

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
FISIOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS DO
SEMI-ÁRIDO DE PERNAMBUCO – UMA INOVAÇÃO NO
CONTROLE DE FITOPATÓGENOS**

CIBELE MARIA ALVES DA SILVA

ORIENTADORORA: Prof^a. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia
CO-ORIENTADORA: Prof^a. Dra. Márcia Vanusa da Silva

RECIFE
2013

CIBELE MARIA ALVES DA SILVA

METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS DO
SEMI-ÁRIDO DE PERNAMBUCO – UMA INOVAÇÃO NO
CONTROLE DE FITOPATÓGENOS

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco

RECIFE
2013

Catálogo na Fonte:
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Cibele Maria Alves da

Metabólitos secundários de plantas do semi-árido de Pernambuco- uma inovação no controle de fitopatógenos/ Cibele Maria Alves da Silva– Recife: O Autor, 2014.

109 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Maria Tereza dos Santos Correia

Coorientadora: Márcia Vanusa da Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Bioquímica e Fisiologia, 2014.

Inclui bibliografia e anexos

1. Plantas da Caatinga 2. Metabólitos I. Correia, Maria Tereza dos Santos (orientador) II. Silva, Márcia Vanusa (coorientadora) III. Título

632.9

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-

CIBELE MARIA ALVES DA SILVA

METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS DO
SEMI-ÁRIDO DE PERNAMBUCO – UMA INOVAÇÃO NO
CONTROLE DE FITOPATÓGENOS

Dissertação apresentada para o cumprimento
parcial das exigências para obtenção do título
de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco

Aprovado por:

Prof^ª. Dr^a. Maria Tereza dos Santos Correia - Presidente

Prof^ª. Dr^a. Márcia Vanusa da Silva

Prof^ª. Dr^a. Elineide Barbosa de Sousa

Prof^ª. Dr^a. Mônica Cristina Barroso Martins

Data: :07/08/2013

Aos meus pais, Isabel e Nivaldo pela educação e conhecimento proporcionado durante toda minha vida, ensinando os valores e princípios éticos, resultando em quem sou e tendo todos os méritos por qualquer conquista minha.

Dedico

AGRADECIMENTOS

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

A meus pais, José Nivaldo Alves e Isabel Alves por acreditarem em mim e serem os maiores incentivadores de meus sonhos. Pelo carinho, dedicação e educação que me ofereceram desde os primeiros dias de minha vida e por todo esforço para dar o melhor para mim e meus irmãos, hoje mostramos que valeu a pena. Amo muito vocês.

A meus irmãos Isabela Alves e José Nivaldo Filho pelo companheirismo e carinho recebido ao longo de todos esses anos.

A meu namorado Rafael Bessa por todo amor e por estar sempre ao meu lado, me apoiando e incentivando em todos os momentos.

A minha orientadora Professora Maria Tereza dos Santos Correia, pela oportunidade ao aceitar-me como sua orientanda, pelo estímulo, compreensão, apoio e disposição.

A professora Márcia Vanusa da Silva, minha co-orientadora, por sua amizade, dedicação, apoio, pelos seus conselhos e sugestões, além das palavras de ânimo que sempre me incentivaram.

A professora Elineide Barbosa de Sousa do Laboratório de Fitobacteriologia na área de Fitossanidade do Departamento de Agronomia da UFRPE pela parceria e disponibilização do material microbiológico utilizado no desenvolver deste trabalho.

A Myrzânia Guerra, que se tornou mais uma companheira de trabalho, cooperando quando necessário.

Ao meu amigo Túlio Silva, pelo incentivo, apoio e ajuda diária na elaboração deste trabalho.

Ao amigo Alexandre Gomes, por compartilhar seus conhecimentos e por toda ajuda.

Aos amigos Carolina Malafaia, Clóvis Macedo, Sarah Romine, Bruna Mirely, Daniel Araújo, Bárbara Ramos, Renata Alves, Louise Oliveira e Ana Cláudia Jardelino do Laboratório de Biologia Molecular que fizeram parte do meu dia a dia compartilhando os conhecimentos, dificuldades, alegrias e porque não tristezas. Meu muito obrigada.

A todos do Laboratório de Produtos Naturais, especialmente ao professor Nicácio Henrique por disponibilizar o laboratório para a realização de grande parte do trabalho e ao Técnico Sr. João Antônio por toda ajuda e por repassar seus conhecimentos sempre que possível, além da grande amizade formada.

A Isabel Arruda do Laboratório de Biotecnologia pelos conhecimentos compartilhados e ajuda na realização deste trabalho.

A minha grande amiga Ana Paula Sant'Anna, pelo seu apoio incondicional, pela grande ajuda que me deu ao longo do projeto, pelo ânimo, alegria e por sua amizade.

Aos meus amigos do programa de pós graduação em Bioquímica e Fisiologia pelos bons e divertidos momentos de estudo e pela amizade.

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

A Universidade Federal de Pernambuco e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

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

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

(Anatole France)

RESUMO

A formação de uma consciência ecológica e a necessidade de se preservar o meio ambiente têm gerado a necessidade de testar produtos naturais visando um controle alternativo de fitopatógenos. O objetivo desse estudo foi contribuir com os estudos das plantas da Caatinga, propondo-se realizar um screening de atividade antagonista contra bactérias fitopatógena dos extratos aquosos de doze espécies de plantas existentes no Semi-árido de Pernambuco, e avaliar o potencial anti-fitopatógeno dos extratos das folhas de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* coletadas nas estações seca e chuvosa, bem como investigar os constituintes químicos existentes nesses extratos. Atividade anti-fitopatógeno dos extratos aquosos foi estudada pela determinação da Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração microbicida mínima (CMM) contra *Acidovorax citrulli*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Todas as espécies bacterianas foram sensíveis aos extratos aquosos, com os valores de CIM variando 3,12 a 25 mg/mL. Dada a maior atividade de *A. colubrina* foi realizada a extração orgânica a partir de amostras de diferentes períodos seguida da avaliação da atividade antimicrobiana contra *A. citrulli*, *P. carotovorum*, *R. solanacearum*, *X. campestris* pv. *campestris*, *X. campestris* pv. *malvacearum*, *X. campestris* pv. *viticola*, *Fusarium oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. solani*, *Verticillium lecanii*, *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus flavus*. Os extratos orgânicos foram ativos contra todos fitopatógenos testados, sendo a maior atividade observada para o extrato ciclohexano da estação seca. Foi observado por microscopia eletrônica de transmissão que células de *X. campestris* pv. *campestris* tratadas com extrato ciclohexano apresentaram danos internos: citoplasma destruído com presença de vacúolos e espaço periplasmático irregular. Adicionalmente, a análise fitoquímica dos extratos das folhas de *A. colubrina* por Cromatografia em Camada Delgada revelou a presença de terpenos, flavanoides, triterpenos, taninos, cumarinas e açúcares redutores. De acordo com estes resultados, podemos concluir que a flora do Nordeste do Brasil pode ser considerada como uma fonte rica de plantas com atividade contra fitopatógenos.

Palavras-chaves: Atividade antibacteriana, atividade antifúngica, caatinga, *Anadenanthera colubrina*.

ABSTRACT

The formation of an environmental awareness and the need to preserve the environment have generated the need to test natural products, targeting a alternative control of plant pathogens. The aim of this study was to contribute to studies of plants of Caatinga, proposing to perform an antimicrobial screening of aqueous extracts from twelve species of plants from the Semi-arid region of Pernambuco against phytopathogen bacteria, and also evaluate the anti-phytopathogen potential of extracts from leaves of *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* collected in dry and rainy seasons, as well as investigating existing chemical constituents in these extracts. Anti-phytopathogen activity of the extracts was evaluated by determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum microbicidal concentration (MMC) against *Acidovorax citrulli*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. All tested plant extracts showed antibacterial activity, however, the plants differ in their activities against the tested microorganisms, with MIC values ranging from 3.12 to 25 mg/mL. Given the best activity found to *A. colubrina*, an organic extraction was performed from samples of different periods and then the antimicrobial activity was evaluated against *A. citrulli*, *P. carotovorum*, *R. solanacearum*, *X. campestris* pv. *campestris*, *X. campestris* pv. *malvacearum*, *X. campestris* pv. *viticola*, *Fusarium oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. solani*, *Verticillium lecanii*, *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus flavus*. The organic extracts were active against all the tested plant pathogens, with the highest activity observed for the cyclohexane extract from dry season. It was observed by transmission electron microscopy that cells of *X. campestris* pv. *campestris* treated with cyclohexane extract showed internal damage: destroyed cytoplasm with the presence of vacuoles and irregular periplasmic space. Phytochemical analysis of the extracts by thin layer chromatography revealed the presence of terpenoids, flavonoids, triterpenes, tannins, coumarins and reducing sugars. According to these results, we conclude that the flora of northeastern Brazil can be considered as a rich source of plants with anti-phytopathogen activity.

Keywords: Antimicrobial activity, Antifungal activity, caatinga, *Anadenanthera colubrina*.

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1: Principais vias de biossíntese dos metabólitos secundários.	23
Figura 2: Estrutura geral dos flavonoides.	25
Figura 3: Estrutura genérica das principais classes dos flavonoides.	26
Figura 4: Estrutura química dos Ácidos hidroxibenzoicos (A) e Hidroxicinâmicos (B)	27
Figura 5: Localização da área de estudo, Parque Nacional do Catimbau (PNC), Pernambuco.	33
Figura 6: <i>A. colubrina</i> ; A: Porte da planta; B: Detalhe do Tronco; C: Folhas; D: Flores; E: Fruto e Sementes.	35

LISTA FIGURAS ARTIGO 2

	Pág.
Figure 1: <i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i> (Griseb.) Altschul. Caption: 1. General aspect of the species; 2. Detail of the trunk bark; 3. Detail of the bark during regeneration; 4. Use for fences.	81
Figure 2: Transmission electron micrographs of untreated and treated <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> cells. (A and B) Untreated cells having a regular outlined cell wall, plasma lemma lying closely to the cell wall, and regularly distributed cytoplasm (shown by arrows). (C and D) Cyclohexanic <i>A. colubrina</i> var. <i>cebil</i> extract treated cells at 3.12 mg/mL concentration having extensive internal damage, unsymmetrical distributed cytoplasm, and larger and irregular periplasmic space. (E and F) Cyclohexanic <i>A. colubrina</i> var. <i>cebil</i> extract treated cells at 6.25 mg/mL concentration having extensive internal damage, unsymmetrical distributed cytoplasm, and larger and irregular periplasmic space.	82

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1: Sintomas causados por fungos Fitopatógenos.	18
Tabela 2: Doenças e Sintomas causados por Bactérias Fitopatógenas.	19
Tabela 3: Principais classes de alcaloides sintetizados pelas plantas.	30

LISTA TABELAS ARTIGO 1

	Pág.
Table 1: Plants employed in this study and their ethnobotanical information.	64
Table 2: Minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of aqueous extracts of medicinal plants of Caatinga against the growth of plant pathogenic bacteria.	66

LISTA TABELAS ARTIGO 2

	Pág.
Table 1: Antifungal activity, Minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of organics extracts (cyclohexane, chloroform, ethyl acetate and methanol) from <i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i> harvest at dry season against selected plant pathogenic fungal.	83
Table 2: Antifungal activity, Minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of organics extracts (cyclohexane, chloroform, ethyl acetate and methanol) from <i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i> harvest at rainy season against selected plant pathogenic fungal.	84
Table 3: Antibacterial activity, Minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of organics extracts (cyclohexane, chloroform, ethyl acetate and methanol) from <i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i> harvest at dry season against selected plant pathogenic bacterial.	85

Table 4: Antibacterial activity, Minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of organics extracts (cyclohexane, chloroform, etyl acetate and methanol) from <i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i> harvest at rainy season against selected plant pathogenic bacterial.	86
Table 5: Phytochemical screening of <i>A. colubrina</i> var. <i>cebil</i> extracts harvest at Catimbau National Park at dry season.	87
Table 6: Phytochemical screening of <i>A. colubrina</i> var. <i>cebil</i> extracts harvest at Catimbau National Park at rainy season.	87

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	14
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1 Contaminações por microrganismos em culturas de importância econômica	16
2.1.1 Microrganismos Fitopatógenos	17
2.2 Utilização de extratos vegetais no combate a fitopatógenos	19
2.3 Metabólitos secundários de plantas	21
2.3.1 Compostos Fenólicos	23
2.3.1.1 Flavanoides	24
2.3.1.2 Não Flavanoides	27
2.3.2 Terpenos	27
2.3.3 Alcaloides	29
2.4 Caatinga	31
2.5 <i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan var . cebil (Griseb.) Altschul	33
3. OBJETIVOS	37
3.1 Geral	37
3.2 Específicos	37
4. REFERÊNCIAS	38
5. CAPÍTULO 1	52
5.1 Artigo a ser submetido ao periódico african journal of microbiology research	52
5.2 Antimicrobial activity of several Brazilian medicinal plants against phytopathogenic bacteria	53
ABSTRACT	54

1.	INTRODUCTION	55
2.	MATERIALS AND METHODS	56
2.1	Collection of Plant material	56
2.2	Preparation of aqueous plant extracts	57
2.3	Test microorganisms	57
2.4	Determination of Minimum Inhibitory and Minimum Bactericidal Concentrations	57
3.	RESULTS AND DISCUSSION	58
4.	ACKNOWLEDGEMENTS	59
5.	REFERENCES	61
6.	CAPÍTULO 2	67
6.1	Artigo a ser submetido ao periódico crop protection	67
6.2	Antimicrobial activities of leaf extracts of <i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i> Griseb. Altschul (Fabaceae: Mimosoideae) against some plant pathogenic bacteria and fungi	68
	ABSTRACT	69
1.	INTRODUCTION	70
2.	MATERIALS AND METHODS	71
2.1	Collection of plant materials	71
2.2	Organic extracts	71
2.3	Phytochemical screening	71
2.4	Test microorganisms	72
2.5	Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentrations (MBC)	72
2.6	Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC)	72
2.7	Preparation of Samples for Scanning Electron Microscopy and	73

Transmission Electron Microscopy

3.	RESULTS	73
4.	DISCUSSION	75
5.	CONCLUSIONS	77
6.	ACKNOWLEDGEMENTS	77
7.	REFERENCES	77
	ANEXOS	88

1 INTRODUÇÃO

O tratamento químico é amplamente utilizado na agricultura. Os benefícios advindos dessa prática são muitos, mas também são muitos os males que podem acarretar ao meio ambiente e ao ser humano. O uso indiscriminado e excessivo de agrotóxicos é resultado de uma visão equivocada do processo agrícola, que gera como consequência, a crescente resistência de pragas, microrganismos fitopatogênicos e ervas daninhas aos produtos sintéticos, aumentando a dependência de insumos químicos por parte de produtores (COUTINHO, 1996), podem também causar contaminação da água e do solo, intoxicação de produtores rurais e o interrompimento do sistema de controle biológico por inimigos naturais (KIM et al., 2003; MENEZES, 2005).

Os problemas decorrentes da utilização de produtos químicos apontam para a necessidade de se desenvolver novos tipos de agentes de controle mais seletivos e menos agressivos ao homem e ambiente (KIM et al., 2003; MENEZES, 2005). A exploração da atividade de compostos secundários de plantas tem se tornado uma alternativa no controle de fitopatógenos, com potencial ecológico para substituir o emprego de produtos sintéticos, por meio da utilização de metabólitos secundários como extratos brutos e óleos essenciais, uma vez que esses apresentam em sua composição substâncias com propriedades fungicidas e/ou fungitóxicas (MATOS, 1997).

Como os vegetais são uma excelente fonte para a busca de novas drogas antimicrobianas, por terem uma diversidade molecular muito superior àquelas derivadas de produtos sintéticos, as plantas têm se tornado fontes potenciais de moléculas que podem ser empregadas na defesa de plantas contra fitopatógenos e para fins medicinais (NOVAIS, 2003; RODRIGUES et al., 2006), pois constituem fontes de metabólitos secundários inesgotáveis em relação às possibilidades de se encontrar novas e diferentes estruturas com atividades de extrema importância (YUNES; CECHINEL-FILHO, 2001).

O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas dentre um total estimado entre 350.000 e 550.000 espécies (SIMÕES et al., 2002). Entretanto, menos de 10% dessas plantas foram avaliadas sob aspectos biológicos e não mais que 5% sob aspectos químicos até meados dos anos 90 (DI STASI 1996). Dessa forma, as plantas constituem ainda uma fonte importante para a descoberta de novas substâncias biologicamente ativas.

A região Nordeste do Brasil possui 60% de seu território ocupado pela Caatinga, que é a única formação vegetal exclusivamente brasileira (GIL, 2002), compreendendo uma área de aproximadamente 826.411 km² (MMA/IBAMA, 2010), que abrange os estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais (SILVA; ALBUQUERQUE, 2005). A caatinga tem como característica o potencial hídrico reduzido no solo com acentuado período de estação seca, entre sete e dez meses; sua flora nativa apresenta então características anatômicas, morfológicas e funcionais especializadas para a sobrevivência destas plantas a estas condições de clima e solo (DRUMOND et al., 2000).

Desta forma, contribuindo com os estudos de plantas do Nordeste brasileiro para a descoberta de novos compostos bioativos, este trabalho propôs, avaliar a atividade antimicrobiana fitopatogênica bactericida *in vitro* de doze plantas existentes no Semi-árido de Pernambuco, avaliar o potencial antibacteriano e antifúngico fitopatogênico e investigar os constituintes químicos existentes das folhas de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* obtidas no Parque Nacional da Serra do Catimbau, reserva da Caatinga localizada no município de Buíque, Pernambuco. Embora esta espécie já tenha sido submetida a alguns estudos, sua grande utilização pela população, principalmente no Nordeste, justifica a importância de novos estudos com o propósito de se conhecer detalhadamente sua composição química e possibilitar seu uso no combate de microorganismos fitopatogênicos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Contaminações por microrganismos em culturas de importância econômica

A história da botânica é, em grande parte, a luta do homem para adaptar-se à natureza, utilizando as plantas na medicina, indústria e agricultura. Com o crescimento da população mundial e, conseqüentemente, aumento da necessidade de produção de alimentos em maior escala, os agricultores começaram a se especializar, e os monocultivos foram ficando cada vez mais frequentes ocupando maiores áreas, originando um desequilíbrio ambiental cada vez maior, favorecendo o aumento e surgimento de pragas e doenças (BETTIOL e GHINI, 2003). De uma maneira geral, as doenças causadas por fitopatógenos são provocadas principalmente por fungos, bactérias, nematóides e vírus, que além de provocarem perdas nas fases de pré e pós-colheita, prejudicam a aparência das plantas e/ou alteram suas características físicas e químicas (JUNQUEIRA et al., 2006).

Um importante fator que pode diminuir drasticamente os valores finais da produção de uma dada cultura é a presença de pragas no campo e o conseqüente desenvolvimento de doenças. Com relação as bactérias e fungos, sua importância como patógenos de plantas se deve não só a gravidade das doenças que causam nas culturas de valor econômico, mas também à facilidade com que podem se espalhar. A defesa contra pragas fitopatógenas tem sido inegavelmente o maior problema que a humanidade tem enfrentado na produção de alimentos (FRANKEL, 1977).

Entre as doenças que atacam as culturas de plantas uma das mais importantes é a bacteriose ou cretamento bacteriano, também chamado de mancha angular, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam), que ocorre de forma generalizada em todas as regiões produtoras no mundo (DELANNOY et al., 2005). Devido à ampla disseminação e alta variabilidade do patógeno, constitui-se como um sério problema à cotonicultura também no Brasil (CIA; SALGADO, 1995) e sua severidade depende de fatores climáticos e da cultivar (ZADONÁ et al., 2005). Dentre as culturas atacadas por este patógeno encontra-se o algodoeiro, que é uma das culturas anuais mais importantes para o Brasil em razão do seu alto valor econômico e social. Essa doença causa danos com cerca de 15% limitando o rendimento da planta (GONDIM; BELOT; MICHEL, 1996).

Outra doença bastante conhecida é a Podridão vermelha da raiz, causada por *Fusarium solani*, que pode ser encontrada nas áreas cultivadas com soja em todo o mundo e é

um dos principais desafios à cultura. Sua incidência afeta grande número de lavouras no Brasil e práticas culturais que propiciem elevado rendimento da soja, também favorecem a ocorrência da doença. A disseminação do patógeno pode se dar através da água de irrigação e uso de implementos agrícolas que contenham propágulos de solo contaminado pelo fitopatógeno (DAVIS et al., 2006).

A soja é a oleaginosa mais cultivada no mundo e no Brasil ocupa lugar de destaque no ranking dos maiores produtores do grão (IBGE, 2013). No entanto, entre os principais fatores que limitam a obtenção de maiores rendimentos pela cultura estão às doenças e a importância econômica de cada uma depende das condições meteorológicas de cada safra. Estima-se que as perdas na lavoura de soja provocadas por estas doenças fiquem em torno de 15 a 20%, sendo que algumas podem ocasionar perdas de até 100% (EMBRAPA, 2013).

2.1.1 Microrganismos Fitopatogênicos

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

Os fungos fitopatogênicos, em especial, são responsáveis por perdas consideráveis em culturas economicamente importantes (FLETCHER et al., 2006), além de estarem associados à indução do apodrecimento de frutas e verduras pós-colheita, diminuindo o conteúdo nutricional e aproveitamento destes alimentos (RAY; RAVI, 2005). Os fitopatógenos podem utilizar diversas formas para infectar o hospedeiro, as quais incluem sítios lesionados e aberturas naturais das plantas, tais como os estômatos. As enzimas que hidrolizam matéria orgânica em decomposição também podem ser utilizadas pelos patógenos para invadir os tecidos das plantas por meio da degradação de macromoléculas da parede celular (SLATER; SCOTT; FOWLER, 2003). Esses fungos são identificados, em sua maioria, pelos sintomas que provocam e pelos sinais presentes no hospedeiro, que são facilmente observados em campo, tais como manchas foliares, podridões, ramos secos, exsudações, entre outros (BATISTA et al., 2007). Em geral, os fungos fitopatogênicos causam necrose de tecidos da

planta e frequentemente causam a redução do crescimento (nanismo) de órgãos ou da planta inteira (AGRIOS, 2005). Alguns exemplos de sintomas causados por esses fungos estão descritos na (tabela 1).

Tabela 1: Sintomas causados por fungos Fitopatógenos.

Patógenos	Doenças
<i>Fusarium oxysporum</i> <i>Fusarium moniliforme</i> <i>Fusarium solani</i>	Tombamento em plântulas e podridão de espigas de milho; Murcha em diversas plantas; Podridões de raízes em diversas culturas (MICHEREFF, 2001)
<i>Verticillium lecanii</i>	Murcha e deteriorização em plantas (MICHEREFF, 2001)
<i>Rhizopus stolonifer</i>	Podridão de frutos e sementes (MICHEREFF, 2001)
<i>Aspergillus flavus</i>	Deterioração das sementes (AGROFIT, 2011)

Em relação às bactérias fitopatógenas elas são importantes patógenos de plantas, não somente pela alta incidência e severidade em culturas de valor econômico, mas também pela facilidade com que se disseminam. Elas penetram nas plantas através de aberturas naturais como estômatos, lenticelas, hidatódios, aberturas florais etc., e também através de ferimentos. Uma vez no interior das plantas, elas podem se multiplicar nos espaços intercelulares ou no tecido vascular. Os principais sintomas causados por bactérias fitopatogênicas são: anasarca ou encharcamento, mancha, podridão mole, murcha, hipertrofia, cancro, morte das pontas, talo-ôco e canela preta. As principais fontes de inóculo bacteriano são materiais de propagação infectados, solo infestado, restos culturais infectados e plantas infectadas ou infestadas. A disseminação a longa distância ocorre, principalmente, por meio do transporte de órgãos vegetais infectados, como sementes, tubérculos, estacas e frutos. A curta distância, a disseminação ocorre pela água de chuva, vento, insetos vetores, irrigação e pelo homem, através dos tratos culturais (MICHEREFF, 2001). Algumas doenças e sintomas causados por essas bactérias fitopatógenas estão descritas na (tabela 2).

Tabela 2: Doenças e Sintomas causados por bactérias fitopatógenas.

Patógenos	Doenças/Sintomas
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>Carotovorum</i>	Podridão- Mole (PÉROMBELON; KELMAN, 1980). Murchas vasculares com sintomas externos e internos (MICHEREFF, 2001)
<i>Ralstonia solanacearum</i>	
<i>Acidovorax citrulli</i>	Mancha-aquosa-do-melão (OLIVEIRA1995) Podridão negra (MICHEREFF, 2001)
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Campestres</i>	
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Vitícola</i>	Folhas com pontos necróticos, manchas escuras e alongadas nas nervuras e pecíolos das folhas, nos ramos e ráquis dos frutos (NAYUDU, 1972)
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Malvacearum</i>	Lesões nas folhas, rasgadura do limbo foliar e possui aspecto de podridão (CIA; SALGADO, 2005)

2.2 Utilização de extratos vegetais no combate a fitopatógenos

Por volta de 10000 anos atrás, o homem começa sua história na domesticação e cultivo de plantas. Desde então os microrganismos fitopatogênicos já afetavam as culturas da agricultura primitiva (PUNJA; UTKHEDE, 2003, VERMA et al., 2007). Atualmente as doenças de plantas são responsáveis por relevantes perdas na agricultura (PUNJA; UTKHEDE, 2003; LUCON, 2008). Tais perdas podem reduzir o fornecimento de alimento, gerar produtos agrícolas de menor qualidade, elevar os preços e comprometer economicamente o produtor (MONTE, 2001; PAL; GARDENER, 2006).

Na tentativa de se evitar o impacto causado pelas doenças de plantas, o controle destas é tradicionalmente dependente de métodos químicos que nem sempre são eficazes ou economicamente viáveis, além dos riscos que oferecem ao meio ambiente e ao ser humano (MONTE, 2001). O uso indiscriminado e excessivo de agrotóxicos é resultado de uma visão equivocada do processo agrícola, que gerou como consequência, a crescente resistência de pragas, microrganismos fitopatogênicos e ervas daninhas aos produtos sintéticos, aumentando

a dependência de insumos químicos por parte de produtores (COUTINHO, 1996). A redução ou eliminação de produtos químicos no controle de doenças de plantas é uma necessidade atual, econômica e ambiental (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000), o que têm motivado pesquisas a formulação de novos princípios ativos, formando um ciclo vicioso de alto custo econômico e ambiental, contaminação e degradação de solos e águas, redução da biodiversidade e desequilíbrios ecológicos, levando finalmente à insustentabilidade dos sistemas de produção agrícola (COUTINHO, 1996).

Frente a estes problemas, a agricultura alternativa, ou agricultura sustentável, obtêm expressão política e estimula a busca de novas medidas de proteção das plantas contra as doenças (ZADOKS, 1992). A agricultura sustentável ou alternativa, que pode ser definida como aquela agricultura que utiliza recursos naturais racionalmente, visando a suprir as necessidades das gerações presentes e futuras, abrange a utilização de compostos químicos presentes nas plantas e que são resultantes do metabolismo primário e secundário (CRUZ et al., 2000). Dentre esses métodos alternativos, o uso de subprodutos de plantas medicinais, que apresentam em sua composição substâncias com propriedades fungicidas e/ou fungitóxicas (MATOS, 1997), pode ser uma alternativa viável, seja do ponto de vista econômico, seja do ponto de vista ambiental (RODRIGUES et al., 2006).

Compostos secundários presentes no extrato bruto ou óleo essencial em plantas medicinais podem desempenhar funções importantes em interações planta-patógeno, através da ação antimicrobiana direta (MELLO et al., 2006; FRANZENER et al., 2007; SILVA et al., 2008), ou indireta, ativando mecanismos de defesa das plantas que venham a ser tratada com estes compostos (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2005). Substâncias sintetizadas no metabolismo secundário das plantas apresentam ação biológica diretamente contra patógenos ou na indução de resistência de plantas, devido características elicitoras, presente nos princípios ativos de plantas da flora brasileira (SCHWAN-ESTRADA et al., 2003).

O metabolismo secundário é altamente influenciado pelo ambiente, ou seja, dependendo das condições ambientais é desviado para rotas diferenciadas produzindo produtos das mais diversas formas e variações durante a influência desta. Assim sendo, a padronização da composição e dos efeitos de extratos vegetais para o controle pragas e doenças, depende também do conhecimento deste metabolismo em cada espécie a ser utilizada bem como o conhecimento das alterações na sua composição como consequência das variações do meio ambiente (ABREU JÚNIOR, 1998).

O fracionamento dos metabólitos secundários de plantas bem como a determinação da atividade biológica dessas moléculas poderá contribuir para aquisição de maiores

conhecimentos que reforcem sua possível utilização como um método de controle de doença de planta (SCHWAN-ESTRADA et al., 2003).

2.3 Metabólitos secundários de plantas

O metabolismo representa o conjunto de reações químicas que está sempre ocorrendo em cada célula. Os compostos químicos que são formados, degradados ou transformados recebem o nome de metabólitos (SIMÕES et al., 2010), que por sua vez podem ser divididos em metabólitos primários e metabólitos secundários (WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008).

De acordo com Simões et al., (2010) a teoria evolucionista descreve que todos os seres vivos derivaram de um precursor comum, o que explica, por exemplo, porque as principais macromoléculas (carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos) são essencialmente as mesmas, quer num organismo vegetal ou animal. Por serem considerados essenciais à vida e comuns aos seres vivos têm sido definidos como integrantes do metabolismo primário. Metabolismo primário compreende as várias reações químicas envolvidas na transformação de moléculas de nutrientes nas unidades constitutivas essenciais da célula (WATSON, 1965), reações essas que encontram-se envolvidas na manutenção fundamental da sobrevivência e do desenvolvimento celular (DIXON, 2001).

Vegetais, microrganismos e, em menor escala animais, entretanto, apresentam um metabolismo diferenciado (enzimas, coenzimas e organelas) capaz de produzir, transformar e acumular outras substâncias não necessariamente relacionadas de forma direta à manutenção da vida do organismo produtor. Nesse grupo, encontram-se substâncias cuja produção e acumulação estão restritas a um número limitado de organismos, sendo a bioquímica e o metabolismo específico, características únicas, funcionando como elementos de diferenciação e especialização. A todo este conjunto metabólico costuma-se definir como metabolismo secundário, cujos produtos, embora não necessariamente essenciais para o organismo produtor, garantem vantagens para sua sobrevivência e para a perpetuação da espécie em seu ecossistema (SIMÕES et al., 2010).

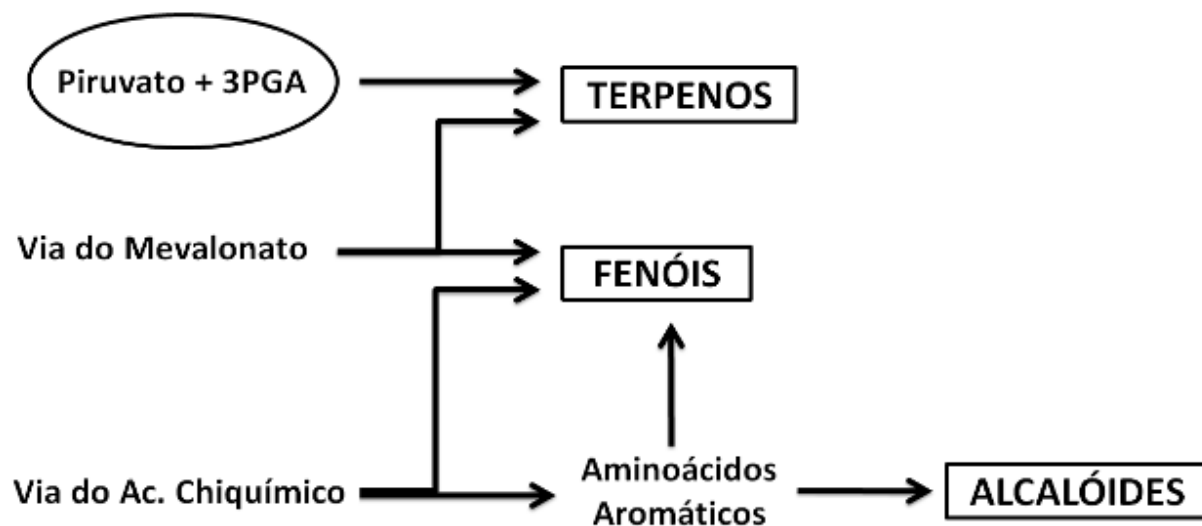
Metabólitos secundários são substâncias produzidas em pequenas quantidades, e, em contraste com os primários, nem sempre estão envolvidos em funções vitais do vegetal ou mesmo presente em todos eles. Além disto, são conhecidos por serem sintetizados em tipos

celulares especializados e em distintos estágios de desenvolvimento, tornando seu isolamento e purificação mais trabalhosos. Estes constituintes químicos são extremamente diversos. Cada família, gênero, e espécie produz uma categoria química característica ou uma mistura delas, e elas, por vezes, podem ser utilizadas como caracteres taxonômicos na classificação das plantas (BELL et al. 1980; WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008).

A produção desses componentes tem como função proteger a planta contra herbívoros, ataque de patógenos, bem como beneficiá-la na competição com outros vegetais. Além disso, favorecem a atração de polinizadores, de animais dispersores de sementes, bem como microrganismos simbiotes. Acrescidos a estes fatores bióticos, a produção de metabólitos secundários também protege o vegetal de influências externas, como temperatura, umidade, proteção contra raios UV e deficiência de nutrientes minerais (ALVES, 2001; PERES, 2004; SIMÕES et al., 2010).

Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: compostos fenólicos, terpenos e alcaloides (Figura1) utilizados na defesa contra estresses bióticos e abióticos (TAIZ; ZEIGER, 2009). Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico e ácido mevalônico. Os terpenos são produzidos a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto). Os alcaloides são provenientes de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico e de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina). Flavonoides, taninos e ligninas fazem parte dos compostos fenólicos; óleos essenciais, saponinas, carotenoides e a maioria dos fitoreguladores são terpenos; nicotina, cafeína e vincristina são alguns exemplos de alcaloides (ALVES, 2001; PERES, 2004).

A síntese de metabólitos secundários é influenciada por diversos fatores. Sazonalidade, ritmo circadiano e desenvolvimento; temperatura; disponibilidade hídrica; radiação ultravioleta; nutrientes; altitude; poluição atmosférica; indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos alteram a sua quantidade e, muitas vezes, até a natureza dos constituintes ativos presentes no tecido (GOBBO NETO; LOPES, 2007). Por isso, como e quando um vegetal é coletado é um dos fatores de maior importância para o estudo desses metabólitos, visto que, variações podem coordenar ou alterar a produção desses compostos (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2000).

Figura 1: Principais vias de biossíntese dos metabólitos secundários.

Fonte: adaptado de Perres, (2004).

Estudos sobre metabólitos foram iniciados pelos químicos orgânicos do século XIX e início do século XX devido às suas diversas aplicações (TAIZ; ZEIGER, 2009), o que até hoje desperta o interesse de pesquisadores de vários campos da ciência que visam neles uma importante fonte de moléculas potencialmente úteis ao homem (SANTOS, 2002). Muitos metabólitos são de valor comercial tanto na área farmacêutica quanto nas áreas alimentícia, agrônoma, cosmética, entre outras (SIMÕES et al., 2010).

A abrangente atuação dos metabólitos secundários dos vegetais mostra a necessidade e a importância do conhecimento sobre esses compostos. Entender a sua atuação pode levar a inúmeras possibilidades de estudos que direcionem a busca pela solução de importantes problemas enfrentados atualmente como a resistência microbiana às drogas sintéticas ou o prejuízo causado pelo uso desordenado de pesticidas (BEZERRA, 2008).

2.3.1 Compostos Fenólicos

Compostos fenólicos são biossintetizados nas plantas por meio de diferentes rotas, razão pela qual constituem um grupo bastante heterogêneo do ponto de vista metabólico. As duas rotas metabólicas básicas são: a rota do ácido malônico e a do ácido chiquímico, sendo esta última participante na biossíntese da maioria dos fenóis vegetais (TAIZ; ZEIGER, 2009).

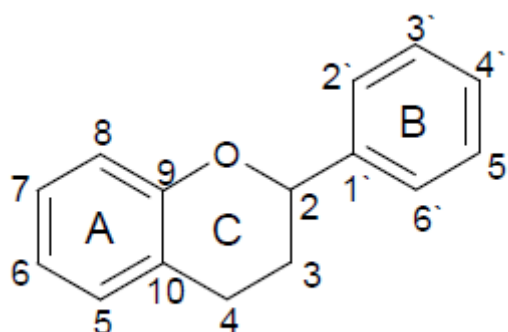
Os compostos fenólicos compreendem desde moléculas simples até outras com alto grau de polimerização (BRAVO, 1998).

Em termos químicos os compostos fenólicos são substâncias que possuem pelo menos um anel aromático no qual, ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (OH-) (CARVALHO et al., 2002). A maioria dos compostos fenólicos ocorre complexado a carboidratos (mono e polissacarídeos), proteínas e outros componentes vegetais (ROBBINS, 2003), o que resulta em uma grande variedade de compostos fenólicos na natureza, os quais são categorizados em classes (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Os principais compostos fenólicos podem ser classificados em várias classes de acordo com o tipo e número de anéis fenólicos, e em subclasses de acordo com as substituições específicas na estrutura básica, associações com carboidratos e formas polimerizadas (FARAH; DONANGELO, 2006). Existem dois grupos desses compostos: os flavonoides e os não flavonoides, sendo que ambos são metabólitos secundários presentes em frutas e vegetais.

2.3.1.1 Flavonoides

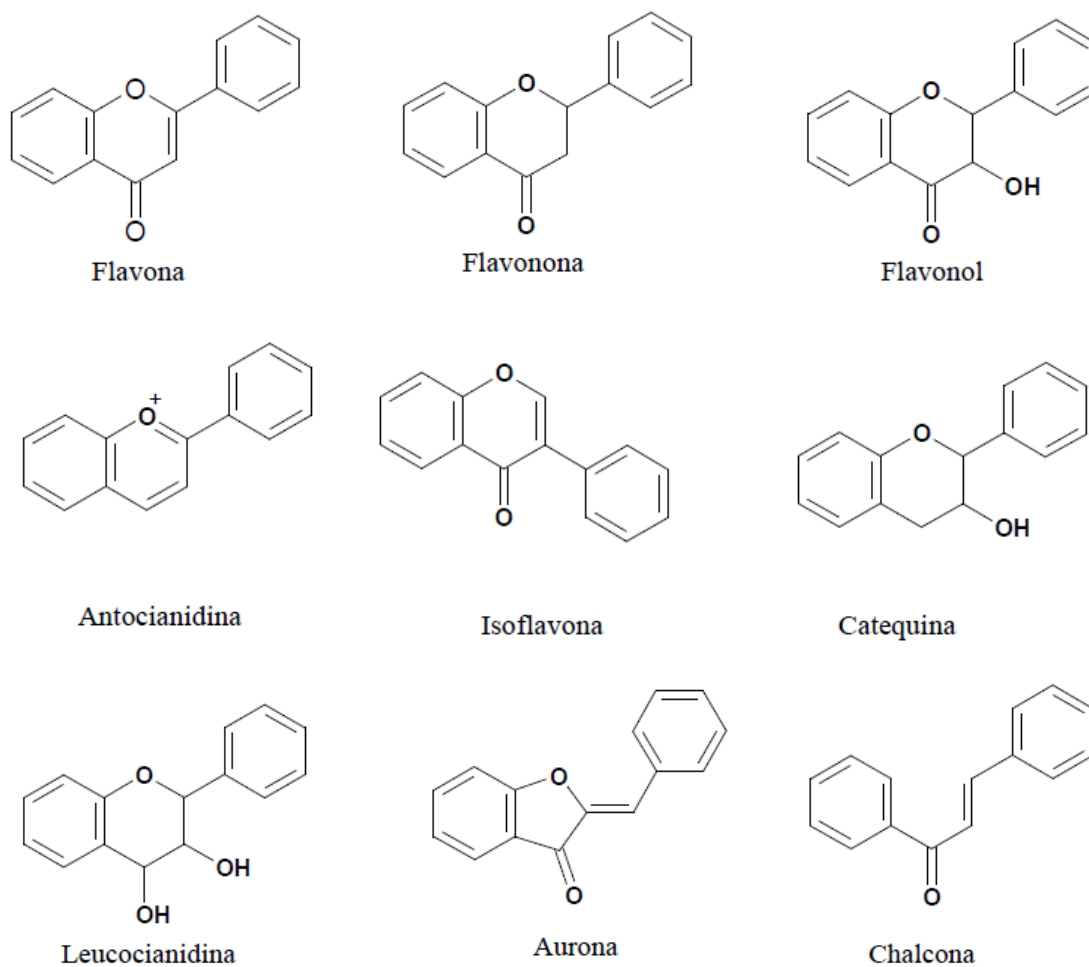
Os Flavonoides constituem um grupo de pigmentos vegetais de ampla distribuição na natureza e sua presença nos vegetais pode estar relacionada com funções de defesa e de atração de polinizadores (SIMÕES et al., 2010). Estes compostos apresentam uma estrutura química difenilpropano (C6-C3-C6), que consiste de dois anéis aromáticos (A e B) unidos por um anel heterocíclico oxigenado (C) (Figura 2). Substituições dos anéis A e B originam diferentes compostos dentro de cada classe de flavonoides (HERTOG et al., 1993; PETERSON; DWYER, 1998; ANGELO; JORGE, 2007).

Figura 2: Estrutura geral dos flavonoides.

Fonte: Simões et. al., (2010)

Flavonoides podem ser originados basicamente por duas rotas bioquímicas diferentes, a do ácido chiquímico e a do acetato, via ácido malônico (QUIDEAU et al., 2011). A via do chiquimato é uma rota metabólica importante para as plantas e é iniciada com a condensação de fosfoenolpiruvato (PEP) e eritrose-4-fosfato, para a formação de ácido chiquímico. A partir deste composto forma-se corismato, molécula precursora dos aminoácidos fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) e triptofano (Trp), sendo que por ação da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) há conversão da fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico. Nas reações enzimáticas subsequentes são originados esqueletos fenilpropanoides que servirão de substrato para a biossíntese de cumarinas, ligninas, flavonas, antocianinas, estilbenos além de outros compostos fenólicos (KOSUGE, 1969; HERRMANN, 1995). A rota do acetato/mevalonato (MVA) também contribui para o processo de síntese de fenóis. A enzima chalcona-sintase (CHS) condensa uma molécula de cumaril-CoA com três moléculas de malonil-CoA (derivadas do acetato), formando tetrahidroxichalcona, substrato intermediário para a biossíntese de outros compostos fenólicos, como as antocianinas, taninos condensados, isoflavonoides e flavonóis (CLAUDOT, 1997).

Os flavonoides apresentam diversidades estruturais, sendo subdivididos em classes (Figura 3) principalmente de acordo com o grau de oxidação e substituição do anel C, enquanto que compostos individuais em uma classe diferem quanto à substituição dos anéis A e B (PIETTA, 2000).

Figura 3: Estrutura genérica das principais classes dos flavonoides.

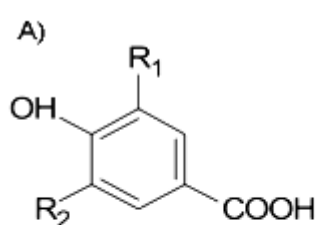
Fonte: Shahidi e Naczk, (2004).

Diversas funções são atribuídas aos flavonoides nas plantas. São importantes agentes de defesa contra insetos e microrganismos fitopatogênicos, como vírus, bactérias e fungos, atuando como defensores naturais das plantas na forma de resposta química à invasão de patógenos (ZUANAZZI, 2000; YAO-LAN et al., 2002), além de proteger os vegetais contra incidências de raios ultravioletas e atrair animais com finalidade de polinização (SIMÕES et al., 2010).

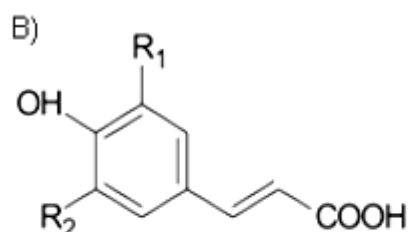
2.3.1.2 Não Flavonoides

A classe dos não flavonoides não apresenta uma estrutura básica em comum e, portanto, é uma classe muito heterogênea (CHEYNIER, 2005). Os não flavonoides são classificados como: os derivados do ácido hidroxibenzoico e os derivados do ácido hidroxicinâmico (figura 4) (ANGELO; JORGE, 2007).

Figura 4: Estrutura química dos Ácidos hidroxibenzoicos (A) e Hidroxicinâmicos (B).



Ácido p-hidroxibenzóico: $R_1 = R_2 = H$
 Ácido protocatecuico: $R_1 = OH, R_2 = H$
 Ácido vanílico: $R_1 = OCH_3, R_2 = H$
 Ácido siríngico: $R_1 = R_2 = OCH_3$



Ácido p-cumárico: $R_1 = R_2 = H$
 Ácido caféico: $R_1 = OH, R_2 = H$
 Ácido ferúlico: $R_1 = OCH_3, R_2 = H$

Fonte: Ângelo e Jorge, (2007).

Os derivados do ácido hidroxicinâmico são compostos fenólicos de ocorrência natural que apresentam uma cadeia lateral com três carbonos (C6–C3), como os ácidos caféico, ferúlico, p-cumárico e sinápico, sendo estes os mais comuns na natureza. Já os derivados dos ácidos hidroxibenzoicos incluem os ácidos gálico, p-hidroxibenzoico, protocatecuico, vanílico e siríngico, os quais apresentam a estrutura comum C6–C1 (BRAVO, 1998; BURNS, 2001; MELO; GUERRA, 2002; BALASUNDRAM, 2006).

2.3.2 Terpenos

Os terpenos, conhecidos também como terpenoides, são compostos que constituem uma classe de produtos naturais obtidos das plantas que apresentam uma grande variedade

estrutural e funcional (RAVEN et al., 2001; PHILLIPS et al., 2008). Todos os terpenoides são formados pela fusão de unidades isoprênicas de cinco carbonos e quando submetidos a altas temperaturas, podem se decompor em isoprenos, o que pode assim referir-se a todos os terpenos como isoprenoides (TAIZ; ZEIGER, 2009).

A classificação dos terpenos pode ser feita de acordo com o número de unidades de isopreno que vão se ligando entre si, orientadas em sentido inverso (cabeça-cauda) podendo ser: hemiterpenoides (C₅), monoterpenoides (C₁₀), sesquiterpenoides (C₁₅), diterpenoides (C₂₀), triterpenoides (C₃₀) e carotenoides (C₄₀) (PERES, 2008; OLIVEIRA et al., 2003). O isopreno (IP) é produzido naturalmente, mas não está envolvido diretamente na formação dos produtos pertencentes a estas classes. As unidades bioquimicamente ativas de isopreno são na realidade o dimetilalil pirofosfato (DMAPP) e o isopentenil pirofosfato (IPP) (NIERO; MALHEIROS, 2007).

Os hemiterpenoides (C₅) são o menor grupo dos terpenos, sendo que o seu representante mais conhecido e estudado é o isopreno, um produto volátil liberado de tecidos fotossinteticamente ativo (CROTEAU et al., 2000). Os monoterpenoides (C₁₀) são compostos por duas unidades de isopreno. Devido a seu baixo peso molecular, costumam ser voláteis, sendo, portanto os constituintes dos óleos essenciais e das essências voláteis, atuando principalmente na atração de polinizadores. Os monoterpenos podem ser isolados através de destilação ou extração e atualmente são conhecidos mais de 1.000 monoterpenoides naturais (OLIVEIRA et al., 2003).

Os sesquiterpenos, em geral, podem atuar como compostos antimicrobianos contra fungos e bactérias (fitoalexinas) e anti-herbivoria (NIERO; MALHEIROS, 2007). Os diterpenoides compreendem um grande grupo de compostos não voláteis, possuindo uma vasta gama de atividades diferentes que incluem os hormônios, ácidos resínicos e agentes anticancerígenos (ROBBERS et al., 1997; CROTEAU et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2003). Peres (2004) descreve que talvez o principal papel desempenhado por um diterpeno seja o das giberelinas, uma importante classe de hormônios vegetais responsável pela germinação de sementes, alongamento caulinar e expansão dos frutos de muitas espécies vegetais.

Os triterpenoides formam os componentes das resinas, látex, ceras e cutícula das plantas. Entre os triterpenos está uma importante classe de substâncias, tanto para vegetais quanto para animais; trata-se dos esteroides, os quais são componentes dos lipídios de membrana e precursores de hormônios esteroides em mamíferos, plantas e insetos. Outra classe importante de triterpenos são as saponinas que desempenham um importante papel na defesa contra insetos e microorganismos (PERES, 2004). Como exemplos de tetraterpenos,

podem ser citados os carotenoides, e as xantofilas, pigmentos intimamente ligados aos processos fotossintéticos e especialmente, na pigmentação de flores e frutos. Existe ainda um grupo complexo de terpenos cujas moléculas são resultantes da síntese de mais de oito unidades de isoprenoides, ou seja, com mais de 40 carbonos na sua estrutura, estes são chamados de politerpenoides, que contêm compostos como coenzima Q10 ubiquinona, poliprenoides e polímeros longos encontrados, por exemplo, no látex (CROTEAU et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2003; ROBBERS et al., 1997).

2.3.3 Alcaloides

Os alcaloides são compostos orgânicos cíclicos que possuem pelo menos um átomo de nitrogênio (N) em um estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada entre os organismos vivos. São compostos farmacologicamente ativos e encontrados predominantemente em angiospermas (HENRIQUES et al., 2002). Estes produtos naturais de baixo peso molecular são derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico, e também de aminoácidos alifáticos como a ornitina e a lisina (PERES, 2004), podendo ser classificados de acordo com o aminoácido precursor e sua forma estrutural (DEWICK, 2002).

Esses metabólitos são de grande interesse para os pesquisadores, devido a heretogeneidade química do grupo, a distribuição restrita na natureza e ao grande potencial bioativo (ROBBERS et al., 1997). São encontrados em aproximadamente 14,2% dos gêneros de plantas superiores (CORDELL et al., 2001), principalmente em diversas partes de um vegetal como em tecidos com crescimento ativo, células epidérmicas e hipodérmicas, bainhas vasculares e vasos lactíferos (SIMÕES et al., 2010).

Apesar da existência de algumas características em comum, particularidades da bioquímica, biologia celular e biologia molecular comprovam as diferenças entre as subclasses de alcaloides. As reações envolvidas na biossíntese dos alcaloides são catalisadas por enzimas estereoespecíficas (formação de somente um isômero, em detrimento de outro arranjo espacial) e regioespecíficas (formação de somente um de dois produtos possíveis), com ação determinada sobre substratos específicos. Os principais aminoácidos envolvidos nestes processos são lisina, ornitina, tirosina e triptofano. Sozinhos ou combinados com

moléculas de secoiridoide, esteroide ou terpenoide, permitem a formação de diversas classes de alcaloides, algumas citadas na tabela 3 (FACCHINI; DE LUCA, 1998; YANG; STÖCKIGT, 2010).

Tabela 3: Principais classes de alcaloides sintetizados pelas plantas.

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

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

Os alcaloides piperidínicos têm como aminoácido precursor a lisina, a partir da qual é formado um anel piperidínico, originado por perda de um grupo carboxílico e um átomo de nitrogênio (GUPTA; SPENCER, 1969). O triptofano é um aminoácido aromático derivado do corismato, sintetizado na via do chiquimato, e que por ação de descarboxilase, origina triptamina. A condensação de triptamina com secologanina produz strictosidina, molécula intermediária na síntese dos alcaloides indólicos. A quinina (*Cinchona officinalis*), camptotecina (*C. acuminata*), estricnina (*Nux vômica*), vincristina e vimblastina (*Catharanthus roseus*) são exemplos deste grupo (EL-SAYED; VERPOORTE, 2007).

Todos os alcaloides isoquinolínicos apresentam em sua composição núcleo tetrahydroisoquinolina, derivado da tirosina (FACCHINI; DE LUCA, 1995). Os alcaloides tropânicos e os alcaloides pirrolidínicos envolvem a participação de precursor comum na biossíntese, a putrescina, diamina derivada da descarboxilação do aminoácido ornitina. (SATO et al., 2001).

2.4 Caatinga

A Caatinga é a única formação vegetacional exclusivamente brasileira e ocupa 11% do território nacional (GIL, 2002); altamente ameaçada, cobre uma área de 60% no nordeste do Brasil, incluindo partes dos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais (SILVA; ALBUQUERQUE, 2005). A Caatinga é dominada por um dos poucos tipos de vegetação cuja distribuição é totalmente restrita ao Brasil (HUECK, 1972; FERRI, 1980), possuindo a vegetação mais heterogênea dentre os biomas brasileiros (RIZZINI, 1997). Esta região é marcada por forte sazonalidade de chuvas (precipitação média anual variando de 500 a 800 mm) concentrada num curto período do ano (3-5 meses) e bastante irregular. Aliado a esta situação, ocorrem altas temperaturas anuais, o que favorece uma elevada evapotranspiração, com valores por volta de 1500 a 2000 mm anuais (SAMPAIO, 1995).

A Caatinga possui a maior parte de seu território ocupado por uma vegetação xerófila, de fisionomia e florística bastante diversificada. As espécies que a caracterizam são, em geral, lenhosas, herbáceas, sendo algumas com espinhos, além das cactáceas e bromeliáceas (RAMALHO et al., 2009). A vegetação da Caatinga é bastante diversificada sendo representada por aproximadamente 4.547 espécies, 159 famílias e 1.141 gêneros (FORZZA et al., 2013) e dessas, 318 espécies são consideradas endêmicas (PRADO, 2003; TABARELLI; SILVA, 2003; GIULIETTI et al., 2004). As principais famílias da Caatinga, no seu sentido mais restrito, considerando números de espécies, de acordo com Giuliatti; Conceição e Queiroz (2006) são: Leguminosae (278 espécies), Convolvulaceae (103 espécies), Euphorbiaceae (73 espécies), Malpighiaceae (71 espécies), Poaceae (66 espécies) e Cactaceae (57 espécies).

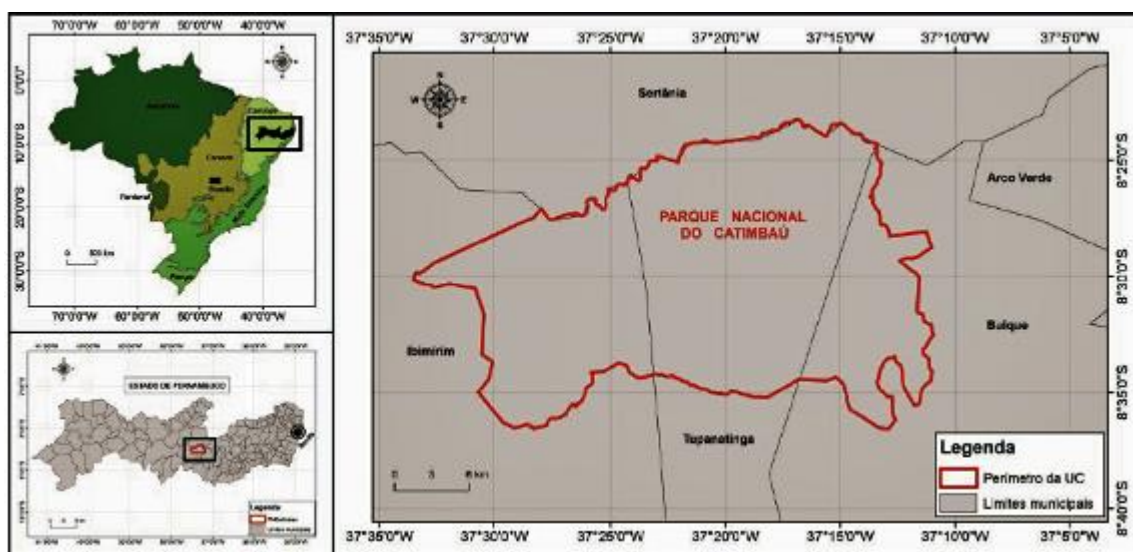
Segundo Albuquerque (2000) e Maia (2004), estudos realizados em alguns estados do Nordeste revelam que a vegetação da Caatinga possui diversas utilidades, além de apresentarem uma grande importância biológica; essa formação vegetacional encerra um considerável potencial econômico, com espécies que podem ser utilizadas como forrageiras, frutíferas, madeiras e de uso medicinais.

Há uma vasta literatura regional sobre o uso das plantas na medicina popular (ALBUQUERQUE, 2000; ALBUQUERQUE; ALMEIDA; ALBUQUERQUE, 2002; ANDRADE, 2002). Algumas dessas plantas medicinais conseguem sobreviver em condições adversas, como as da caatinga, inclusive após longos períodos de estiagem, e em meio a sua

sobrevivência produzem um número maior de metabólitos secundários (SILVA, 2008). Só em Pernambuco, um levantamento preliminar, realizado em apenas quatro municípios, listou mais de 400 plantas com propriedades medicinais (VICTOR, 1990). Em um estudo etnobotânico em uma área de caatinga em Pernambuco, Albuquerque e Andrade (2001) apontaram 36 famílias botânicas com espécies utilizadas como medicamento pela população. Entre as diversas espécies encontradas na Caatinga com potencial medicinal, que são utilizadas para o tratamento de diversas enfermidades destacam-se: a aroeira (*Myracrodruon urundeuva* F.F. & M.M.) (adstringente), angico (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil* Benth.) (adstringente), catingueira (*Poincianella pyramidalis* Tul. L.P. Queiroz) (antidiarréica), pau-ferro (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul.) (antiasmática e antisséptica), juazeiro (*Ziziphus joazeiro* Mart.) (estomacal), jericó (*Selaginella convoluta* Spring.) (diurético), sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia* Benth.) (peitoral), entre outras (AGRA, 1996; EMBRAPA, 2013).

A vegetação da caatinga apesar de apresentar alta diversidade biológica é uma das que mais sofre com a interferência humana no Brasil, e vem suportando contínua devastação. Segundo pesquisas realizadas em 2008 foi verificado que aproximadamente 45% da sua vegetação original já havia sido desmatada (BRASIL, 2010). De acordo com Leal et al., (2005), no bioma caatinga existem 47 unidades de conservação com variados regimes de gerenciamento, que somam 4.956 km², aproximadamente 6,4% do bioma. A Caatinga tem o menor número e a menor extensão protegida dentre todos os biomas brasileiros. Estima-se que cerca de 70% da Caatinga já se encontra alterada pelo homem, e somente 0,28% de sua área se encontra protegida, na forma de unidades e parques de conservação (KIILL, 2005). Dentre essas unidades encontramos o Parque Nacional do Catimbau (PARNA Catimbau), Criado em 13 de dezembro de 2002, está inserido em uma região definida como área prioritária para pesquisa científica (BRASIL, 2002). Encontra-se localizado entre as coordenadas geográficas: 8°24'00" e 8°36'35" S e 37°09'30" e 37°14'40" W, totalizando uma área de 62.300km² que abrange parte dos municípios de Buíque (12.438 ha.); Tupanatinga (23.540 ha) na Microrregião do Vale do Ipanema, e Ibimirim (24.809 ha) na Microrregião do Moxotó, semi-árido Pernambucano (Figura 5) (RODRIGUES, 2006). A topografia é caracterizada por elevações tabulares em forma de mesetas, que podem variar de 600 a 1000m de altitude, possuindo vales abertos com encostas íngremes e topos aplainados, muito recortados e erodidos (RODAL et al., 1998).

Figura 5: Localização do Parque Nacional do Catimbau (PNC), Pernambuco.



Fonte: Melo, (2012).

2.5 *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brennan var . *cebil* (Griseb.) Altschul

A família Fabaceae é a terceira maior família de Angiospermas, com aproximadamente 727 gêneros e cerca de 19.724 espécies (LEWIS et al., 2005). Possui uma grande diversidade morfológica e taxonômica e uma ampla distribuição entre os ecossistemas mundiais (MORIM, 2006). Nesse grupo são reconhecidas 344 famílias agrupadas em duas classes, as monocotiledôneas e as dicotiledôneas, compreendendo mais de 200.000 espécies (JOLY, 2002). As dicotiledôneas compreendem 48 ordens, representadas por 291 famílias dentre as quais se encontra a família Fabaceae (VARELA et al., 2004). A família Fabaceae encontra-se entre um dos grupos botânicos mais avaliados tanto do ponto de vista químico como farmacológico. Espécies dessa família são conhecidas pelo grande número de flavonoides, em especial isoflavonoides, sendo que muitos deles apresentam atividade antimicrobiana (DEWICK, 1994), como também pela presença de alcaloides com atividade cardioativa (CORDELL; QUINN-BEATTIE; FARNSWORTH, 2001). A família Fabaceae é subdividida em três grupos: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Faboideae (= Papilionoideae). Em muitas classificações, estas são consideradas como subfamílias, mas elas são algumas vezes tratadas como famílias separadas (JUDD et al., 1999). De acordo com Lewis et al., (2005) a subfamília Mimosoideae possui cerca de 78 gêneros e 3.270 táxons específicos. Espécies dessa subfamília são distribuídas nos trópicos, subtropicos e regiões de clima

temperado, sendo a América Tropical, África e Ásia-Austrália centros de grande diversidade do grupo, com gêneros e espécies representativas no ecossistema caatinga, no Nordeste brasileiro (SILVA; BARBOSA, 2000).

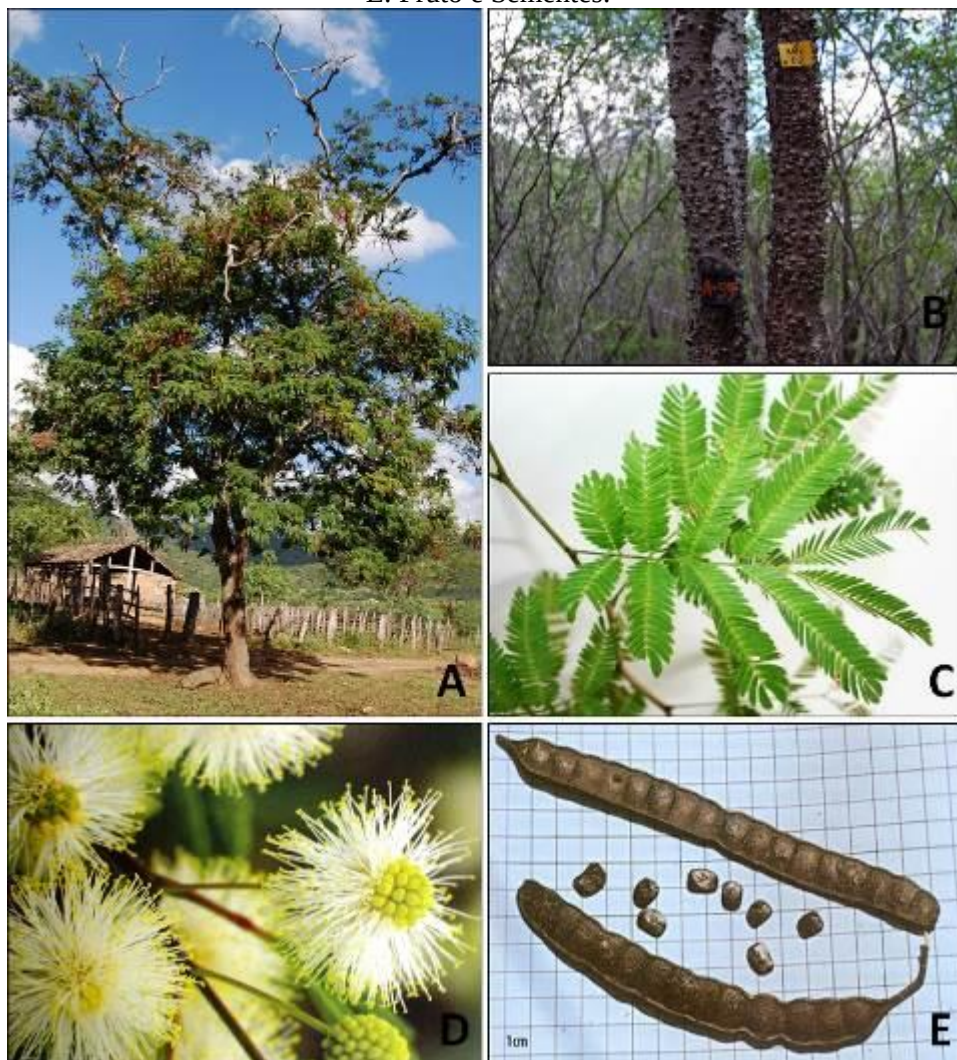
Inicialmente o gênero *Anadenanthera* foi estabelecido em 1955 por J. P. M. Brenan, no qual fazia parte do gênero *Piptadenia*, compreendendo cinco espécies. Brenan fez uma revisão do gênero *Piptadenia* e utilizando critérios como a estrutura das sementes, dividiu este gênero em oito gêneros, dentre eles o gênero *Anadenanthera*. Em 1964 o pesquisador Siri Von Reis Altschul em sua revisão taxonômica estabeleceu que este gênero é composto por duas espécies, *Anadenanthera peregrina* e *Anadenanthera colubrina*, e que cada uma destas espécies possui duas variedades. *Anadenanthera peregrina* é composta por *A. peregrina* var. *peregrina* Altschul e *A. peregrina* var. *falcata* (Benth) Altschul e *A. colubrina* compreende as variedades *A. colubrina* var. *colubrina* Altschul e *A. colubrina* var. *cebil* (Griseb) Altschul. Esta classificação tem por critérios características morfológicas e localização geográfica (TORRES; REPKE, 2006).

A espécie *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb.) Altschul, alvo deste estudo, apresenta diversos sinônimos na nomenclatura científica, bem como inúmeros nomes populares, tais como: angico, nos estados da Bahia, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro e de São Paulo; angico-branco-liso, curupaí e curupaíba, no Estado de São Paulo; angico-cambuí, em São Paulo e no Paraná; angico-côco, angico-escuro, angicoliso e angico-vermelho, no Paraná e no Estado do Rio de Janeiro; aperta-ruão, cambuí, cambuí-branco e cambuí-vermelho, no Rio de Janeiro; cambuí-angico, cauvi, jurema-preta e monjoleiro, no Paraná; angico e angico-de-carçoço em Pernambuco (ALTSCHUL, 1964; CARVALHO, 2002).

A árvore comumente de médio a grande porte, atinge entre 8 a 20 metros de altura, e 30 a 60 cm de diâmetro; podendo chegar até 30 m de altura e 90 cm de diâmetro na floresta estacionail (LORENZI, 1998). No Cerrado e na Caatinga, o angico-vermelho apresenta porte menor, com altura variando de 3 m a 15 m (CARVALHO, 1994). O tronco é reto ou tortuoso, fuste com até 13 m de altura. Copa abaulada com os galhos apresentando acúleos e lenticelas. A casca com espessura de até 30 mm apresenta casca externa de cor geralmente parda-grisácea e acinzentada e com muitas variações em sua morfologia, podendo ser: a) completamente coberta de acúleos, escura, profundamente gretada, áspera, apresentando arestas salientes; b) possuir poucos acúleos; c) lisa, totalmente desprovida de acúleos e ter fissuras longitudinais pouco profundas. Suas folhas são bipinadas com até 30 pares de folíolos opostos e 60-80 pares de foliólulos; pecíolo com glândula preta elipsoide, localizada junto à

inserção (CARVALHO, 1994). Flores milíferas, brancas, arredondadas, diminutas e agrupadas em cachos grandes, com um leve aroma (MAIA, 2004). Os frutos são do tipo folículo, com 10 a 32 cm de comprimento, lisos a reticulados, com pericarpo lenhoso e pouco espesso, mais ou menos achatados, uniloculares, falsamente septados, muitas vezes irregularmente contraídos, de cor marrom escura quando maduros (ALTSCHUL, 1964; OLIVEIRA, 1997). Cada fruto contém de 8 a 15 sementes que são escuras, brilhantes, orbiculares, achatadas, com ala estreita e sem pleurograma, com até 15 mm de comprimento (figura 6) (CARVALHO, 2002).

Figura 6: *Anadenanthera colubrina*; A: Porte da planta; B: Detalhe do Tronco; C: Folhas; D: Flores; E: Fruto e Sementes.



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

A utilização de produtos farmacêuticos da espécie *A. colubrina*, como o medicamento distribuído no Brasil com o nome comercial de Elixir Sanativo® (*Piptadenia colubrina* e associações), por exemplo, origina-se das propriedades adstringentes de sua casca (PAULA, 1981; MONTEIRO et al., 2006). A *A. colubrina* tem uma grande importância econômica, apresenta uma madeira pesada com elevada resistência mecânica e durabilidade sendo utilizada na construção rural, naval e civil, além de possuir um alto teor de lignina, sendo considerada excelente para a produção de álcool e coque (CANDIDO; GOMES, 1996). Seu tronco quando ferido produz em abundância uma goma-resina sem sabor e cheiro, que é indicada no tratamento de várias afecções do sistema respiratório, como tosse e bronquite. A casca, embora amarga, é utilizada como remédio no combate a diarreias, dismenorrias e úlceras, além de ser utilizada como anti-inflamatório (LIMA, 1989), depurativa e adstringente (DESMARCHELIER et al., 1999).

O angico floresce o ano todo, o que faz ser muito utilizado na arborização de parques e praças e é recomendado no reflorestamento de mata ciliar em locais com ausência de inundação. Fornece pólen e néctar sendo importante na apicultura. Suas folhas têm efeito inseticida e quando murchas são altamente tóxicas, podendo causar a morte dos animais que as ingerirem, mas quando fenadas e secas constituem uma boa forragem (LIMA, 1989; CANDIDO; GOMES, 1996; CASTRO; CAVALCANTE, 2010). O uso da resina e folhas, na forma de xarope e chá, é considerado depurativo do sangue (GONZALEZ; SILVA, 1987), ainda é recomendada para reumatismo e bronquite (DESMARCHELIER et al., 1999). Em função da sua ampla utilização, o angico foi apontado como prioridade para conservação *in situ*, na 1ª Reunião Técnica de "Estratégias para a Conservação e Gestão dos Recursos Genéticos de Plantas Medicinais e Aromáticas do Brasil" (VIEIRA et al., 2002).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Contribuir com os estudos das plantas da Caatinga, propondo-se realizar um screening da atividade antimicrobiana fitopatogena dos extratos aquosos de doze espécies de plantas existentes no Semi-árido de Pernambuco e avaliar o potencial antibacteriano e antifúngico fitopatogeno das folhas de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* coletadas nas estações seca e chuvosa, bem como investigar os constituintes químicos existentes nessa planta obtida no Parque Nacional da Serra do Catimbau, reserva da Caatinga localizada no município de Buíque, Pernambuco.

3.2. Específicos

- Realizar o screening da atividade antimicrobiana dos extratos aquosos de doze espécies pertencentes a sete famílias coletadas da região nordeste do Brasil;
- Obter extratos com solventes orgânicos de diferentes polaridades (ciclohexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol) a partir de folhas de *A. colubrina* var. *cebil* coletadas nas estações seca e chuvosa;
- Realizar o screening fitoquímico dos extratos;
- Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos, através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM);
- Avaliar a atividade antifúngica dos extratos, através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM);
- Efetuar a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) dos extratos bioativos.

REFERÊNCIAS

- ABREU JUNIOR, H. **Práticas alternativas de controle de pragas e doenças na agricultura: coletânea de receitas**. Campinas, EMOPI, 1998, 115 p.
- AGRA, M. F. **Plantas da medicina popular dos cariris velhos, paraíba**. Brasil: Editora União, João Pessoa, PB. 1996, 125p.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5. ed. Burlington, MA, Elsevier Academic, 2005. 922p.
- ALBUQUERQUE, U. P. **A etnobotânica no nordeste brasileiro**. In: CAVALCANTI, T. B. E WALTER, B. M. T. **Tópicos atuais em Botânica**. Brasília: EMBRAPA, São Paulo. Sociedade Botânica do Brasil, p. 241-249. 2000.
- ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE L. H. C. Uso de plantas em uma comunidade rural no semi-árido do estado de Pernambuco, município de Alagoinha (Nordeste do Brasil). **Interciência**, v. 26, n. 7, p. 336-346, 2002.
- ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de caatinga no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasílica**, v. 16, n. 3, p. 273-85, 2002.
- ALBUQUERQUE, U.P. **Uso, manejo e conservação de florestas tropicais numa perspectiva etnobotânica: o caso da caatinga no estado de Pernambuco**. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2001.
- ALMEIDA, C. F. C. B.; ALBUQUERQUE, U. P. Uso e conservação de plantas medicinais no estado de Pernambuco: um estudo de caso no Agreste. **Interciência**. v. 26, n. 6, p. 276-285. 2002.
- AL-RAHMAH A. N.; MOSTAFA A. A.; ABDEL-MEGEED A.; YAKOUT S. M.; HUSSEIN S. A. Fungicidal activities of certain methanolic plant extracts against tomato phytopathogenic fungi. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 6, p. 517-524, 2013.
- ALTSCHUL, S. VON R. **A taxonomic study of the genus *Anadenanthera*. Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University**. 1964, 115p.
- ALVES, H. M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, v. 3, p. 10-15. 2001.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

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.

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

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

BATISTA, T. F. C.; ALVES, K. F.; SANTOS-FILHO, B. G.; RODRIGUES, R. C.; OLIVEIRA, F. C.; TAVARES, A. E. B. Ocorrência de fungos e nematoides fitopatogênicos em áreas reflorestadas pela Petrobrás oriundas da exploração petrolífera no município de Coari, Amazônia; **Revista de Ciências Agrárias**. v.47, p. 163-171, 2007.

BELL, E. A.; CHARLWOOD, B.V. **Secondary plant products**, in **Encyclopedia Plant Physiology**. New York: Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, v. 8, 1980.

BEZERRA, D. A. C. **Estudo fitoquímico, bromatológico e microbiológico de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret e *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia Sistemas Agrossilvipastoris no Semi-Árido). Patos, PB: Universidade Federal de Campina Grande, p. 62, 2008.

BRASIL. MMA – Ministério do Meio Ambiente. **Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da caatinga**. Brasília: Universidade Federal de Pernambuco, Conservation International, Fundação Biodiversitas. 2002.

BRASIL. MMA- Ministério do Meio Ambiente. **Monitoramento dos biomas brasileiros: Bioma Caatinga**. Brasília: Secretaria de Biodiversidade e Florestas, IBAMA, PNUD, 2010.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-38, 1998.

BURNS, J. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 49, p. 5797-5808, 2001.

CÂNDIDO, J. F.; GOMES, J. M. **Angico vermelho**. Boletim de Extensão. 3.ed. Viçosa: Imp. Universitária, Editora Vozes/ Universidade de São Paulo, SP.1996.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. **Compostos fenólicos simples e heterosídicos**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 4ªed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade, 2002, p. 443-461.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: EMBRAPA-CNPQ, Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1994. 639 p.

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

CASTRO, A. S.; CAVALCANTE, A. **Flores da caatinga- Caatinga flowers: Angico**. Campina Grande: Instituto Nacional do Semiárido, 2010, 114 p.

CHEYNIER, V. Polyphenols in foods are more complex than often thought Am. **Journal of clinical nutrition**, v. 81, p. 223-229, 2005.

CLAUDOT A. C.; ERNST, D.; SANDERMANN, H.; DROUET, A. Chalcone synthase activity and polyphenolic compounds of shoot tissues from adult and rejuvenated walnut trees. **Planta**, v. 203, n. 3, p. 275-82, 1997.

CORDELL, G. A.; QUINN-BEATTIE, M. L.; FARNSWORTH, N. R. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytherapy Research**, v. 15, p. 183-205, 2001.

COUTINHO, H. L. C. **Diversidade microbiana e desenvolvimento sustentável: diversidade microbiana e agricultura sustentável**. Campinas, São Paulo. 1996.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. **Natural Products (Secondary Metabolites)**. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. New York: Americam Society of Plant Physiologists, 2000, p. 1250-1318.

CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H.; BATISTA, M. A. Plantas medicinais e alelopatia. **Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 15, p. 28-34, 2000.

DESMARCHELIER, C.; ROMÃO, R. L.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the “caatinga” region of northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, n. 1, p. 69-77, 1999.

DEWICK, P. M. **Isoflavonoids**. In: HARBORNE, J. B. **The Flavonoids: advances in research**, London: Chapman & Hall, 1994, p. 117-237.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2. ed. London: John Wiley & Sons, 2002, 517p.

DI STASI, L.C. **Plantas Medicinais: Arte e Ciência**. Um guia de Estudo Interdisciplinar. Editora as Universidade Estadual de Paulista. São Paulo, 1996.

DIXON, R. A. Natural products and plant disease resistance. **Nature**, v. 411, p. 843–847, 2001.

DRUMOND, M. A.; KIILL, L. H. P.; LIMA, P. C. F.; OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, V. R.; ALBUQUERQUE, S. G.; NASCIMENTO, C. E. S.; CAVALCANTE, J. **Estratégias para o uso sustentável da biodiversidade da caatinga**. In: **Seminário para avaliação e identificação de ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade do bioma Caatinga**. Embrapa/Cpatsa, UFPE e Conservation International do Brasil, Petrolina, 2000.

DRUMOND, M. A. Potencialidade das essências nativas do trópico semi-árido. **Congresso Nacional sobre Essências Nativas**. Campos do Jordão, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 766-781, 1982.

DRUMOND, M. A. **Reflorestamento na região semi- árida do Nordeste brasileiro**. In: NOVAIS, A. B.; SÃO JOSÉ, A. R., BARBOSA A. A.; SOUZA, I. V. B. **Reflorestamento no Brasil**. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, BA, 1992, p. 28-34.

EL-SAYED, M.; VERPOOORTE, R. Catharanthus terpenoid indole alkaloids: biosynthesis and regulation. **Phytochemistry reviews**, v. 6, n. 2-3, p. 277-305, 2007.

EMBRAPA. **Arvore do Conhecimento Bioma Caatinga**. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/bioma_caatinga/arvore/CONT000g5twggzh02wx5ok01edq5ssfnhwt.html>. Acesso em 29/05/2013.

FACCHINI, P. J.; LUCA, V. Opium poppy and Madagascar periwinkle: model non-model systems to investigate alkaloid biosynthesis in plants. **The Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 763-84, 2008.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. **Introdução à Análise Fitoquímica**. In: SIMÕES, C. M. O. SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/Universidade Federal do Rio Grande do Sul/Ed. Universidade Federal de Santa Catarina, 2000, p. 163-179.

FARAH, A.; MONTEIRO, M. C.; CALADO, V.; FRANCA, A.; TRUGO, L. C. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. **Food Chem.**, v. 98, p. 373-380, 2006.

FERRI, M. G. **Vegetação brasileira**. Belo Horizonte: Itatiaia Ltda/EDUSP, São Paulo, 1980.

FORZZA R.C.; STEHMANN, J. R.; NADRUZ, M.; COSTA, A.; CARVALHO JÚNIOR, A. A. et al. **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. 2013. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/BemVindoConsultaPublicaConsultar.do>>. Acesso em 29/05/2013.

FRANZENER, G.; MARTINEZ-FRANZENER, A. S.; STANGARLIN, J. R.; CZEPAK, M. P.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S. Atividades antibacteriana, antifúngica e indutora de fitoalexinas de hidrolatos de plantas medicinais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 1, p. 29-38, 2007.

GIL, P.R. Wilderness – **Earth's cast wild places**. CEMEX, México, 2002.

GIULIETTI, A. M.; NETA, A. L. B.; CASTRO, A. A. J. F.; GAMARRA-ROJAS, C. F. L.; SAMPAIO, E. V. S. B.; VIRGÍNIO, J. F.; QUEIROZ, L. P.; FIGUEIREDO, M. A.; RODAL, M. J. N.; BARBOSA, M. R. V.; HARLEY, R. M. **Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga**. In: SILVA, J. M. C.; TABARELLI, M.; FONSECA, M.T. **Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação**. Ministério do Meio Ambiente, Brasília. 2004.

GIULLIETI, A. M.; CONCEIÇÃO, A.; QUEIROZ, L. P. **Diversidade e caracterização das fanerógamas do semiárido brasileiro**. Recife: Associação Plantas do Nordeste, 2006, 488 p.

GOBBO, N. L.; LOPES, N. P. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. **Química Nova**, v. 30, n. 2, 2007.

GONZALEZ, F.; SILVA, M. A survey of plants with antifertility properties described in the South American folk medicine. **Abstract Princess Congress**, v. 10-13 p. 20, 1987.

GUPTA, R. N.; SPENCER, I. D. Biosynthesis of the piperidine nucleus. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 1, p. 88-94, 1969.

HENRIQUES, A. T.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. **Alcalóides: generalidades e aspectos básicos**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 4. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade, 2002, p.651-666.

HERRMANN, K. M. The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary Metabolism. **Plant Physiology**, v. 107, n. 1, p. 7-12, 1995.

HERTOG, M. G. L.; FESKENS, E. J. M.; KROMHOUT, D.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B.; KROMHOUT, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. **The Lancet Journal**, v. 342, n. 8878, p. 1007-011, 1993.

HORST, K. **Westcott's plant disease handbook**. 7. ed. New York: Springer Berlin Heidelberg, 2008.

HUECK, K. **As florestas da América do Sul: ecologia, composição e importância econômica**. São Paulo/ Brasília: Polígono/Editora da Universidade de Brasília. 1972.

J. FLETCHER, J.; BENDER, C.; BUDOWLE, B.; COBB, W. T.; GOLD, S. E.; ISHIMARU, C. A.; LUSTER, D.; MELCHER, U.; MURCH, R.; SCHERM, H.; SEEM, R. C.; SHERWOOD, J. L.; SOBRAL, B. W.; TOLIN, S. A. Plant pathogen forensics: capabilities, needs, and recommendations. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, p. 450-471. 2006.

JACOMINE, P. K. T.; CAVALCANTI, A. C.; BURGOS, N.; SILVEIRA, C. O. Levantamento exploratório – Reconhecimento de solos do estado de Pernambuco. Recife: SUDENE. **Boletim Técnico**, n. 26, p. 1-175, 1973.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal**. 13. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002. 777 p.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M.J. **Plant Systematics: a Phylogenetic Approach**. 3. ed. *United States of America*: Sinauer Associates, 1999, 640 p.

KIILL, L.H.P. **Caatinga: patrimônio brasileiro ameaçado**. Agronline.com.br. Disponível em: <<http://www.agronline.com.br/artigos/artigo.php?id=81>>. Acesso em: 04 maio 2013.

KIM, S.I. et al. Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. **Journal of Stored Products Research**, v. 39, p. 293-303, 2003.

KOSUGE, T. The role of phenolic in host response to infection. **Annual Review of Phytopatology**, v. 7, p. 195-222, 1969.

LEAL, I. R.; SILVA, J. M. C.; TABARELLI, M.; LACHER, J. R.T.E. Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, 2005.

LEWIS, G.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. **Legumes of the world**. England: Royal Botanic Gardens, Kew 2005, 592p.

LIMA, D.A. **Plantas da Caatinga**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1989, 243p.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, v. 1, 1998, 373 p.

LUCON, Cl. M. M. **Trichoderma no controle de doenças de plantas causadas por patógenos de solo**. n. 77, 2008. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=77>. Acesso: 18/06/2013.

MAIA, G. N. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. 1. ed. São Paulo: D&Z Computação Gráfica e Editora, 2004. 413 p.

MATOS, F. J. A. **As plantas da farmácia viva**. Fortaleza: Ed. Universidade Federal do Ceará, v. 1, 1997. 57p.

MELLO, A. F. S.; MACHADO, A. C. Z.; INOMOTO, M. M. Potencial de controle da ervade- Santa-Maria sobre *Pratylenchus brachyurus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 5, p. 513-516, 2006.

MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim Sociedade Brasileira Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 36, n. 1, p. 1-11, 2002.

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

MENDES, B.V. Importância social, econômica e ecológica da caatinga. **Anais do Simpósio Brasileiro sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável do Semi-Árido**. Mossoró. Fundação Vingt-Un Rosado, CEMAD, Mossoró, RN. n. 948, p. 72-121, 1997.

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

MICHEREFF, S. J. **Fundamentos de Fitopatologia: Bactérias como agentes de doenças de plantas**. Universidade Federal Rural de Pernambuco/Departamento de Agronomia, Recife, 2001, p. 44-52.

MONTE, E. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. **International Microbiology**, v. 4, p. 1-4, 2001.

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

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, 2006.

MMA-IBAMA. **MONITORAMENTO DO BIOMA CAATINGA 2002 a 2008**. Monitoramento do Desmatamento nos Biomas Brasileiros por Satélite. Acordo de

Cooperação Técnica MMA/IBAMA. Centro de Sensoriamento Remoto do Ibama - CSR, Agência Brasileira de Cooperação - ABC e Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento - PNUD, **Relatório Técnico**, p.1-58, 2010.

NIERO, R.; MALHEIROS, A. **Principais aspectos químicos e biológicos de terpenos**. In: CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. **Química de produtos naturais: novos fármacos e a moderna farmacognosia**, Editora Universidade do vale do Itajaí/Univali, 2007, p. 239-257.

OLIVEIRA, D. M. T. **Análise morfológica comparativa de frutos, sementes, plântulas e plantas jovens de 30 espécies arbóreas de Fabaceae ocorrentes no Estado de São Paulo**. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 1997.

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

PAL, K. K.; GARDENER, M. C. S. B. **Biological control of plant pathogens**. The plant Health Instructor, p. 1-25, 2006. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/education/AdvancedPlantPath/Topics/biolcontrol/pdfs/PHIBiologicalControl.pdf>>. Acesso: 17/05/2013.

PERES, L. E. P. **Metabolismo Secundário**. Disponível em: <<http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp>>. Acesso em: 15 de Fevereiro de 2008.

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

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. significance. **Revista Nutrition**, v. 56, n. 11, p. 317-33, 1998.

PHILLIPS, M. A.; LEÓN, P.; BORONAT, A.; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M. The plastidial MEP pathway: unified nomenclature and resources. **Trends in Plant Science**, v. 13, n. 12, p. 619-23, 2008.

PIETA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PRADO, D. E. **As caatingas da América do Sul**. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. **Ecologia e conservação da caatinga**. Recife: Editora Universitária da Universidade Federal de Pernambuco, 2003.

PUNJA, Z. K.; UTKHEDE, R. S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 9, p. 400-4007, 2003.

QUIDEAU, S.; DEFFIEUX, D.; DOUAT-CASASSUS, C.; POUYSEGU, L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 3, p. 586-621, 2011.

RAMALHO, C. I.; ANDRADE, A. P.; FÉLIX, L. P.; LACERDA, A. V.; MARACAJÁ, P. B. Flora arbóreo-arbustiva em áreas de caatinga no semiárido baiano, Brasil. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 3, p. 182-190, 2009.

RAVEN, P. H., EVERT, R. F., EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, 906 p.

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

RIZZINI, C.T. **Tratado de fitogeografia do Brasil**. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural Edições Ltda., 1997, 157p.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia & Farmacobiotechnologia**. São Paulo: Editora Premier, 1997. 372p.

ROBBINS, R. J. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2866-2887, 2003.

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

RODRIGUES, E.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S.; FIORI-TUTIDA, A. C. G. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de gengibre e eucalipto *in vitro* e em fibras de bananeira infectadas com *Helminthosporium* sp. **Acta Scientiarum**, v. 28, n. 1, p.123-127, 2006.

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

SAMPAIO, E. V. S. B. A.; SOUTO, M. J. N.; RODAL, A. A. J. F.; CASTRO, C. Caatingas e cerrados do NE: biodiversidade e ação antrópica. **Conferência Nacional, e Seminário Latino-Americano de Desertificação**. ESQUEL/PNUD/Governo do Ceará/ BNB, Fortaleza, CE. 1994, 15p.

SAMPAIO, E.V.S.B. **Overview of the Brazilian Caatinga..** In: BULLOCK, S. H.; MOONEY, H. A.; MEDINA, E. **Seasonally dry tropical forests**. Cambridge: Cambridge University Press. 1995. p. 35-63.

SANTOS, R. I. **Metabolismo Básico e origem dos metabólitos secundários**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 4. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade, 2000, p. 333-365.

SATO, F.; HASHIMOTO, T.; HACHIYA, A.; TAMURA, K.; CHOI, K.; MORISHIGE, T.; FUJIMOTO H.; YAMADA Y. Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 1, p. 367-72, 2001.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R. ; CRUZ, M. E. S. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 554-556, 2003.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R. Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. Cap. 5, p.125-138.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta**, v. 30, p. 129-137, 2000.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in food and nutraceuticals**. Flórida,U.S.A. Boca Raton: CRC Press, 2004, 576 p.

SILA, M. D. **Estudo farmacobotânico de três espécies medicinais da caatinga em Pernambuco**. Dissertação (Mestrado em Botânica) Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008, 74 p.

SILVA, A. C. O.; ALBUQUERQUE, U. P. Woody medicinal plants of the caatinga in the state of Pernambuco (Northeast Brazil). **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, p. 17-26, 2005.

SILVA, C. A.; PAULA JÚNIOR, T. J.; TEIXEIRA, H. Ação antimicrobiana de extratos de plantas medicinais sobre espécies fitopatogênicas de fungos do gênero *Colletotrichum*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 3, p. 57-60, 2008.

SILVA, F. B. R.; RICHÉ, G. R.; TONNEAU, J. P.; SOUZA NETO, C.; BRITO, L. T. L.; CORREIA, R. C.; CAVALCANTI, A. C.; SILVA, F. H. B. B.; ARAÚJO FILHO, J. C.; LEITE, A. P. **Zoneamento agroecológico do Nordeste– Diagnóstico do quadro natural e agrossocioeconômico**. EMBRAPA CPATSA, Petrolina, PE, 1992, 155p.

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

SILVA, M. B.; NICOLI, A.; COSTA, A. S. V.; BRASILEIRO, B. G.; JAMAL, C. M.; SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. ed. 2, Porto Alegre: Editora Universidade/ Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/ Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ Da Universidade Federal de Santa Catarina, 2010, 1102 p.

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

SOARES, J. G.G. **Avaliação do feijão-bravo (*Capparis flexuosa* L.) em condições de cultivo para produção de forragem**. Petrolina: EMBRAPA – CPATSA, 1989, 4p.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Controle de doenças de plantas por extratos de origem vegetal. In: LUZ, W.C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 16, p. 265-304, 2008.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed. 2009.

TORRES, C. M.; REPKE, D. B. **Anadenanthera: Visionary Plant of Ancient South America**. 1. ed. New York: The Haworth Herbal Press, 2006, 340 p.

VARELA, E. S.; LIMA, J. P. M. S.; GALDINO, A. S.; PINTO, L. S.; BEZERRA, W. M.; NUNES, E. P.; ALVES, M. A. O.; GRANGEIRO, T. B. Relationships in subtribe Dicleinae (Leguminosae; Papilionoideae) inferred from internal transcribed spacer sequences from nuclear ribosomal DNA. **Phytochemistry**, v. 65, p. 59-69, 2004.

VERMA, M., BRAR, S. K., TYAGI, R. D., SURAMPALLI, R. Y., VALÉRO, J. R. Antagonistic fungi, *Trichoderma spp.*: Panoply of biological control. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, p. 1-20, 2007.

VICTOR, P. **Plantas medicinais: comparação da flora de quatro municípios de Pernambuco**. Monografia (Graduação). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1990.

VIEIRA R. F.; SILVA, S. R.; ALVES, R. B. N.; SILVA, D. B.; WETZEL, M. M. V. S.; DIAS, T. A. B.; UDRY, M. C.; MARTINS, R.C. Estratégias Conservação e Manejo de Recursos Genéticos de Plantas Medicinais e aromáticas. **Resultados da 1 Reunião Técnica. Embrapa/Ibama/CNPq** Brasília, p.184, 2002.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. Thin layer chromatography in phitochemistry. **Chromatographic Science Series**. v. 99; 2008.

WATSON, J. D. **Molecular biology of the gene**. New York: W. A. Benjamin, 1965.

YANG, L.; STÖCKIGT, J. Trends for diverse production strategies of plant medicinal alkaloids. **Natural Products Reports**, v. 27, n. 10, p. 1469-79, 2010.

YAO-LAN, L.; SHUANG-CHENG, M.; YI-TING, Y.; SHAO-MING, Y.; PAUL, H.B. Antiviral activities of flavonoids and organic acid from *Trollius chinensis* Bunge. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 365-8, 2002.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. **Breve Análise Histórica da Química de Plantas Medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental**. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos, 2001.

ZADOKS, J. C. The costs of change in plant protection. **Journal of Plant Protection**, v. 9, p. 151-159, 1992.

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

CAPÍTULO 1

**ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO AFRICAN JOURNAL OF
MICROBIOLOGY RESEARCH**

Antimicrobial activity of several Brazilian medicinal plants against phytopathogenic bacteria

Cibele Maria Alves^{1,2}, Bruna Mirely da Silva Costa², Ana Paula Sant'Anna^{2,3}, Alexandre Gomes da Silva^{2,3}, Elineide Barbosa de Souza⁴, Márcia Vanusa da Silva⁵, Maria Tereza dos Santos Correia⁵

¹ Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, 1235, 50.670-901, Recife, PE, Brazil

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

³ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, 1235, 50.670-901, Recife, PE, Brazil

⁴ Departamento de Agronomia, Laboratório de Fitobacteriologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brazil.

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

Corresponding author: marcia.vanusa@ufpe.br (M.V. Silva), Avenida Professor Moraes Rêgo, s/n Cidade Universitária, Recife, PE, 50670-420 Pernambuco, Brazil. Tel.: +55(81)21268540; fax: +55(81)21268541.

ABSTRACT

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

Keywords: Caatinga, Atlantic Forest, antibacterial activity, aqueous extract, anti-phytopathogenic activity

1 INTRODUCTION

The plant kingdom represents an enormous reservoir of biologically active compounds with various chemical structures and disease preventive properties (Kavitha; Satish, 2013). The use of plant compounds to treat infection is an ancient practice in a large part of the world, especially in developing countries, where there is dependence on traditional medicine for a variety of diseases (Gangoue-pieboji et al., 2006). According to World Health Organization, medicinal plants would be the best source to obtain a variety of drugs. In recent years, attention has been given to natural systems of treatment for protection and management against pathogens. However, for some decades there was an increasing interest in plant uses and in the detection of their constituents with antibacterial activity (Harvey, 2008). Some phytopathogenic bacteria were reported to be severe phytopathogens, causing damage in carrot, potato, tomato, leafy greens, onion, green pepper, squash and other cucurbits. Furthermore, these phytopathogens cause disease in any plant tissue they invade (Ahameethunisa; Hopper (2010).

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

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

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

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

Brazil is a country rich in biodiversity. To date, 44,813 species are recognized for Brazilian flora: 4,594 Algae, 32,391 Angiosperms, 1,529 Bryophytes, 5,028 Fungi, 30 Gymnosperms and 1,241 Ferns and Lycophytes (List of Species of the Brazilian Flora, 2014). The aim of this work was to investigate the antibacterial activity of twelve species belonging to seven botanical families, collected at Parque Nacional do Catimbau (PNC) and Reserva de Floresta Urbana Mata de Camaçari (RFUMC), located in the Northeastern Brazil (State of Pernambuco, Brazil), against phytopathogenic bacteria.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Collection of Plant material

Twelve species of plant, belonging seven families, were collected from the various phytophysiology at the PNC and RFUMC in Northeastern Brazil (Pernambuco, Brazil) (Table 1). The species were collected according to the indication of popular use by the local community, giving priority to species that had reproductive organs to facilitate their identification. As a part of a wider screening program, plants were randomly collected to increase the chance of finding plants with bioactive extracts. The plants were identified at the

Herbarium from Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA) and the scientific names were checked in the International Plant Names Index (<http://www.ipni.org/ipni/plantnamesearchpage.do>) and Brazilian Flora Checklist (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/ConsultaPublicaUC.do>). Each collected plant sample was oven dried at 45°C with forced air for 72h. The dry materials were ground to a fine powder.

2.2 Preparation of aqueous plant extracts

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

2.3 Test microorganisms

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

2.4 Determination of Minimum Inhibitory and Minimum Bactericidal Concentrations

Micro-dilution susceptibility assay was performed using the NCCLS method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal

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

3 RESULTS AND DISCUSSION

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

Phytopathogenic bacterial infections are among agricultural practices concerns, given that some strains are responsible for great sickness and losses in appropriate climatic conditions. *Acidovorax*, *Pectobacterium*, *Ralstonia* and *Xanthomonas* are among the main

phytopathogenic bacterial genera. Plants and plant products have shown to be useful candidates for prevention and control of phytopathogenic bacteria. Several studies have shown that the crude extracts and purified components of plants possess inhibitory activity against plant pathogenic bacteria.

Plant extracts are rich in many phytochemicals which are the cause of their bioactivities. The mechanism of action of many antimicrobials is complex and may not be the consequence of their action on a single target. In addition, the phenomenon of membrane blebbing has been observed with several antimicrobial agents (Epand et al., 2008). For example, phenolic compounds make their actions through different mechanism, which includes membrane disruption, proteins binding, inhibition of proteins synthesis, enzymes inhibition, production of cell wall complexes, formation of disulfide bridges and intercalation with cell wall and/or DNA, among others (Bozdogan and Appelbaum, 2004). In the same manner, the antimicrobial action of alkaloids could be throughout intercalation with cell wall and/or DNA constituents; while, terpenoids display their action through membrane disruption mechanisms (Cowan, 1999).

The antimicrobial activity evaluated in this work could be attributed to the presence of different phytochemicals in variable amounts in plant extracts. The assayed antimicrobial activity from the plant species depends on the botanical species, the age, the part of the plant studied as well as the solvent used for the extraction procedures (Mahida and Mohan, 2006).

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

The results of the present investigation are successful in identifying the antibacterial activity of selected medicinal plants which will help in further identifying the nature of the

bioactive principle and its solubility, isolation and characterization of the active principle responsible for the activity.

All plants used in this study have not been tested before as inhibitor of phytopathogenic bacteria, therefore, this is a new report.

Field existences of antibiotic resistant phytopathogenic bacteria are increasing in recent years. The World Health Organization (WHO) banned many agriculturally important pesticides due to wide range of toxicity against non-target organisms including humans which are known to cause pollution problem (Barnard et al., 1997). Some of the developing countries are still using these pesticides despite their harmful effects. Exploitation of naturally available chemicals from plants, which retard the reproduction of undesirable microorganism, would be a more realistic and ecological method for plant protection and it will have a prominent role in the development of future commercial pesticides (Verma and Dubey, 1999; Gottlieb et al., 2002). Many reports of antibacterial activity of plants extract against human pathogens and their pharmaceutical application are available (Cowan, 1999; Gibbons, 2005), but not much has been done on the antibacterial activity of plants extract against plant pathogens (Satish et al., 1999). This is mainly due to lack of information on the screening/evaluation of diverse plants for their antibacterial potential.

Considering the rich diversity of Brazilian flora, it is expected that screening and scientific evaluation of plant extracts for their antimicrobial activity may provide new antimicrobial substances; hence in the present investigation the antibacterial investigation of all plants has been demonstrated for the first time against phytopathogenic bacteria. Thus the present study reveals that *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*, *Croton corchoropsis* and *Eugenia brejoensis* is a potential candidate plant that could be successfully exploited for management of the diseases caused by different phytopathogens which are known to cause many diseases in wide variety of crops, causing considerable losses in yield and quality in an eco-friendly way.

These results and the encouraging percentage of plants with antibacterial activity (85% in this research) confirmed that plant extracts originated from northeaster from Brazil can be

used directly to develop new and effective classes of natural bactericide to control severe bacterial diseases. These findings persuaded us to continue screening more plant species.

4 ACKNOWLEDGEMENTS

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

REFERENCES

- Agra MF, Freitas PF, Barbosa-Filho JM 2007a. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn.* 17: 114-140.
- Agra MF, Silva KN, Basílio IJLD, França PF, Barbosa-Filho JM 2008b. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn.* 18: 472-508.
- Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, Jajurul MHA, Ghafoor K, Norulaini NAN, Omar AKM (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials. A review. *J. Food Eng.* 117: 426-436.
- Biyiti LF, Meko DJL, AmvamZollo PH (2004). Recherche de l'activité antibactérienne de quatre plantes médicinales Camerounaises. *Pharmacologie et Medecine Traditionnelle en Afrique* 13: 11-20.
- Bozdogan B, Appelbaum PC (2004). Oxazolidinones: activity, mode of action, and mechanism of resistance. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 23: 113-119.
- Bylka W, Szauffer-Hajdrych M, Matalawska I, Goslinka O (2004). Antimicrobial activity of isocytiside and extracts of *Aquilegia vulgaris* L. *Lett. Appl. Microbiol.* 39: 93-97.
- Choi NH, Choi GJ, Jang KS, Choi YH, Lee SO, Choi JE, Kim JC (2008). Antifungal activity of the metanol extract of *Myristica malabarica* fruit rinds and the active ingredients malabaricones against phytopathogenic fungi. *Plant. Pathol. J.* 24: 317-321.

Cowan MM (1999). Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev. 12: 564-582.

Curtis H, Noll U, Stormann J, Slusarenko AJ (2004). Broad spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. *Physiol Mol Plant Path.* 65: 79-89.

Daferera DJ, Ziogas BN, Polissiou MG, (2000). Analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. J. Agri. Food Chem. 48: 2576-2581.

Davidson PM, Parish ME (1989). Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. Food Technol-Chicago. 43: 148-155.

Duke SO (1990). Natural pesticides from plants. In: Nanick J, Simon JE Advances in new crops. Timber Press, Portland. USA. 511–517.

Epand RM, Epand RF, Savage PB (2008). Ceragenins (cationic steroid compounds), a novel class of antimicrobial agents. Drug News Perspect. 21: 307-311.

Gangoue-pieboji J, Pegnyemb DE, Niyitegeka D (2006). The *in-Vitro* Antimicrobial Activities of Some Medicinal Plants from Cameroon. Ann. trop. med. Parasitol. 100: 273-243.

Iorizzi M, Lanzotti V, De Marino S, Zollo F, Blanco-Molinas M, Macho A, Munoz E (2002). New glycosides from *Capsicum annuum* L. var. *acuminatum*. Isolation, structure determination, and biological activity. J. Agric. Food Chem. 49: 2022-2029.

Kapoor A (2001). Neem: The wonder plant. Pesticides Information. 27: 33-34.

Kilani, A.M. (2006). Antibacterial assessment of whole stem bark of *Vitex doniana* against some Enterobacteriaceae. Afr J Biotechnol. 5: 958-959.

Kurita N, Makoto M, Kurane R, Takahara Y (1981). Antifungal activity of components of essential oils. Agric. Biol. Chem. 45: 945-952.

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

Mahida Y, Mohan JSS (2006). Screening of Indian plant extracts for antibacterial activity. Pharm. Biol. 44: 627-631.

Nwachukwe EO, Umechurma CI (2001). Antifungal Activities of Some Leaf Extracts and Seed Borne Fungi of African Yam Bean Seeds, Seed Germination and Seed-ling Emergence. J. Appl. Sci. Environ manage. 5: 29-32.

Rastogi RP, Mehrotra BN (2002). Glossary of Indian Medicinal Plants. National Institute of Science communication, New Delhi, India.

Santo PRV, Oliveira ACX, Tomassini TCB (1990). Controle Microbiológico de Produtos Fitoterápicos. Rev. farm. bioquim. 31: 35- 38.

Seed-ling Emergence (2001). J Appl Sci Environ Manag. 5: 29-32.

Shimpi SR, Bendre RS (2005). Stability and antibacterial activity of aqueous extracts of *Ocimum canum* leaves. Indian Perfumer. 49: 225-229.

Shirsat RP (2008). Screening of anti-phytopathogenic activity of *Terminalia thorelii*. Ethnobotanical leaflets. 12: 538-541.

Tepe B, Donmez E, Unlu M, Candan F, Daferera D, Vardar-Unlu G (2004). Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). Food Chem. 84: 519-525.

Table 1: Plants employed in this study and their ethnobotanical information.

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

Table 1: Continued...

Family/Species	Voucher	Common name	Distribution	Traditional uses of plants
Euphrobiaceae				
<i>Croton nummularius</i> Baill.*	IPA 85734	Alecrim	Caatinga and Cerrado	A decoction of leaves is used as antiseptic against dermatitis (Oral communication).
<i>Jatropha mutabilis</i> (Pohl)Baill. ^Δ	IPA 84054	Pinhão-bravo, pinhão manso	Caatinga and Cerrado	The latex is used to treat snake bites (Agra et al. 2007; Agra et al. 2008).
Myrtaceae				
<i>Eugenia brejoensis</i> Mazine *	IPA 84033	Cutia	Atlantic Forest	Used in folk by practitioners the infusion of the fleshy leaves for the treatment of pain and fever (Oral communication).
<i>Eugenia candolleana</i> DC *	IPA 84346	Murta	Atlantic Forest, Caatinga and Cerrado	Essential oil possess antinociceptive and anti-inflammatory properties (Guimarães et al. 2009). Used in folk by practitioners the infusion of the fleshy leaves for the treatment of pain and fever (Oral communication).
Turneraceae				
<i>Turnera cearensis</i> *	IPA 85143	-	Atlantic Forest and Caatinga	Against amenorrhea and dysmenorrhea. A decoction of a handful in a liter of water (Oral communication).

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

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

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

CAPÍTULO 2

6.1 ARTIGO A SER SUBMETIDO AO CROP PROTECTION

Antimicrobial activities of leaf extracts of *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* Griseb. Altschul (Fabaceae: Mimosoideae) against some plant pathogenic bacteria and fungi

Cibele Maria Alves^{1,2}, Alexandre Gomes da Silva^{2,3}, Elineide Barbosa de Souza⁴, Janaína Viana de Melo⁵, Wolfgang Harand⁶, Maria Tereza dos Santos Correia⁷, Márcia Vanusa da Silva⁷

¹ Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, 1235, 50.670-901, Recife, PE, Brazil

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

³ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, 1235, 50.670-901, Recife, PE, Brazil

⁴ Departamento de Agronomia, Laboratório de Fitobacteriologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brazil.

⁵ INT/NE - CETENE – Instituto Nacional de Tecnologia, Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste. Laboratório de Microscopia. Av. Professor Luiz Freire, 01, Cidade Universitária, 50740-540, Recife, PE

⁶ INT/NE - CETENE – Instituto Nacional de Tecnologia, Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste. Laboratório da Central Analítica. Av. Professor Luiz Freire, 01, Cidade Universitária, 50740-540, Recife, PE

⁷ Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, 1235, 50.670-901, Recife, PE, Brazil

Corresponding author: marcia.vanusa@ufpe.br (M.V. Silva), Avenida Professor Moraes Rêgo, s/n Cidade Universitária, Recife, PE, 50670-420 Pernambuco, Brazil. Tel.: +55(81)21268540; fax: +55(81)21268541.

ABSTRACT

What is currently raised as a new approach in the management of plant diseases is developing and formulation of plant base biopesticides. The objective of present study is to evaluate the antibacterial and antifungal effects of organic extracts of leaf of *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*, collected from the northeastern of Brazil at dry and rainy season for anti phytopathogenic activity against six economically important phytopathogenic fungi and six economically important phytopathogenic bacteria. Antibacterial and antifungal activities of the organic extracts were studied by MIC and MBC/MFC. All organic extracts were active against all bacteria and fungi evaluated. According to these results, we conclude that the flora in the northeastern of Brazil can be regarded as a rich source of plants with antibacterial activity. Additionally, scanning electron microscopy was used to observe morphological changes of the bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* treated with the cyclohexane extracts of dry season. Possible mechanisms of the antibacterial action were also discussed.

Key words: Caatinga, antibacterial activity, antifungal activity, anti-phytopathogenic activity, scanning electron microscopy.

1 INTRODUCTION

Plant diseases caused by plant pathogenic fungi, bacteria, viruses, viroids, virus-like organisms, phytoplasmas, protozoa, nematodes and parasitic plants are one of the major problems of crop loss (Kotan et al., 2010).

The chemical control of these pathogens is responsible for the increase in the productivity and quality of the crop but it is inappropriate and nondiscriminatory use has put human and animal health at risk, as well as contaminating the environment (Pandy, 2003; Kumar et al., 2007). In an attempt to modify this condition, some alternative methods of control have been adopted. Within this context is the utilization of plant extracts which are natural sources of antimicrobial substances, regarded as safe and degraded by natural soil microbes; they do not pose any health residual or environmental problems at any concentration which they are used (Kim et al., 2004; Yang et al., 2010).

Plant secondary metabolites, such as essential oils and plant extracts are known to possess insecticidal, antifungal, acaricidal, antibacterial and cytotoxic activities (Tepe et al., 2004). Therefore, they have been intensively screened and applied in pharmacology, pharmaceutical botany, medical and clinical microbiology, plant pathology and food preservation (Daferera et al., 2000).

Some plant extracts (Alves et al., submited) showed activity against a wide range of phytopathogenic bacteria. Among the different screened plant extracts, those from *Anadananthera colubrina* var. *cebil* showed high levels of antimicrobial activity towards plant pathogens (Alves et al., submited).

A. colubrina var. *cebil* (Griseb.) Altschul, known in northeastern Brazil as "angico" or "angico de caroço", for example, is largely used in rural constructions, as an energy source, as well as in popular medicines (Albuquerque and Andrade, 2002a, 2002b). In light of its ample use, "angico" was indicated as high priority for in situ conservation at the 1st Technical Reunion for "Strategies for the Conservation and Management of the Genetic Resources of Medicinal and Aromatic Plants in Brazil" (Vieira et al., 2002).

"Angico" belongs to the family Fabaceae and is widely distributed in the caatinga. The tree grows to between 5 and 20 meters tall, and the trunk has large numbers of conspicuous thorns (characteristic of this species) (Silva and Barbosa, 2000) (Figure 1). It is used in traditional medicine to treat respiratory problems and inflammations, as well as in industry for tanning leather (Maia, 2004).

Considering these, a detail investigation was: (1) to determine conducted to test the efficacy of the different organic solvent extracts of leaves of *A. colubrina* var. *cebil* harvest at dry and rainy season against important phytopathogenic bacteria and fungi; (2) to identify the principal class of bioactive components in the organic extracts contributing to its antibacterial properties and (3) to observe morphological changes of the bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* treated with the cyclohexane extracts of dry season.

2.2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Collection of plant materials

Leaves of *A. colubrina* var. *cebil*, free from diseases, were collected from Catimbau National Park, Northeastern Brazil in January and June (dry season and rainy season). A voucher specimen of the plant is deposited in the Herbarium IPA of Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA). The leaves collected were oven dried at 45°C with forced air for 72h. The 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

The powdered of angico was subjected to soxhlet extraction using solvents in elutropics series cyclohexane, chloroform, ethyl acetate and metanol. A hundred grams of the powered samples were packed in muslin cloth and used for extraction by soxhlet apparatus at a temperature below the boiling temperature of each solvent. All samples were refluxed until saturation (24 h). After 24 hours, the extracts were filtered using Whatman filter paper No: 1. In all cases, solvents were pulled out and separately concentrated to dryness in a rotary evaporator at 45°C under reduced pressure and the extracts were stored at -10°C. The residue was dissolved in sterile dimethylsulfoxide (DMSO-9:1) in 50 mg/ml concentration. The extract was filtered using 0.22 micro filter (Type GV- Millipore) and stored at 4°C for further antimicrobial activity study.

2.3 Phytochemical screening

To identify the phytochemical derivatives in the extracts, standard phytochemical screening was performed (Harborne, 1973; Trease and Evans, 1983). Alkaloids test was performed by Dragendorff's and Meyer's tests, amino acids by ninhydrin, carbohydrates by Barfoed's and Fehling tests, flavonoids by FeCl₃, Pew's and Shinoda's tests, glycosides by Killer-Killanis test, saponin by frothing test, tannins by FeCl₃ and lead acetate & terpenoids by Salkowski test. The test for hydrolysable tannins, phlobatannins, phenol, quinones and volatile oils were also carried out as in literature (Sofowora, 1993; Krishnaiah, 2009).

2.4 Test microorganisms

Plant pathogenic bacteria such as *Acidovorax citrulli*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Ralstonia solanacearum* and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* were collected from the culture collection of Department of Agronomy, Federal University of Pernambuco, Brazil. All the test bacterial species were maintained on nutrient agar media.

The six phytopathogenic fungi used during the growth experiments were as follows: *Acidovorax citrulli*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. The samples of mycelium necessary for the in vitro experiments, were taken from cultures grown in slants and kept at 26721C on Potato Dextrose Agar (PDA, Difco).

2.5 Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentrations (MBC)

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

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

A microplate method, as previously described (Eloff, 1998), was used with slight modifications to determine minimal inhibitory concentration (MIC) values of plant extracts. Plant extracts were serially diluted, ranging from 1/2 up to a 1/100 dilution from the crude

extract. In each well, 100 μ L of each extract dilution was mixed with 100 μ L of the fungal spore suspension (2×10^6 spores mL⁻¹ in fresh PDB). The microplates were incubated for 2-3 d at 27 °C with daily monitoring. All experiments were done in triplicate. The MIC readings were performed spectrophotometrically with a microplate reader at 595 nm. MICs values were calculated by comparing growth in control wells and the extract blank, which consisted of uninoculated plates. The MIC of the extracts was defined as the lowest concentration of plant extract that caused growth inhibition of more than 90% at 48 h, as compared to the control.

The in vitro fungicidal activity (MFC) was determined described by Espinel-Ingroff et al. (2002). After 72 h of incubation, 20 μ L was subcultured from each well that showed no visible growth (growth inhibition of over 98%), from the last positive well (growth similar to that for the growth control well), and from the growth control (extract-free medium) onto PDA plates. The plates were incubated at 27 °C until growth was seen in the growth control subculture. The minimum fungicidal concentration was regarded as the lowest extract concentration that did not yield any fungal growth on the solid medium used.

2.7 Preparation of Samples for Scanning Electron Microscopy and Transmission Electron Microscopy

Xanthomonas campestris pv. *campestris* cells after incubation (6 h at 29°C) were fixed (2.5% glutaraldehyde/4% paraformaldehyde in 0.1 molL⁻¹ phosphate buffer, pH 7.2), pos-fixed (1% osmium tetroxide/0.8% potassium ferricyanide/5 mmol L⁻¹ CaCl₂ in 0.1 mmol L⁻¹ cacodylate buffer), dehydrated (graded acetone series) and embedded using an epoxy-embedding medium kit (Fluka, Switzerland). Ultrathin sections were stained with lead citrate and uranyl acetate and observed by TEM. For SEM, bacterial cells were processed as describe above and allowed to adhere onto a poly-L-lysine-coated coverslip for 5 min at room temperature. The cells were dehydrated (graded ethanol), critical-point dried, attached to aluminium mounting stubs, sputter coated with 20 nmolL⁻¹ gold and imaged with a Quanta 200 F (FEI company).

3. RESULTS

The antibacterial activity of *A. colubrina* var. *cebil* leaf extracts were examined against five phytopathogenic fungi and six phytopathogenic bacteria causing damage in major crops (Setubal et al., 2005), respectively. The extractions were carried out using cyclohexane, chloroform, ethyl acetate and methanol solvents. The ethanol and methanol extracts gave the high yield of 2.3% (% concentration w/v) and hexane gave 1.6% w/v. While, other extracts provide much low yield of 0.6% w/v in soxhlet and flask extraction procedures. The

antibacterial activity of the organic solvent extracts showed varying magnitudes of inhibition patterns with standard positive control depending on the susceptibility of the tested microorganism.

All the plant extracts tested showed antibacterial activity (Table 1, Table 2, Table 3 and Table 4); however, the plants differ in their activities against the micro-organisms tested. Results obtained in the current investigation revealed that studied *A. colubrina* var. *cebil* extracts possess potential antibacterial and antifungal activity against entire tested organisms, albeit cyclohexane and ethyl acetate extracts of rainy and dry season was found to have shown the strongest and broadest spectrum against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

Phytochemical test were carried out on the *A. colubrina* var. *cebil* extracts to determine the natural bioactive compound. By studying the presence of phytochemical in *A. colubrina* var. *cebil*, the medicinal value of the plant can be explained scientifically. The phytochemical screening of extracts showed the presence of major derivatives and their results were summarized (Tables 5 and 6).

The analysis showed the occurrence of flavonoids and reducing sugars in all extracts at dry and rainy season. Coumarins were presente in cyclohexane extract at rainy season. Volatile oils were present in cyclohexane, choroform and ethyl acetate extracts. Surprisingly alkaloids, derivatives of cinnamic acid, antracenic derivatives and hydrolysable tannins were absent in all the extracts at dry and rainy season. Furthermore, alkaloids (Shaheen et al., 2003; Chakraborty and Brantner, 1999), amino acids (Chowdhury et al., 2008), flavonoids (Brandao et al., 1997; Mendoza et al., 1997), phenols (Fernandez et al., 1996), tannins (Akiyama et al., 2001; Amarowicz et al., 2008), terpenoids (Amaral et al., 1998) of various plants extracts proven to be effective antimicrobials (Cowan, 1999).

Further evidence of antibacterial potential of cyclohexane *A. colubrina* var. *cebil* extract has been obtained by TEM study (Figure 2). Untreated cells were studied as a control.

Xanthomonas campestris pv. *campestris* cells treated with cyclohexane *A. colubrina* var. *cebil* extract at MIC level showed considerable morphological alterations in comparison to the control (Figure 2). Control *X. campestris* pv. *campestris* cells appeared intact, separated from each other, turgid, and complete with smooth surface (Figure 2(A and B)) while cyclohexane *A. colubrina* var. *cebil* extract treated cells appeared to be aggregated and partially deformed (Figures 2)(C, D, E and F), respectively.

4. DISCUSSION

Bio control using plant extracts can be achieved by exploiting their antifungal/antibacterial properties. In this study, all the crude extracts used inhibited the *in vitro* growth of all pathogens.

The phytochemical analysis showed the presence of effective biological compounds like flavonoids and triterpenoids these derivatives could be potential alternatives to the traditional chemical control of phytopathogenic bacteria and fungi. Furthermore, the development of natural antimicrobials will help to decrease the negative effects of synthetic drugs. Fractionation and characterization of these active compounds will be the future work to investigate.

The antimicrobial activity evaluated in this work could be attributed to the presence of different phytochemicals in variable amounts in plant extracts (Table 1-4). The assayed antimicrobial activity from the plant species depend on the botanical species, the age, the part of the plant studied as well as the solvent used for the extraction procedures (Mahida and Mohan, 2006).

Field existences of antibiotic resistant phytopathogenic microorganisms are increasing in recent years (Mandavia et al., 1999). WHO banned many agriculturally important pesticides due to wide range of toxicity against nontarget organisms including humans which are known to cause pollution problem (Barnard et al., 1997). Some of the developing countries are still using these pesticides despite their harmful effects. Exploitation of naturally available chemicals from plants, which retards the reproduction of undesirable microorganism, would be a more realistic and ecologically sound method for plant protection and will have a prominent role in the development of future commercial pesticides (Verma and Dubey, 1999; Gottlieb et al., 2002). Many reports of antibacterial activity of plants extract against human pathogens and their pharmaceutical application are available (Cowan, 1999; Cragg et al., 1999; Newman et al., 2000; Gibbons, 2005), but not much has been done on the antibacterial activity of plants extract against plant pathogens (Satish et al., 1999). This is mainly due to lack of information on the screening/evaluation of diverse plants for their antibacterial potential.

The active principles present in plants are influenced by many factors which include the age of plant, extracting solvent, method of extraction and time of harvesting plant materials (Krishnaiah, 2009). Although the result of each plant extract varied from that of the other against same pathogen and also against different pathogens. Some fungi show resistance

against one type of extract, while other type of extract of the same plant shows the best effect against the same fungi.

TEM photomicrographs of untreated *X. campestris* pv. *campestris* cells show a regular outlined cell wall, plasma lemma lying closely to the cell wall (shown by arrows), and regularly distributed cytoplasm (Figure 2(a)). TEM photomicrographs of cyclohexane *A. colubrina* var. *cebil* extract treated bacterial cells revealed the variation in cell wall thickness and internal damages (Figures 2(b) and 2(c)). Methanolic extract treated bacterial cells (Figure 2(b)) showed extensive ultrastructural damages and wide range of abnormalities in comparison to (Figure 2(c)) cells untreated. As shown in (Figure 2), plasma lemma damaged and periplasmic space became larger and irregular in the treated cells. The cytoplasm appeared very dense at certain locations and unsymmetrically distributed in the cell (Figures 2(b) and 2(c)). At certain locations, the leakage of intracellular contents due to damage of cell envelop was also found (Figures 2(b) and 2(c)). This can also result from alteration in membrane permeability leading to draining out of the inner contents while the main structure of the outer membrane still remains intact.

Antimicrobial activity of various terpenes possesses discrete lipophilic characteristics and detectable water solubility may be potentiated by the fact that it can migrate across the aqueous extracellular medium, interact with, and damage lipid membranes. Since the outer layer of the Gram-negative bacteria is composed of lipopolysaccharide molecules and forms a hydrophilic permeability barrier providing protection against the effects of highly hydrophobic compounds (Helander et al. 1998), they may exhibit low sensibility of Gram-negative bacteria to the cytotoxic effect of the highly lipophilic monoterpenes. To the best of our knowledge, it is the first study where author tries to evaluate the ultrastructural changes in bacterial cells due to cyclohexanic *A. colubrina* var. *cebil* extracts.

The fact that the most active extracts showed in this work were active against Grampositive bacteria, is an important aspect, since many of the multidrug-resistant bacteria belong to this category where new chemotherapeutic agents are urgently needed to treat plant diseases. These results also provides valuable information for further isolation and characterization studies of active phytochemicals, necessary for the development of new drugs.

5. CONCLUSIONS

Thus the present study reveals that *A. colubrina* var. *cebil* is a potential candidate plant that could be successfully exploited for management of the diseases caused by different phytopathogenic bacteria and fungi which can to cause many diseases in wide variety of crops, causing considerable losses in yield and quality in an eco-friendly way.

In the present investigations the antibacterial activity of *A. colubrina* var. *cebil* organic extracts against phytopathogenic bacteria and fungi has been demonstrated for the first time.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors express their gratitude to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), to the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) for research Grants and NANOBIOTEC-Brasil from CAPES for financial support. 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).

7. REFERENCES

- Akiyama, H, Fujii, K, Yamasaki, O, Oono, T, Iwatsuki, K, 2001. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 48, 487-491.
- Albuquerque, UP, Andrade, LHC, 2002 a. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de caatinga no Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. *Acta Bot. Bras.* 16, 273-285.
- Albuquerque, UP, Andrade, LHC, 2002b. Uso de recursos vegetais da Caatinga: o caso do agreste do Estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). *Interciencia.* 7, 336-345.
- Amaral, JA, Ekins, A, Richards, SR, Knowles, R, 1998. Effect of selected monoterpenes on methane oxidation, denitrification, and aerobic metabolism by bacteria in pure culture. *Appl Environ Microbiol.* 64, 520-525.
- Amarowicz, R, Dykes, GA, Pegg, RB, 2008. Antibacterial activity of tannin constituents from *Phaseolus vulgaris*, *Fagopyrum esculentum*, *Corylus avellana* and *Juglans nigra*. *Fitoterapia.* 79, 217-219.

Barnard, C, Padgitt, M, Uri, ND, 1997. Pesticide use and its measurement. *International Pest Control*. 39, 161-164.

Brandao, MGL, Krettli, AU, Soares, LSR, Nery, CGC, Marinuzzi, HC, 1997. Antimalarial activity of extracts and fractions from *Bidens pilosa* and other *Bidens* species (Asteraceae) correlated with the presence of acetylene and flavonoids compounds. *J Ethnopharmacol*. 57, 131-138.

Chakraborty, A, Brantner, AH, 1999. Antibacterial steroid alkaloids from the stem bark of *Holarrhena pubescens*. villosum leaves. *J Ethnopharmacol*. 68, 339-344.

Chowdhury, N, Laskar, S, Chandra, G, 2008. Mosquito larvicidal and antimicrobial activity of protein of *Solanum*. *BMC Compl Alt Med*. 8, 62-67.

Cowan, MM, 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin Microbiol Rev*. 12, 564-582.

Cragg, GM, Boyd, MR, Khanna, R, Kneller, R, Mays, TD, Mazan, KD, Newman, DJ, Sausville, EA, 1999. International collaboration in drug discovery and development: the NCI experience. *Pure Appl. Chem*. 71, 1619-1633.

Doss A, Mubarak MH, Dhanabalan R: Antibacterial activity of tannins from the leaves of *Solanum trilobatum* Linn. *Indian J Sci Technol* 2009, 2:41-43.

Fernandez, MA, Garcia, MD, Saenz, MT, 1996. Antibacterial activity of the phenolic acids fractions of *Scrophularia frutescens* and *Scrophularia sambucifolia*. *J Ethnopharmacol*. 53, 11-14.

Gibbons, S, 2005. Plants as a source of bacterial resistance modulators and anti-infective agents. *Phytochemistry*. 4, 63-78.

Gottlieb, OR, Borin, MR, Brito, NR, 2002. Integration of ethnobotany and phytochemistry: dream or reality. *Phytochemistry*. 60, 145-152.

Harborne, J.B., 1973. *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. Chapman and Hall, London.

I. M. Helander, H. L. Alakomi, K. Latva-Kala et al., "Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 46, no. 9, pp. 3590–3595, 1998.

Hernandez, NE, Tereschuk, ML, Abdala, LR, 2000. Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafi Del Valle (Tucuman, Argentina). *J Ethnopharmacol*. 73, 317-322.

Kim YM, Lee CH, Kim HG, Lee HS, 2004. Anthraquinones isolated from *Cassia tora Leguminosae* seed show an antifungal property against phytopathogenic fungi. *J. Agric. Food Chem*. 52, 6096–6100.

Kotan, R, Cakir, A, Dadasoglu, F, Aydin, T, Cakmakci, R, Ozer, H, Kordali, S, Mete, E, Dikbas, N, 2010. Antibacterial activities of essential oils and extracts of Turkish *Achillea*, *Satureja* and *Thymus* species against plant pathogenic bacteria. *J. Sci. Food Agric.* 90, 145–160.

Krishnaiah, D, Devi T, Bono, A, Sarbatly, R, 2009. Studies on phytochemical constituents of six Malaysian medicinal plants. *J Med Plants Res.* 3, 067-072.

Kumar R, Dubey, NK, Tiwari, OP, Tripathi, YB, Sinha, KK, 2007. Evaluation of some essential oils as botanical fungitoxicants for the protection of stored food commodities from infestation. *J. Sci. Food Agric.* 87, 1737–1742.

Mahida, Y, Mohan JSS, 2006. Screening of Indian plant extracts for antibacterial activity. *Pharm. Biol.* 44, 627-631.

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

Mandavia, MK, Gajera, HP, Andharia, JH, Khandar, RR, Parameshwaram, M, 1999. Cellwall degradation enzymes in host pathogen interaction of Fusarian wilt of chicken pea: Inhibitory effects of phenolic compounds. *Indian Phytopath.* 50, 548-551.

Mendoza, L, Wilkens, M, Urzua, A, 1997Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (Asteraceae). *J Ethnopharmacol.* 58, 85-88.

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

Newman, DJ, Cragg, GM, Snader, KM, 2000. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat. Prod. Res.* 17, 215-234.

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

Satish, S, Raveesha, KA, Janardhana, GR, 1999. Antibacterial activity of plant extracts on phytopathogenic *Xanthomonas campestris* pathovars. *Lett Appl Microbiol.* 8, 145-147.

Setubal, JC, Moreira, LM, Silva, AC, 2005. Bacterial phytopathogens and genome science. *Curr Opin Microbiol.* 8, 595-600.

Shaheen, F, Khan, RA, Soobia, A, Khan, SA, Saima, T, Aqeel, A, 2003. New antimicrobial alkaloids from the roots of *Polyalthia longifolia* var. *pendula*. *Planta med.* 69, 350-355.

Silva, LMB, Barbosa, DC, 2000. Crescimento e sobrevivência de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan (Leguminosae), em uma área de Caatinga, Alagoinha, PE. *Acta Bot. Bras.* 14, 251-261.

Sofowora, A, 1993. Recent trends in research into African medicinal plants. J J Ethnopharmacol. 38, 209-214.

Trease, GE, Evans, WC, 1983. Orders and familys of plant in pharmacognosy. Oxford University Press. 12, 343-383.

Verma, J, Dubey, NK, 1999. Prospectives of botanical and microbial products as pesticides of Tomorrow. Curr Science. 76, 172-179.

Vieira, R.F., Silva, S.R., Alves, R.B.N., Silva, D.B., Wetzel, M.M.V.S., Dias, T.A.B., Udry, M.C., Martins, R.C., 2002. Estratégias para Conservação e Manejo de Recursos Genéticos de Plantas Medicinais e Aromáticas. Resultados da 1 Reunião Técnica. Embrapa/ Ibama / CNPq, Brasília.

Yang, X, Ma, X, Yang, L, Yu, D, Qian, Y, Ni, H, 2010. Efficacy of *Rheum officinale* liquid formulation on cucumber powdery mildew. Biol. Cont. 522, 167–173.



Figure 1: *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschul. Caption: 1. General aspect of the species; 2. Detail of the trunk bark; 3. Detail of the bark during regeneration; 4. Use for fences.

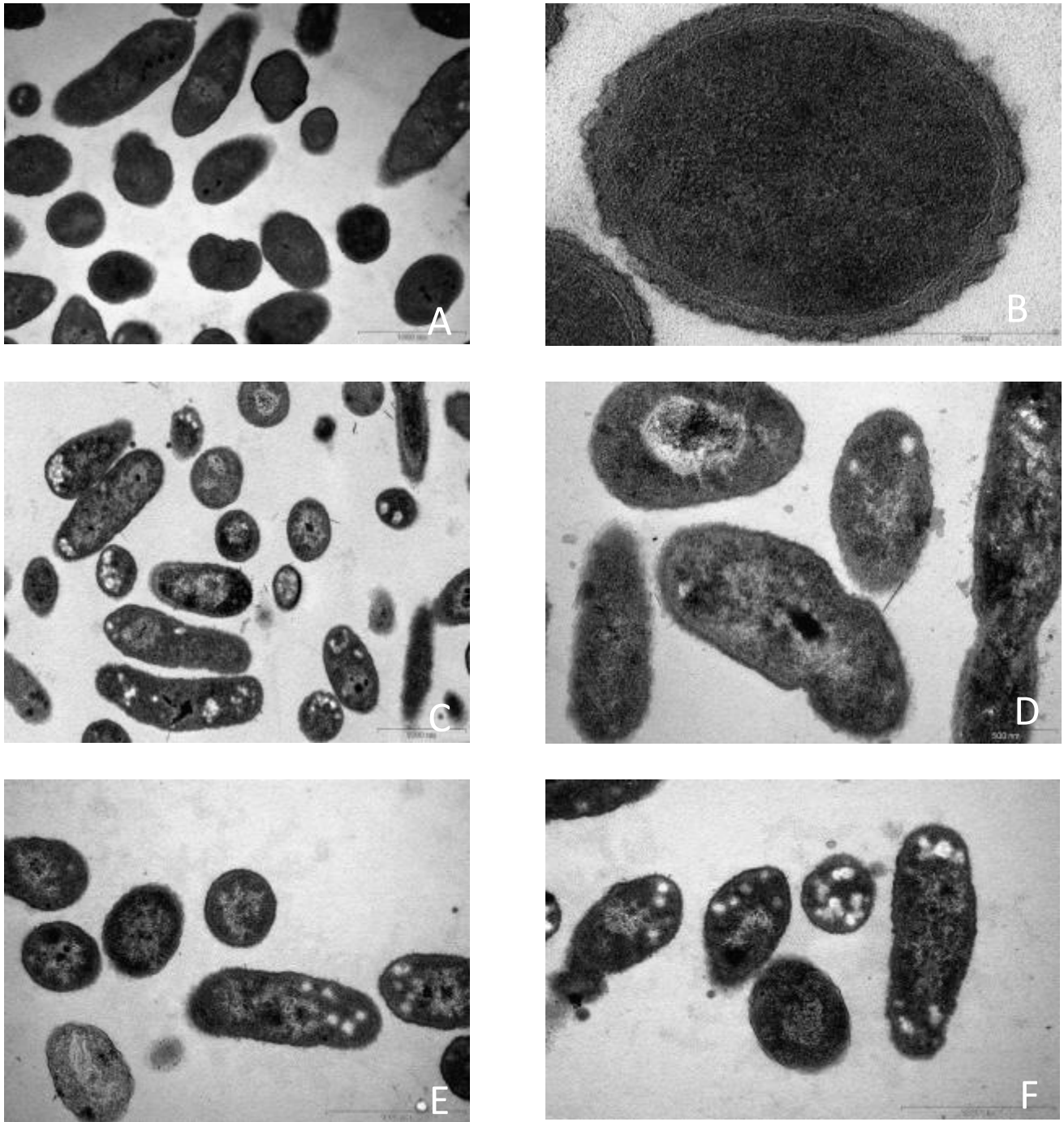


Figure 2: Transmission electron micrographs of untreated and treated *X. campestris* pv. *campestris* cells. (A and B) Untreated cells having a regular outlined cell wall, plasma lemma lying closely to the cell wall, and regularly distributed cytoplasm (shown by arrows). (C and D) Cyclohexanic *A. colubrina* var. *cebil* extract treated cells at 3.12 mg/mL concentration having extensive internal damage, unsymmetrical distributed cytoplasm, and larger and irregular periplasmic space. (E and F) Cyclohexanic *A. colubrina* var. *cebil* extract treated cells at 6.25 mg/mL concentration having extensive internal damage, unsymmetrical distributed cytoplasm, and larger and irregular periplasmic space.

Table 1: Antifungal activity, Minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of organics extracts (cyclohexane, chloroform, etyl acetate and methanol) from *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* harvest at dry season against selected plant pathogenic fungal.

Microorganisms	Extracts												Cercobin		
	CH			CLO			AET			MET					
	MIC	MBC	MBC/MIC	MIC	MBC	MBC/MIC	MIC	MBC	MBC/MIC	MIC	MBC	MBC/MIC	MIC	MBC	MBC/MIC
<i>Aspergillus flavus</i>	6,25	6,25	1	12,5	12,5	1	12,5	12,5	1	12,5	12,5	1	0,12	0,12	1
<i>Fusarium moniliforme</i>	12,5	12,5	1	12,5	25	2	12,5	12,5	1	25	25	1	0,25	0,12	
<i>Fusarium oxysporum</i>	50	25		50	50	1	25	25	1	50	50	1	0,5	0,5	1
<i>Fusarium solani</i>	6,25	12,5	2	6,25	12,5	2	6,25	12,5	2	6,25	12,5	2	0,25	0,25	1
<i>Rhizopus sotolonifer</i>	6,25	6,25	1	12,5	12,5	1	12,5	12,5	1	12,5	12,5	1	0,12	0,25	2
<i>Verticillium lecanii</i>	6,25	6,25	1	6,25	12,5	2	6,25	12,5	2	12,5	12,5	1	0,12	0,25	2

Table 2: Antifungal activity, Minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of organics extracts (cyclohexane, chloroform, etyl acetate and methanol) from *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* harvest at rainy season against selected plant pathogenic fungal.

Microrganism	Extracts												Cercobin		
	CH			CLO			AET			MET					
	MIC	MBC	MBC/MIC	MIC	MBC	MBC/MIC	MIC	MBC	MBC/MIC	MIC	MBC	MBC/MIC	MIC	MBC	MBC/MIC
<i>Aspergillus flavus</i>	12,5	12,5	1	12,5	12,5	1	12,5	12,5	1	12,5	12,5	1	0,12	0,12	1
<i>Fusarium moniliforme</i>	25	50	2	25	25	1	50	50	1	50	50	1	0,25	0,12	
<i>Fusarium oxysporum</i>	50	50	1	50	50	1	50	50	1	50	50	1	0,5	0,5	1
<i>Fusarium solani</i>	6,25	12,5	2	12,5	12,5	1	12,5	12,5	1	12,5	12,5	1	0,25	0,25	1
<i>Rhizopus sotolonifer</i>	12,5	12,5	1	12,5	12,5	1	12,5	12,5	1	12,5	12,5	1	0,12	0,25	2
<i>Verticillium lecanii</i>	6,25	12,5	2	12,5	12,5	1	12,5	12,5	1	12,5	12,5	1	0,12	0,25	2

Table 3: Antibacterial activity, Minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of organics extracts (cyclohexane, chloroform, etyl acetate and methanol) from *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* harvest at dry season against selected plant pathogenic bacterial.

Microrganism	Extracts												Chloramphenicol		
	CH			CLO			AET			MET					
	MIC	MBC	MBC/MIC	MIC	MBC	MBC/MIC	MIC	MBC	MBC/MIC	MIC	MBC	MBC/MIC	MIC	MBC	MBC/MIC
<i>Acidovorax citrulli</i>	0.78	3.12	4	0.78	3.12	4	3.12	12.5	4	6.25	6.25	1	0.009	0.009	1
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	3.12	6.25	2	6.25	6.25	1	12.5	12.5	1	12.5	12.5	1	0.039	0.078	2
<i>Ralstonia solanacearum</i>	3.12	3.12	1	6.25	3.12		3.12	6.25	2	6.25	3.12		0.078	0.156	2
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	0.78	1.56	2	3.12	3.12	1	1.56	1.56	1	1.56	3.12	2	0.019	0.019	1
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>malvacearum</i>	1.56	1.56	1	3.12	6.25	2	3.12	3.12	1	3.12	6.25	2	0.039	0.039	1
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i>	0.78	1.56	2	3.12	3.12	1	1.56	1.56	1	3.12	3.12	1	0.004	0.004	1

Table 4: Antibacterial activity, Minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of organics extracts (cyclohexane, chloroform, etyl acetate and methanol) from *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* harvest at rainy season against selected plant pathogenic bacterial.

Microrganism	Extracts												Chloramphenicol		
	CH			CLO			AET			MET					
	MIC	MBC	MBC/MIC	MIC	MBC	MBC/MIC	MIC	MBC	MBC/MIC	MIC	MBC	MBC/MIC	MIC	MBC	MBC/MIC
<i>Acidovorax citrulli</i>	6.25	6.25	1	3.12	6.25	2	1.56	1.56	1	1.56	3.12	2	0.009	0.009	1
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	12.5	25	2	6.25	12.5	2	3.12	3.12	1	6.25	6.25	1	0.039	0.078	2
<i>Ralstonia solanacearum</i>	6.25	12.5	2	6.25	6.25	1	1.56	3.12	2	3.12	3.12	1	0.078	0.156	2
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	3.12	6.25	2	1.56	3.12	2	0.78	1.56	2	1.56	3.12	2	0.019	0.019	1
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>malvacearum</i>	3.12	6.25	2	3.12	6.25	2	3.12	3.12	1	6.25	6.25	1	0.039	0.039	1
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i>	12.5	12.5	1	3.12	3.12	1	1.56	3.12	2	12.5	12.5	1	0.004	0.004	1

Table 5. Phytochemical screening of *A. colubrina* var. *cebil* extracts harvest at Catimbau National Park at dry season.

Test	Extracts			
	Cyclohexane	Chloroform	Ethyl Acetate	Methanol
Alkaloids	—	—	—	—
Catechin tannins	+	—	+	+
Coumarins	—	—	—	—
Derivatives of cinnamic acid	—	—	—	—
Flavonoids	+	+	+	+
Triterpenoids	+	+	+	—
Reducing sugars	+	+	+	+
Antracenic derivatives	—	—	—	—
Hydrolysable tannins	—	—	—	—

Table 6. Phytochemical screening of *A. colubrina* var. *cebil* extracts harvest at Catimbau National Park at rainy season.

Test	Extracts			
	Cyclohexane	Chloroform	Ethyl Acetate	Methanol
Alkaloids	—	—	—	—
Catechin tannins	—	—	+	+
Coumarins	+	—	—	—
Derivatives of cinnamic acid	—	—	—	—
Flavonoids	+	+	+	+
Triterpenoids	+	+	+	—
Reducing sugars	+	+	+	+
Antracenic derivatives	—	—	—	—
Hydrolysable tannins	—	—	—	—

ANEXOS

Anexo 1: Ficha de Identificação Botânica – FIB.Secretaria de
Agricultura e
Reforma Agrária**HERBÁRIO IPA – DÁRDANO DE ANDRADE LIMA****FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA FIB Nº. 43/2012**

Nº	Nº de Tombo	Família	Nome Científico
01	84039	Fabaceae	<i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i>

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

Dr^a. Rita de Cássia Pereira

Curadora do Herbário IPA

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

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

Recebi em 16/10/2012

Cibele Maria Alves da Silva

Instituto Agrônomo de Pernambuco - IPA

Vinculado à Secretaria de Agricultura e Reforma Agrária

Av. Gal. San Martin, 1371 – Bongi – 50761-000 – Recife – PE – C.P. 1022

CNPJ 10.912.293/0001-37 – PABX: (81) 3184-7200 – Fax: (81) 3184-7211

Home Page: www.ipa.br / E-mail: ipa@ipa.br**IPA – 77 anos semeando conhecimento**

Anexo 2: Autorização para atividades com finalidade científica, emitida pelo Ministério do Meio Ambiente – MMA - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO).



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

Autorização para atividades com finalidade científica

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

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de material botânico	01/2011	12/2014
De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.			

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO 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 da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 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). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

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

Atividades X Táxons

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

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

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

Código de autenticação: 44726333



Página 1/2



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

Autorização para atividades com finalidade científica

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

Registro de coleta imprevista de material biológico

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

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

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

Código de autenticação: 44726333



Página 2/2

Anexo 3:

African Journal Microbiology Research - Instructions for Authors

Introduction

Authors should read the editorial policy and publication ethics before submitting their manuscripts. Authors should also use the appropriate reporting guidelines in preparing their manuscripts.

Research Ethics

Studies involving human subjects should be conducted according to the World Medical Association (WMA) Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects.

Studies involving non human animals should follow appropriate ethical guidelines such as the Animal Welfare Act, The Animals (Scientific Procedures) Act (Amendment) Order 1993, The EU parliament directive on the protection of animals used for scientific purposes, ARRP policies and guidelines, etc.

Reporting guideline

Responsible reporting of research studies, which includes a complete, transparent, accurate and timely account of what was done and what was found during a research study, is an integral part of good research and publication practice and not an optional extra.

See additional guidelines for reporting of health research.

Preparing your manuscript

The type of article should determine the manuscript structure. However, the general structure for articles should follow the IMRAD structure.

Title

The title phrase should be brief.

List authors' full names (first-name, middle-name, and last-name).

Affiliations of authors (department and institution).

Emails and phone numbers

Abstract

The abstract should be less than 300 words. Abstract may be presented either in unstructured or structured format. The keywords should be less than 10.

Abbreviations

Abbreviation should be used only for non standard and very long terms.

The Introduction

The statement of the problem should be stated in the introduction in a clear and concise manner.

Materials and methods

Materials and methods should be clearly presented to allow the reproduction of the experiments.

Results and discussion

Results and discussion maybe combined into a single section. Results and discussion may also be presented separately if necessary.

Disclosure of conflict of interest

Authors should disclose all financial/relevant interest that may have influenced the study.

Acknowledgments

Acknowledgement of people, funds etc should be brief.

Tables and figures

Tables should be kept to a minimum.

Tables should have a short descriptive title.

The unit of measurement used in a table should be stated.

Tables should be numbered consecutively.

Tables should be organized in Microsoft Word or Excel spreadsheet.

Figures/Graphics should be prepared in GIF, TIFF, JPEG or PowerPoint.

Tables and Figures should be appropriately cited in the manuscript.

References

References should be listed in an alphabetical order at the end of the paper. DOIs, PubMed IDs and links to referenced articles should be stated wherever available.

Examples:

Baumert J, Kunter M, Blum W, Brunner M, Voss T, Jordan A, Klusmann U, Krauss S, Neubrand M, Tsai YM (2010). Teachers' mathematical knowledge, cognitive activation in the classroom, and student progress. *Am. Educ. Res. J.* 47(1):133-180.

<http://dx.doi.org/10.3102/0002831209345157>

Christopoulos DK, Tsionas EG (2004). "Financial Development and Economic Growth: Evidence from Panel Unit Root and Cointegration Tests" *J. Dev. Econ.* pp.55-74

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jdeveco.2003.03.002>

Goren A, Laufer J, Yativ N, Kuint J, Ben Ackon M, Rubinshtein M, Paret G, Augarten A (2001). Transillumination of the palm for venipuncture in infants. *Pediatric. Emerg. Care* 17:130-131.

<http://dx.doi.org/10.1097/00006565-200104000-00013> PMID:11334094

Mishra A, Mishra SC (2001). Cost-effective diagnostic nasal endoscopy with modified otoscope. *J. Laryngol. Otol.* 115:648-649.

<http://dx.doi.org/10.1258/0022215011908739> PMID:11535147

Acceptance Certificate

Authors are issued an Acceptance Certificate for manuscripts that have been reviewed and accepted for publication by an editor.

Payment of manuscript handling fee

Once a manuscript has been accepted, the corresponding author will be contacted to make the necessary payment of the manuscript handling fee. Kindly note that on the manuscript management system, the payment option is only enabled for manuscripts that have been accepted for publication.

Proofs

Prior to publication, a proof is sent to the corresponding author. Authors are advised to read the proof and correct minor typographical or grammatical errors. Authors should promptly return proofs to the editorial office.

Publication

Once proofs are received at the editorial office, the manuscripts are usually included in the next issue of the journal. The article will thereafter be published on the journal's website

Publication Notification

After the article is made available on the journal's website, a publication notice is sent to the corresponding author with links to the issue and article.

Anexo 4: Crop Protection- - Instructions for Authors

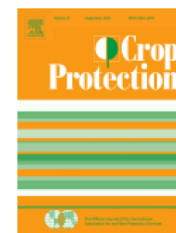


CROP PROTECTION

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

•	Description	p.1
•	Audience	p.2
•	Impact Factor	p.2
•	Abstracting and Indexing	p.2
•	Editorial Board	p.2
•	Guide for Authors	p.4



ISSN: 0261-2194

DESCRIPTION

The [Editors](#) of *Crop Protection* especially welcome papers describing an interdisciplinary approach showing how different **control strategies** can be integrated into practical **pest management** programmes, covering high and low input **agricultural systems** worldwide. *Crop Protection* particularly emphasizes the practical aspects of control in the field and for **protected crops**, and includes work which may lead in the near future to more effective control. The journal does not duplicate the many existing excellent biological science journals, which deal mainly with the more fundamental aspects of plant pathology, applied zoology and weed science. *Crop Protection* covers all practical aspects of **pest**, **disease** and **weed control**, including the following topics:

Abiotic damage
 Agronomic control methods
 Assessment of pest and disease damage
 Biological control
 Biorational pesticides
 Control of animal pests of world crops
 Control of diseases of crop plants caused by microorganisms
 Control of weeds and integrated management
 Economic and social considerations
 Effects of plant growth regulators
 Environmental benefits of reduced pesticide use
 Environmental effects of pesticides
 Epidemiology of pests and diseases in relation to control
 Food safety
 GM Crops, and genetic engineering applications
 Importance and control of postharvest crop losses
 Integrated control
 Interrelationships and compatibility among different control strategies
 Invasive species as they relate to implications for crop protection
 Pesticide application methods
 Pest management
 Resistance management
 Sampling and monitoring schemes for diseases, nematodes, pests and weeds.

The [editors](#) of *Crop Protection* invite workers concerned with pest, disease and weed control to [submit](#) suitable contributions on any topic falling within the aims and scope of the journal.

AUDIENCE

Research workers, project planners, commercial producers.

IMPACT FACTOR

2012: 1.303 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2013

ABSTRACTING AND INDEXING

AGRICOLA
 Agricultural Engineering Abstracts
 Biotechnology Research Abstracts
 Chemical Abstracts
 Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences
 EMBiology
 Elsevier BIOBASE
 Field Crop Abstracts
 GEOBASE
 Helminthological Abstracts
 Horticultural Abstracts
 Index to Scientific Reviews
 Index to South African Periodicals
 Irrigation and Drainage Abstracts
 Plant Breeding Abstracts
 Review of Applied Entomology
 Review of Plant Pathology
 Risk Abstracts
 Science Citation Index
 Scopus
 Soils and Fertilizers

EDITORIAL BOARD

Principal Editors

J. Correll, University of Arkansas, Fayetteville, AR, USA
J.V. Cross, East Malling Research, East Malling, Kent, UK
R.L. Gilbertson, University of California at Davis, Davis, CA, USA
F.P.F. Reay-Jones, Clemson University, Florence, SC, USA
J.C. Streibig, University of Copenhagen, Taastrup, Denmark
S.N. Wegulo, University of Nebraska at Lincoln, Lincoln, NE, USA

Statistical Consultant:

C. Ritz, University of Copenhagen, Frederiksberg C, Denmark

Editorial Board:

X. Chen, Washington State University, Pullman, WA, USA
C.A. Edwards, Ohio State University, Columbus, OH, USA
W. Elmer, Connecticut Agricultural Experimental Station, New Haven, CT, USA
L. Gatehouse, HortResearch Palmerston North, Palmerston North, New Zealand
D.P. Giga, Bulawayo, Zimbabwe
L. Godfrey, University of California at Davis, Davis, CA, USA
A.R. Hardy, Central Science Laboratory, York, UK
J. Hone, University of Canberra, Canberra, ACT, Australia
W.D. Hutchison, University of Minnesota, St Paul, MN, USA
J. Katan, Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel
S. Liu, Nat. Pingtung University of Sci. & Tech., Pingtung Hsien, Taiwan, ROC
G.A. Matthews, Imperial College London, Ascot, UK
P.D. Mitchell, University of Wisconsin at Madison, Madison, WI, USA
S.E. Naranjo, U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), Peoria, IL, USA
R.E.L. Naylor, University of Aberdeen, Aberdeen, UK

J.R. Nechols, Kansas State University, Hays, KS, USA
K.W. Seebold, University of Kentucky, Lexington, KY, USA
P.C. Stevenson, University of Greenwich, Chatham, UK
M.E. Tobin, U.S. Department of Agriculture (USDA), Fort Collins, CO, USA
R.G. Turner, Worlington, Bury St. Edmunds, UK
D. Wright, Imperial College London, Ascot, UK
C. Zhang, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, China

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

The Editors of *Crop Protection* especially welcome papers describing an interdisciplinary approach showing how different control strategies can be integrated into practical pest management programmes, covering high and low input agricultural systems worldwide. *Crop Protection* particularly emphasizes the practical aspects of control in the field and for protected crops, and includes work which may lead in the near future to more effective control. The journal does not duplicate the many existing excellent biological science journals, which deal mainly with the more fundamental aspects of plant pathology, applied zoology and weed science. *Crop Protection* covers all practical aspects of pest, disease and weed control, including the following topics:

Abiotic damage
 Agronomic control methods
 Assessment of pest and disease damage
 Biological control
 Biorational pesticides
 Control of animal pests of crops
 Control of diseases of crop plants caused by microorganisms
 Control of weeds and integrated management
 Economic and social considerations
 Effects of plant growth regulators
 Environmental benefits of reduced pesticide use
 Environmental effects of pesticides
 Epidemiology of pests and diseases in relation to control
 Food safety
 GM Crops, and genetic engineering applications
 Importance and control of postharvest crop losses
 Integrated control
 Interrelationships and compatibility among different control strategies
 Invasive species as they relate to implications for crop protection
 Pesticide application methods
 Pest management
 Resistance management
 Sampling and monitoring schemes for diseases, nematodes, pests and weeds.

The editors of *Crop Protection* invite workers concerned with pest disease and weed control to submit suitable contributions on any topic falling within the aims and scope of the journal.

Types of paper

Contributions falling into the following categories will be considered for publication:

- Perspectives in Crop Protection articles - The editors and members of the editorial board will invite commentary/insight papers on topical issues. Authors should contact the Editors-in-Chief with potential ideas. New data will not be published in commentary papers, but one table or figure to illustrate key points may be included (e.g., pesticide use or crop yield trends). The papers should range from 2000-3000 words or 6-8 double-line spaced manuscript pages (including references cited). The articles will be peer-reviewed with emphasis given to rapid publication.
- State of the art Review articles - Authors should contact the relevant Editor-in-Chief with proposals before submitting.
- Original high-quality Research papers - Preferably no more than 20 double-line spaced manuscript pages, including tables and illustrations.
- Short communications - These should not exceed 6-8 double-line spaced manuscript pages excluding references and legends. Results reported must be based on repeated trials or experiments. Submissions should include a short Abstract not exceeding 10% of the length of the communication and which summarizes briefly the main findings of the work to be reported. The bulk of the text may be in a continuous form but generally will follow the usual format that does not require numbered sections such as Introduction, Materials and Methods, Results, and Discussion. However, a Cover page, Abstract and a list of Keywords are required at the beginning of the communication and Acknowledgements

and References at the end. These components are to be prepared in the same format as used for full-length research papers. Occasionally authors may use sub-titles of their own choice to highlight sections of the text.

- Letters to the Editor - Authors should contact the relevant Editor-in-Chief with a proposal before submitting. Letters should focus on the scientific basis for comment or disagreement with a recently published article in the Crop Protection journal, and be a maximum of 4-5 pages with double-line spacing, and a limited number of relevant citations. Letters will be peer-reviewed, but processed in a timely manner. Upon receipt of a letter that is critical of a previous article in Crop Protection, the author(s) of the previous article will also be invited to submit a rebuttal article; both the original letter and rebuttal letter will be published in the same issue.
- Crop Protection also publishes, book reviews, conference reports and a calendar of forthcoming events. Please contact one of the Editors-in-Chief.

For all article formats, also review recent published examples.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://elsevier6.custhelp.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923/.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open Access and Subscription.

For Subscription articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For Open Access articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for:

Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open Access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An Open Access publication fee is payable by authors or their research funder

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No Open Access publication fee

All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY): lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access.

Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The publication fee for this journal is **\$2500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop <http://webshop.elsevier.com/languageediting/> or visit our customer support site <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Papers will be assigned to the Editors by subject:

Prof. W.D. Hutchison - Biological Control, GM Crops, and Integrated Management of Insect and Mite Pests hutch002@umn.edu

Prof. J.V. Cross - Pesticide Applications, Entomology, Integrated Pest Management, Tropical Pest Management Jerry.Cross@emr.ac.uk

Prof. J. Streibig - Weed science, European horticulture and general agronomy jcs@life.ku.dk

Prof. X Chen - Plant pathology and nematology xianming@wsu.edu

Papers in agricultural economics and vertebrate control will be handled by one of the above Editors.

Repeat experiments. Manuscripts that report original research should not be submitted unless experiments have been repeated **at least twice** or, in the case of field experiments, relate to two seasons. In most cases, three or more replications will be necessary for appropriate statistical analysis. In exceptional circumstances, studies that do not meet these criteria may be acceptable, but the relevant Principal Editor should be consulted prior to submission.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/cropro/>

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of 4 potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Additional information

Review process

All contributions are reviewed by two or more referees to ensure both accuracy and relevance, and revisions to the manuscript may thus be required. On acceptance, contributions are subject to editorial amendment to suit house style. When a manuscript is returned for revision prior to final acceptance,

the revised version must be submitted as soon as possible after the author's receipt of the referee's reports. Revised manuscripts returned after four months will be considered as new submissions subject to full re-review.

PREPARATION

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

• **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature and Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Authors and Editor(s) are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.

All biotica should be identified by their scientific names. The species naming authority should be included with full Latin name at first mention in the abstract and in the body of the paper.

All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

For chemical nomenclature, the conventions of the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed where the compound is novel. For compounds more than two years old please use the approved name as given in the *Pesticide Manual*.

Application of pesticides. Full details must be given of techniques used to apply pesticides (e.g. type of equipment, type of nozzle, pressure, volume of spray, etc.) and of the amount of active ingredient applied per unit area.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible. In principle, variables are to be presented in italics.

Number consecutively any equations that have to be displayed separate from the text (if referred to explicitly in the text).

Subscripts and superscripts should be clear.

Greek letters and other non-Roman or handwritten symbols should be explained in the margin where they are first used. Take special care to show clearly the difference between zero (0) and the letter O, and between one (1) and the letter l.

Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.

Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.

The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Also powers of e are often more conveniently denoted by exp.

Levels of statistical significance which can be mentioned without further explanation are: *P < 0.05, **P < 0.01 and ***P < 0.001.

In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g., Ca²⁺, not as Ca⁺⁺. Isotope numbers should precede the symbols, e.g., ¹⁸O.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume and issue/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
 2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
 3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.
- Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to:

List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>; NLM Catalog (Journals referenced in the NCBI Databases): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>; CAS (Chemical Abstracts Service): via <http://www.cas.org/content/references/corejournals>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Data at PANGAEA

Electronic archiving of supplementary data enables readers to replicate, verify and build upon the conclusions published in your paper. We recommend that data should be deposited in the data library PANGAEA (<http://www.pangaea.de>). Data are quality controlled and archived by an editor in standard machine-readable formats and are available via Open Access. After processing, the author receives an identifier (DOI) linking to the supplements for checking. As your data sets will be citable you might want to refer to them in your article. In any case, data supplements and the article will be automatically linked as in the following example: doi:10.1016/0016-7037(95)00105-9. Please use PANGAEA's web interface to submit your data (<http://www.pangaea.de/submit/>).

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail (the PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use). For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints/myarticlesservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2012 Elsevier | <http://www.elsevier.com>