE AMORIM, E. L. C.; DE ALBUQUERQUE, U. P. 2008. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. *J. Ethnopharmacol.*, v. 120, n. 1, p. 72-80.
- FARIAS, D. F.; CAVALHEIRO, M. G.; VIANA, M. P.; QUEIROZ, V. A.; ROCHA-BEZERRA, L. C. B.; VASCONCELOS, I. M.; MORAIS, S. M.; CARVALHO, A. F. U. 2010. Water extracts of Brazilian leguminous seeds as rich sources of larvicidal compounds against *Aedes aegypti* L. *An. Acad. Bras. Cienc.*, v. 82, n. 3, p. 585-594.
- FAZOLIN, M.; DA COSTA, C. R.; DAMACENO, J. E. DE O.; DE ALBUQUERQUE, E. S.; CAVALCANTE, A. S. DA S.; ESTRELA, J. L. V. 2010. Fumigation of maize for weevil control using *Tanaecium nocturnum* (Bignoniaceae). *Pesqu. Agropec. Bras.*, v. 45, n. 1, p. 1-6.
- GUTIERREZ-LUGO, M. T.; DESCHAMPS, J. D.; HOLMAN, T. R.; SUAREZ, E.; TIMMERMANN, B. N. 2004. Lipooxygenase inhibition by anadanthoflavone, a new flavonoid from the aerial parts of *Anadenanthera colubrina*. *Planta Med.*, v. 70, n. 3, p. 263-265.
- KODAVANTI, P. R. S.; LOGANATHAN, B. G. 2016. Organohalogen Pollutants and Human Health. *Int. Encycl. Public Heal.*, v. 4, p. 359-366.
- LESSARD, F. 2004. Stored grain: Pest management. *Encyclopedia Grain Sci.*, v. 3, p. 244-254.
- MATIAS, R.; SOLOM, S.; MARIA RESENDE, U.; GOMES, A.; KOLLER, W. 2002. *Melia azedarach*, uso popular x estudos químico e farmacológico: breve revisão. *Ensaio e Ciência*, v. 6, p. 91-121.
- MAZZOLENI, E. M.; OLIVEIRA, L. G. DE. 2010. Inovação tecnológica na agricultura orgânica: estudo de caso da certificação do processamento pós-colheita. *Rev. Econ. e Sociol. Rural*, v. 48, n. 3, p. 567-586.
- MELLO, M. O.; SILVA-FILHO, M. C. 2002. Plant-insect interactions: An evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Brazilian J. Plant Physiol.*, v. 14, n. 2, p. 71-81.
- MERCÊS, P. F. F. DAS; SILVA-BESSA, C. M. A. DA; MALAFAIA, C. B.; CÂMARA, C. A. G. DA; SILVA, M. M. C. DA; BEZERRA-SILVA, P. C.; NAVARRO, D. M. DO A. F.; NAPOLEÃO, T. H.; CORREIA, M. T. DOS S.; SILVA, M. V. DA; OLIVA, M. L. V. 2018. Caracterização fitoquímica e avaliação do potencial acaricida e inseticida do óleo essencial de *Hymenaea courbaril* L. var. *courbaril* sobre o ácaro-rajado e o gorgulho do milho. *J. Environ. Anal. Prog.*, v. 3, n. 4, p. 417-428.
- MICHELIS, K.; VAN DAMME, E. J.; SMAGGHE, G. 2010. Plant-insect interactions: What can we learn from plant lectins? *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, v. 73, n. 4, p. 193-212.
- MOSHI, A. P.; MATOJU, I. 2017. The status of research on and application of biopesticides in Tanzania. *Review. Crop Prot.*, v. 92, p. 16-28.
- NAPOLEÃO, T. H.; BELMONTE, B. DO R.; PONTUAL, E. V.; ALBUQUERQUE, L. P.; SÁ, R. A.; PAIVA, L. M.; BREITENBACH BARROSO COELHO, L. C.; PAIVA, P. M. G. 2013. Deleterious effects of *Myracrodruon urundeuva* leaf extract and lectin on the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae). *J. Stored Prod. Res.*, v. 54, p. 26-33.
- NGAMO, L.; GOUDOU, A.; MARTIN, N.; MAPONGMETSEM, B.; LOGNAY, G.; MALAISSE, F.; HANCE, T. 2006. Chronic toxicity of essential oils of 3 local aromatic plants toward *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). *Ajar*, v. 2, n. 4, p. 164-167.
- PAVARINI, D. P.; PAVARINI, S. P.; NIEHUES, M.; LOPES, N. P. 2012. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v. 176, p. 5-16.
- PAVELA, R.; DALL'ACQUA, S.; SUT, S.; BALDAN, V.; NGAHANG KAMTE, S. L.; BIAPA NYA, P. C.; CAPPELLACCI, L.; PETRELLI, R.; NICOLETTI, M.; CANALE, A.; 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). *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, v. 101, n. 1, p. 1-8.
- PONTES, W. J. T.; SILVA, J. M. O.; CAMARA C.A.G.; GONDIM-JÚNIOR, M. G. C.; OLIVEIRA, J. V.; SCHWARTZ, M. O. E. 2010. Chemical composition and acaricidal activity of the essential oils from fruits and leaves of *Protium bahianum* Daly. *J. Essent. Oil Res.*, v. 22, n. 3, p.

279-282.

PROCÓPIO, T. F.; BELMONTE, B. DO 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, v. 1, n. 1, p. 24-27.

RALIYA, R.; SAHARAN, V.; DIMKPA, C.; BISWAS, P. 2018. Nanofertilizer for Precision and Sustainable Agriculture: Current State and Future Perspectives. J. Agric. Food Chem., v. 66, n. 26, p. 6487-6503.

RESTELLO, R. M.; MENEGATT, C.; MOSSI, A. J. 2009. Efeito do óleo essencial de *Tagetes patula* L. (Asteraceae) sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). Rev. Bras. Entomol., v. 53, n. 2, p. 304-307.

RIBEIRO, N.; CAMARA C.A.G.; RAMOS, C.

2016. Toxicity of essential oils of *Piper marginatum* Jacq. against *Tetranychus urticae* Koch and *Neoseiulus californicus* (McGregor). Chil. J. Agric. Res., v. 76, n. 1, p. 71-76.

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*. Entomol. Exp. Appl., v. 110, n. 1, p. 31-44.

SPOCHACZ, M.; CHOWAŃSKI, S.; WALKOWIAK-NOWICKA, K.; SZYMCZAK, M.; ADAMSKI, Z. 2018. Plant-Derived Substances Used Against Beetles-Pests of Stored Crops and Food-and Their Mode of Action: A Review. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf., v. 17, n. 5, p. 1339-1366.

SPRAWKA, I.; GOŁAWSKA, S. 2010. Effect of the lectin PHA on the feeding behavior of the grain aphid. J. Pest Sci., v. 83, n. 2, p. 149-155.

ANEXO A - FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA – FIB.

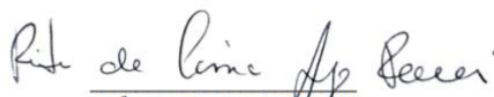


HERBÁRIO IPA – DÁRDANO DE ANDRADE LIMA FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

FIB N^o. 43/2012

N ^o	N ^o de Tombo	Família	Nome Científico	Identificada por
01	84039	Fabaceae	<i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i>	M. Oliveira

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


Dr^a Rita de Cássia Pereira
 Curadora do Herbário IPA

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

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



Secretaria de
Agricultura e
Reforma Agrária

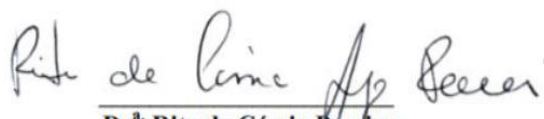


HERBÁRIO IPA – DÁRDANO DE ANDRADE LIMA FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

FIB N^o. 3/2012

N ^o	N ^o de Tombo	Família	Nome Científico	Identificada por
01	80348	Fabaceae	<i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>courbaril</i>	M. Oliveira

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


Dr^a Rita de Cássia Pereira
 Curadora do Herbário IPA

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

Procedência: Material coletado em Pernambuco, Parque Nacional do Catimbau, às margens da pedra do cachorro, em área de Caatinga. Determinada em: Outubro de 2012.

Obs.: Amostra botânica em estudo na UFPE para tese de Doutorado da aluna Paula Fernanda das Mercês do PPGCB.

Resultado encaminhado por e mail: paulaanandaa@hotmail.com em 22/02/2018.

Instituto Agronômico 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>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i> (Griseb) Altschul (FABACEAE:MIMOSOIDAE)	
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 exime 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:MIMOSOIDAEAE)	
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:MIMOSOIDEAE)	
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:MIMOSOIDEAE)	
Nome da Instituição : UFPE - UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO	CNPJ: 24.134.488/0001-08

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.