



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

LUCAS VITOR BATISTA RODRIGUES

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE CITOTÓXICA, ACARICIDA E
ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FLORES DE *Caesalpinia
echinata* (Pau-brasil)**

Recife
2021

LUCAS VITOR BATISTA RODRIGUES

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE CITOTÓXICA E
ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FLORES DE *Caesalpinia
echinata* (Pau-brasil)**

Monografia apresentada a coordenação do curso de Licenciatura em Química da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Licenciado em Química.

Orientador: Prof(a). Dr(a). Claudio Augusto Gomes da Camara

Recife

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

R696c Rodrigues, Lucas Vitor Batista
Composição química, atividade citotóxica, acaricida e antioxidante do
óleo essencial das flores de *Caesalpinia echinata* (Pau-brasil) / Lucas
Vitor Batista Rodrigues. – 2021.
55 f.: il.

Orientador: Claudio Augusto Gomes da Camara.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação – Licenciatura em
Química) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Departamento de Química, Recife, BR-PE, 2021.
Inclui bibliografia.

1. Química orgânica 2. Ácaro de plantas 3. Pau-brasil
4. Essências e óleos essenciais 5. Antioxidantes 6. Inibidores químicos
I. Camara, Claudio Augusto Gomes da, orient. II. Título

CDD 540

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

FOLHA DE APROVAÇÃO

LUCAS VITOR BATISTA RODRIGUES

COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE CITOTÓXICA E
ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FLORES DE *Caesalpinia*
***echinata* (Pau-brasil)**

Aprovado em: 10 de dezembro de 2021.

Banca Examinadora

Claudio Augusto Gomes da Camara – Orientador (a)

Instituição

Marcilio Martins Moraes – 1º avaliador (a)

Instituição

Marcilio Wagner Fontes Silva – 2º avaliador (a)

Instituição

Dedico o meu trabalho a Deus e a Nossa Senhora, a minha família e em especial aos meus pais e irmãos que nunca desistiram de mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, pois Ele quem me deu forças, sabedoria e discernimento para concluir essa graduação.

Agradeço a minha mãe, Sysleide, por todo incentivo e pelo apoio psicológico e emocional, ao meu pai, Marcone, pelo auxílio e conselhos e ao meu padrasto, Wilton, por ajudar a ter pulso firme em decisões difíceis.

Agradeço especialmente a Yanachris, por todo incentivo, perseverança, conselhos e ajuda nas tomadas de decisões, tornando a caminhada mais leve.

Agradeço aos meus avós Fernando, Givanildo, Marinalva e Rita, que foram essenciais na minha caminhada dando total apoio e incentivo, me ensinando a ter fé e perseverança na jornada, aos meus irmãos Anna e Yan, por me motivarem sempre que precisei.

Agradeço ao meu orientador, professor Claudio Camara, por toda paciência que tem comigo e toda contribuição e ensinamento em meu crescimento profissional e ao Prof. Dr. Marcilio por todo auxílio, ensinamentos e conselhos que me deu durante todo o tempo.

Agradeço a todos os meus familiares e amigos que estiveram presentes na caminhada ensinando a ter fé e perseverança, em especial Caio, Carla, Eduarda, Emerson, Fábio, Gabriel, Jessica, Laiza, Paulo, Victor.

Agradeço aos amigos – Alex, Alice, Emmanuelle, José e Thayane – que permaneceram juntos e ajudando até o fim da graduação.

Agradeço também a todos os companheiros e amigos que trabalhei e fiz no laboratório, e que contribuíram com conhecimentos e experiências na vida acadêmica, em especial a Amanda Laysa, Amanda Nunes, Ariadna, Carolina, Mayara, Milena, Rodrigo, Tchiara, Vaneska e seus demais integrantes.

Você vê o que eu sou. O que eu sou é resultado daquilo que faço repetidamente. Excelência não é um ato. É um hábito. (Paulo Muzy)

RESUMO

Pertencente à família Fabaceae a *Caesalpinia echinata* é árvore endêmica do Brasil, conhecida popularmente por pau-brasil. Foi bastante explorada por conta da qualidade de sua madeira e produção de um pigmento vermelho além de muito cobiçada na época colonial para tingimento de tecidos e devido ao extrativismo predatório, quase foi extinta. Atualmente, a madeira é muito procurada para a fabricação de arcos para violinos por sua rigidez e densidade ideais. A escassez de estudos químico e biológico de diferentes partes da planta motivou a realização da composição química do óleo essencial das flores bem como a avaliação das propriedades acaricida, citotóxicidade frente a *Artemia salina* e antioxidante. As flores de *C. echinata* foram coletadas no campus da Universidade Federal Rural de Pernambuco. O óleo essencial (OE) foi extraído a partir da técnica de hidrodestilação por um aparelho do tipo Clevenger modificado. A composição química do óleo foi determinada pela cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas. Contato residual foi o método selecionado para avaliação da ação acaricida sobre *Tetranychus urticae* e o modelo biológico selecionado para avaliação da citotoxicidade foi o de *A. salina*. O OE das flores apresentou como principal classe química os monoterpenos. Os principais compostos identificados foram linalol (32,33%), Z-jasmona (14,94%) e β -E-ocimeno (10,44%). O óleo essencial para o controle do *T. urticae* apresentou uma $CL_{50} = 290,15 \mu\text{L/mL}$. O OE revelou uma capacidade antioxidante para o radical livre DPPH \cdot estimada em $CE_{50} = 364,10 \mu\text{g/mL}$, enquanto para o radical livre ABTS $^{+\cdot}$ foi de $CE_{50} = 280,50 \mu\text{g/mL}$. O óleo exibiu uma $CL_{50} = 97,41 \mu\text{g/mL}$ para o teste de toxicidade frente a *A. salina*. Este estudo mostrou que o óleo essencial das flores de *C. echinata* apresenta propriedade biológica acaricida, antioxidante e citotóxica frente *A. salina*.

Palavras-chave: *Paubrasilia echinata*. *Tetranychus urticae*. Linalol. Atividade antioxidante.

ABSTRACT

Belonging to the family Fabaceae, *Caesalpinia echinata* is a tree endemic to Brazil, popularly known as pau-brasil. It was widely explored because of the quality of its wood and the production of a red pigment and much coveted in colonial times for dyeing fabrics and due to predatory extractivism, it was almost extinct. Currently, wood is much sought after for the manufacture of bows for violins for its ideal stiffness and density. The scarcity of chemical and biological studies of different parts of the plant motivated the chemical composition of the essential oil of the flowers as well as the evaluation of the acaricide, cytotoxicity properties against saline artemia and antioxidant. The flowers of *C. echinata* were collected on the campus of the Federal Rural University of Pernambuco. The essential oil (EO) was extracted from the hydrodistillation technique by a modified Clevenger type apparatus. The chemical composition of the oil was determined by gas chromatography coupled to a mass spectrometer. Residual contact was the method selected to evaluate the acaricide action on *Tetranychus urticae* and the biological model selected for cytotoxicity evaluation was That of *A. salina*. The EO of the flowers presented monoterpenes as the main chemical class. The main compounds identified were linalool (32.33%), *Z*-jasmona (14.94%) and β -*E*-ocimene (10.44%). The essential oil for the control of *T. urticae* presented a $LC_{50} = 290.15 \mu\text{L/mL}$. The EO revealed an antioxidant capacity for the free radical DPPH \cdot estimated at $EC_{50} = 364.10 \mu\text{g/mL}$, while for the free radical ABTS $^{\cdot+}$ was $EC_{50} = 280.50 \mu\text{g/mL}$. The oil exhibited a $LC_{50} = 97.41 \mu\text{g/mL}$ for the toxicity test against *A. salina*. This study showed that the essential oil of *C. echinata* flowers has acaricide, antioxidant and cytotoxic biological property against *A. salina*.

Keywords: *Paubrasilia echinata*. *Tetranychus urticae*. Linalool. Antioxidant activity.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1	Ocorrência confirmada de <i>Caesalpinia echinata</i> no Brasil.....	19
Figura 2	Árvore de <i>Caesalpinia echinata</i> utilizada para coleta do material botânico.....	20
Figura 3	Óleo essencial das flores de <i>Caesalpinia echinata</i>	23
Figura 4	Aparelho do tipo Clevenger modificado.....	24
Figura 5	<i>Tetranychus urticae</i> Koch.....	25
Figura 6	Representação da reação do radical DPPH'	28
Figura 7	Representação da reação do radical ABTS ^{•+}	29
Figura 8	<i>Artemia salina</i> Leach.....	30
Figura 9	Exsicata <i>Caesalpinia echinata</i>	31
Figura 10	Cromatógrafo gasoso e espectrômetro de massas.....	33
Figura 11	Aparelho para atividade antioxidante.....	37
Figura 12	Cromatograma do óleo essencial das flores de <i>Caesalpinia echinata</i>	39

LISTAS DE ESQUEMAS

Esquema 1	Controle para o <i>Tetranychus urticae</i>	27
Esquema 2	Extração e tratamento do óleo essencial.....	32
Esquema 3	Bioensaio de toxicidade sobre o <i>Tetranychus urticae</i>	35
Esquema 4	Bioensaio de citotoxicidade frente a <i>Artemia salina</i>	38

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1	Componentes majoritários do óleo essencial extraído das diferentes partes de <i>Caesalpinia echinata</i>	22
Tabela 2	Estudos que relatam atividades químicas a partir do extrato de <i>Caesalpinia echinata</i>	22
Tabela 3	Composição química do óleo essencial das flores de <i>Caesalpinia echinata</i>	40
Tabela 4	Toxicidade por contato residual (CL ₅₀ em µL/mL) dos inseticidas comerciais sobre o <i>Tetranychus urticae</i>	44
Tabela 5	Constituintes majoritários que possuem atividade acaricida registrada.....	45
Tabela 6	Atividade antioxidante do óleo essencial das flores de <i>Caesalpinia echinata</i>	46
Tabela 7	Atividade citotóxica frente a <i>Artemia salina</i> do óleo essencial das flores de <i>Caesalpinia echinata</i>	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CG	Cromatografia Gasosa
EM	Espectrometria de Massa
OE	Óleo Essencial
UV	Ultravioleta
<i>m/z</i>	Massa/carga
eV	Elétron-volt
LPNBio	Laboratório de Produtos Naturais Bioativos
CL ₅₀	Concentração Letal responsável por matar 50% da população
DL ₅₀	Dose Letal média para reduzir a população em 50%
CE ₅₀	Concentração efetiva média necessária para sequestrar 50% dos radicais
I.C. 95%	Intervalo de Confiança a 95%

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 OBJETIVOS	17
1.1.1 Objetivo Geral.....	17
1.1.2 Objetivos Específicos	17
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1 FAMÍLIA FABACEAE E GÊNERO <i>Caesalpinia</i>	18
2.1.2 <i>Caesalpinia echinata</i>	18
2.1.3 Revisão da literatura sobre o estudo biológico a partir da <i>Caesalpinia echinata</i> com ênfase na composição química do óleo essencial.	21
2.2 METABOLISMO SECUNDÁRIO E ÓLEO ESSENCIAL	23
2.3 PROCESSO DE EXTRAÇÃO POR HIDRODESTILAÇÃO	24
2.4 ÁCARO.....	25
2.4.1 <i>Tetranychus urticae</i> Koch	25
2.4.2 Alvo do <i>Tetranychus urticae</i> Koch.....	26
2.4.3 Controle para o <i>Tetranychus urticae</i> Koch	27
2.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	29
2.6 <i>Artemia salina</i> Leach.....	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.4 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO.....	32
3.5 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAS.....	33
3.6 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (CG-EM)	
34	
3.6.1 Identificação dos componentes do óleo essencial	34
3.6.2 Padrões químicos	35

3.7	CRIAÇÃO DO <i>Tetranychus urticae</i> Koch	35
3.8	BIOENSAIOS	35
3.8.1	Bioensaio de contato residual	35
3.9	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	36
3.9.1	Atividade antioxidante de sequestro de radicais livres DPPH [·]	36
3.9.2	Atividade antioxidante de sequestro de radicais livres ABTS ^{·+}	37
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
3.11	METODOLOGIA DE TOXICIDADE FRENTE A <i>Artemia salina</i> L.	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.4	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FLORES DE <i>Caesalpinia echinata</i>	40
4.5	TOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FLORES DE <i>Caesalpinia echinata</i> SOBRE O <i>Tetranychus urticae</i>	44
4.6	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	46
4.7	ATIVIDADE DE CITOTOXICIDADE FRENTE A <i>Artemia salina</i> Leach	47
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
	REFERÊNCIAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

Muito explorada após a chegada dos portugueses no Brasil, no ano de 1500, a árvore *Caesalpinia echinata* encontra-se atualmente ameaçada de extinção (IBAMA, 1992). Apresentando um papel muito importante no ecossistema, é encontrada frequentemente coberta por orquídeas e outras epífitas. O pau-brasil apresenta uma casca pardo acinzentada, possui um cerne vermelho (LORENZI, 1992) que era utilizada para tingir penas e algodão pelos indígenas, depois do descobrimento dos portugueses passou a ser explorado para tintura de seda, lã e algodão, e tornando-se assim a principal fonte da pigmentação na coloração vermelha no século XVI (OLIVEIRA *et al.*, 2002; ROCHA, 2004). Suas árvores alcançam uma altura de 10-12 m, mas em registros antigos os exemplares desta espécie apresentavam uma altura de 30 m, no período de colonização. Por apresentar uma copa irregular, seus ramos mais novos e as cascas de espécimes mais jovens são repletos de acúleos, com alburno amarelo claro (ARAUJO, 2005).

O pau-brasil pertence à família Fabaceae e possui a característica de produzir óleos essenciais (SPITZER, 2003). A designação “óleo” refere-se a suas propriedades físico-químicas, eles possuem uma alta volatilidade, e dificilmente se solubilizam em água. Enquanto “essencial” se dá por conta de seus aromas que são particulares e agradáveis. Os óleos essenciais são extraídos de matéria prima vegetal, e em sua grande maioria apresentam um sabor picante, uma coloração amarela, possuem instabilidade na presença de luz ou calor. Esses óleos essenciais possuem diversas propriedades por serem uma mistura complexa de substâncias, como capacidade antioxidante, acaricida, antifúngica, entre outras (SIMÕES, 2003).

Os óleos essenciais que podem ser utilizados no controle de diversas espécies de ácaro vêm como uma nova proposta aos acaricidas comerciais, tendo em vista que esses produtos utilizados atualmente são demasiadamente tóxicos tanto para a praga, quanto para os agricultores, consumidores e até mesmo para o próprio solo (CARVALHO *et al.*, 2014). Com uma enorme capacidade de reprodução, o *Tetranychus urticae* Koch, que é conhecido popularmente como ácaro rajado, ou então, ácaro de duas manchas, é uma das pragas que ataca as plantações de *Canavalia ensiformes* L. (feijão-de-porco) e *Carica papaya* L. (mamoeiro), entre outros, e seu controle é feito a partir do inseticida comercial Azamax®, o ácaro rajado pertence à família Tetranychidae (CHIAVEGATO, 1991). Possuindo uma enorme capacidade de reprodução, pode chegar a 20-25 gerações no período de um ano, formando colônias que são compactas e que recobrem com teias. As fêmeas dessa espécie apresentam uma coloração esverdeada com

duas manchas escuras no dorso, seus ovos são esféricos e amarelados, postos entre as teias (MARUYAMA *et al.*, 2002).

Além de possuírem a característica acaricidas, alguns óleos possuem uma capacidade antioxidante, tendo o potencial de modular a atividade enzimática e afetar o comportamento de muitos sistemas celulares, sugerindo que algumas espécies de plantas possuam essa capacidade (DE OLIVEIRA, 2019). Ainda há alguns relatos de testes de citotoxicidade frente a náuplios de *Artemia salina* Leach com diversos óleos essenciais, no intuito de avaliar a toxicidade sobre a *A. salina* além de haver uma relação com ensaio de atividade antitumoral e ser utilizada como biomonitora e bioindicadora da qualidade de água (HARADA, 2009; VARÓ, 2002).

Como uma contribuição para os escassos estudos químicos realizados até o presente momento surge a realização deste trabalho, como fonte para assistir e enriquecer os relatos na literatura para essa árvore tão importante e de grande valor histórico, com isso, o presente trabalho busca realizar as atividades acaricida, citotóxicidade e antioxidante, desempenhadas pelo óleo essencial da *C. echinata*, por sua aplicação em diversos estudos anteriores.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Investigar a composição química e avaliar a propriedade acaricida, antioxidante e a citotoxicidade do essencial das flores de Pau-brasil.

1.1.2 Objetivos Específicos

Identificar os constituintes químicos presentes no óleo essencial de *C. echinata* a partir da técnica de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM);

Determinar a atividade acaricida pelo método de contato residual estimando a CL_{50} do óleo essencial de *C. echinata* sobre a praga *Tetranychus urticae* (ácaro rajado);

Avaliar a atividade antioxidante do óleo essencial das flores de Pau-brasil pelo método de sequestro de radicais livres ABTS^{•+} e DPPH[•];

Estimar a atividade citotóxica frente pelo método de letalidade estimando a CL_{50} do óleo essencial de *C. echinata* sobre as larvas de *Artemia salina*.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 FAMÍLIA FABACEAE E GÊNERO *Caesalpinia*

A Fabaceae ou Leguminosae, conhecida popularmente como a família das leguminosas, é uma família numerosa e de grande importância econômica, já que seus frutos geram grãos consumíveis, como ervilhas, e feijões (MAHBUBUR RAHMAN, 2014). Incluindo árvores, arbustos e plantas herbáceas perenes ou anuais, onde podem ser reconhecidas com facilidade pelos seus frutos (leguminosas) bastante característicos, e suas folhas. Apresenta cerca de 730 gêneros e mais de 19.400 espécies, sendo a terceira família de planta mais abundante, estando atrás apenas da Orchidaceae e Asteraceae. Ela tem uma distribuição natural do tipo cosmopolita, apresentando em diferentes biomas e nos maiores de quase todas as regiões climáticas (JUDD *et al.*, 2002; STEVENS, 2006; MAGALLON, 2001; CHRISTENHUSZ, 2016).

A nomenclatura botânica “Fabaceae” é derivada do antigo nome dado a família “Faba”, o termo latim, traduzido ao português se refere a *fava* ou *feijão*, e o nome Leguminosae remete aos frutos característicos destas plantas, as vagens, sendo aplicado esse nome a todos os membros da família, esses dois nomes são válidos para se referir a família, e estão de acordo com a regra do Código Internacional de Nomenclatura Botânica (REFLORA, 2021). Em relação ao número de espécies o principal gênero da Fabaceae é o *Astragalus*, com cerca de 2000 espécies relatadas, dentre tantos gêneros pertencentes a família, um que se destaca pelas espécies pertencentes é o *Caesalpinia*, com aproximadamente 120 espécies, é este o gênero da espécie a ser estudada no presente trabalho, que tem como basônimo o *Paubrasilia*, gênero o qual pertence a planta pau-brasil (JUDD, 2009).

Paubrasilia é o gênero que origina o nome popular mais conhecido da espécie *Paubrasilia echinata* sendo ele o “Pau-brasil”. Este gênero possui apenas essa espécie relatada na literatura. O *Paubrasilia* está completamente relacionado com um novo sistema de classificação genérica, sendo ele o *Caesalpinia*, com um grande clado Pantropical com cerca de 205 espécies. Indiferem pelo hábito, formando árvores médias e grandes, 5-15 metros de altura (GAGNON *et al.*, 2016).

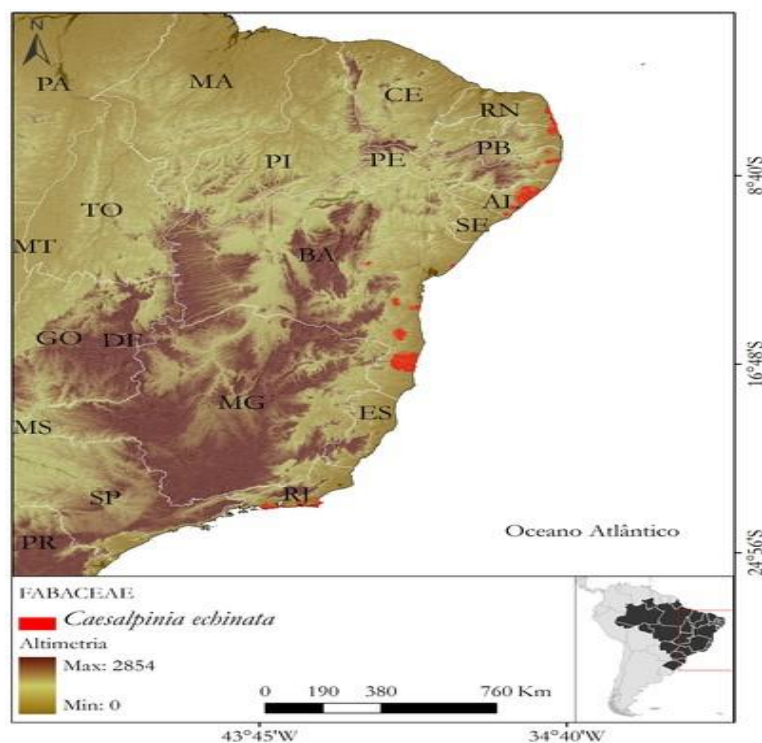
2.1.2 *Caesalpinia echinata*

Classificação taxonômica: Reino: Plantae; Filo: Tracheophyta; Classe: Magnoliopsida; Ordem: Fabales; Família: Fabaceae; Gênero: *Caesalpinia* e Espécie: *Caesalpinia echinata*.

Caesalpinia echinata é uma espécie ameaçada de extinção, juntamente com um ecossistema altamente ameaçado o da mata atlântica (RED LIST, 1998), sendo uma árvore nativa do Brasil, ocorrendo em estados como (Alagoas, Sergipe, Rio de Janeiro, Bahia, Rio Grande do Norte, Paraíba, Espírito Santo, Pernambuco e Minas Gerais) foi a principal fonte de pigmento vermelho no século XVI durante a colonização por Portugal (OLIVEIRA *et al.*, 2002). E também apresenta diversos nomes populares, dentre eles “pau-brasil”, “pau-de-pernambuco”, “ibirapitanga”, “orabutã”, “brasileto”, “ibirapiranga”, “ibirapita”, “ibirapitã”, “muirapiranga”, “pau rosado”, “pau vermelho”, “árvore do brasil” (LORENZI, 2002; IPEF, 2012).

Tendo uma demasiada importância econômica com um histórico de mais de 500 anos de exploração, entre os séculos XVI – XIX houve uma grande extração da madeira para o uso de corante, essa utilização foi cessada por volta de 1800 graças a produção de corantes sintéticos, em contra partida a extração do pau-brasil começou a ser realizada para a confecção de arcos para violino. Sendo estimado que por volta de 100 anos foi reduzido a população desta árvore em 50% (CNCFLORA, 2013). Possui um valor de potencial econômico através de construções, carvão, uso de resina, como decoração na arborização urbana, na época colonial um corante era extraído sendo utilizado para tingir tecidos. Atualmente tem sua madeira empregada mundialmente na confecção de arcos para instrumentos de corda por apresentar características de ressonância única, além de densidade, durabilidade, e estética que a torna ideal para o uso (ANGYALOSSY, 2005).

Alguns estudos genéticos recentemente realizados mostram algumas diferenças anatômicas e morfológicas, a espécie apresenta pelo menos três ecotipos diferentes, que relatam diferença nas folhas e na estrutura anatômica da madeira, porém, até o presente momento nenhuma subespécie ou variedade foi oficialmente reconhecida (AGOSTINI, 2013). Sendo uma árvore endêmica do Brasil tem ocorrências confirmadas em grande parte do Nordeste e em parte do Sudeste do Brasil, tem seu domínio fitogeográfico na Mata Atlântica o tipo de vegetação é Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Pluvial e Restinga (GAGNON *et al.*, 2020). Como pode-se observar na figura 1, o mapa de ocorrência confirmada de *C. echinata*.

Figura 1. Ocorrência confirmada de *C. echinata*.

Fonte: CNC Flora

As árvores de pau-brasil atualmente apresentam uma altura de 10-12 m, porém existem registros de indivíduos com 30 m nos tempos da colonização. Com copa irregular, os ramos mais novos e as cascas de espécimes mais jovens são repletos de acúleos. Seu tronco varia de 40 a 70 cm de diâmetro. Seu albúrnio é amarelo claro, contém folhas compostas, bipinadas, com cerca de 15 cm de comprimento, suas pétalas são amarelo-sulfúreas, tendo na pétala dorsal uma mácula vinosa no centro, que pode estender até as bordas como pode-se observar na Figura 2 que mostra a árvore utilizada na coleta. Com um odor bastante característico, é intenso e agradável (CORRÊA, 1984; REZENDE, 2003). O pau-brasil possui diversos trabalhos e várias atividades e propriedades, tais como antivirais (JIANG *et al.*, 2001), antibacteriana e antioxidante (DICKSON *et al.*, 2007) e o extrato do caule apresentando uma característica de agentes anti-inflamatórios de fitoquímicos (MITSUI, 2015).

Figura 2. Árvore de *C. echinata* utilizada para coleta do material botânico



Fonte: Autor

Como forma de preservação algumas áreas de proteção foram criadas, e são encontradas em sistema de unidades de conservação (SNUC) em grande parte dos estados que relatam a espécie em seu território, no estado de Pernambuco tem a Estação Ecológica do Tapacurá, que visa preservar e cultivar as árvores de pau-brasil (CASTRO, 2002).

2.1.3 Revisão da literatura sobre o estudo biológico a partir da *Caesalpinia echinata* com ênfase na composição química do óleo essencial.

Ao realizar a revisão da literatura foi observado de acordo com o site International Plant Names Index (IPNI) existe uma sinonímia para a *Paubrasilia echinata* que é a *Caesalpinia echinata* ambas conhecidas popularmente como pau-brasil.

Com base nisso, foi notado que a árvore de Pau-brasil vem sendo bastante estudada, alguns relatos mostram que a utilização das sementes de pau-brasil como uma inibidora de protease, para uma aplicação terapêutica no tratamento de sangramento, distúrbio, hipertensão,

câncer e doenças pulmonares (SILVA *et al.*, 2021). Lopes em 2020 trouxe um estudo que analisa a resposta fluorescente da clorofila e da feofitina extraídas das folhas de pau-brasil, por conta do seu pigmento natural que é bastante característico e que foi muito explorado no século XVI.

De acordo com o levantamento bibliográfico realizado, utilizando a palavra-chave “*Paubrasilia echinata*” e em seguida o filtro “essential oil”, foi observado que ainda não foi realizado nenhum trabalho mencionando a *P. echinata*. Já com a sua sinônima, *C. echinata*, existe um trabalho realizado sobre a composição química do óleo essencial das flores e folhas. Esse levantamento foi realizado no dia 30 de outubro de 2021, no banco de dados SciFinder (Chemical Abstract), utilizando como palavra-chave para pesquisa “*Caesalpinia echinata*” seguido do filtro “Essential Oil”, onde foi encontrado apenas um artigo referente a relato de composição química de óleos essenciais.

O artigo obtido relata a composição química do óleo essencial extraído das folhas e flores da planta. Com a coleta realizada nas cercanias do Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro. A Tabela 1 relata os componentes majoritários já estudados sobre a composição química dos óleos essenciais da *C. echinata*.

Tabela 1. Componentes majoritários do óleo essencial extraído das diferentes partes de *Caesalpinia echinata*.

Composto	Parte	%	Local de coleta	Referência
<i>E</i> - β -ocimeno	Flores	57,2	Rio de Janeiro/Brasil	Rezende, 2003
(<i>E</i>)-3-hexeno-1-ol	folhas	30,8		

Ainda há relatos na literatura que estudam tanto o potencial antioxidante do extrato etanólico da madeira de pau-brasil, utilizando o método de sequestro de radicais livres DPPH', quanto o extrato etanólico do caule utilizado para o isolamento de diterpenos, é possível analisar os dados através da Tabela 2 que relata os estudos citados.

Tabela 2. Estudos que relatam atividades químicas a partir do extrato de *Caesalpinia echinata*

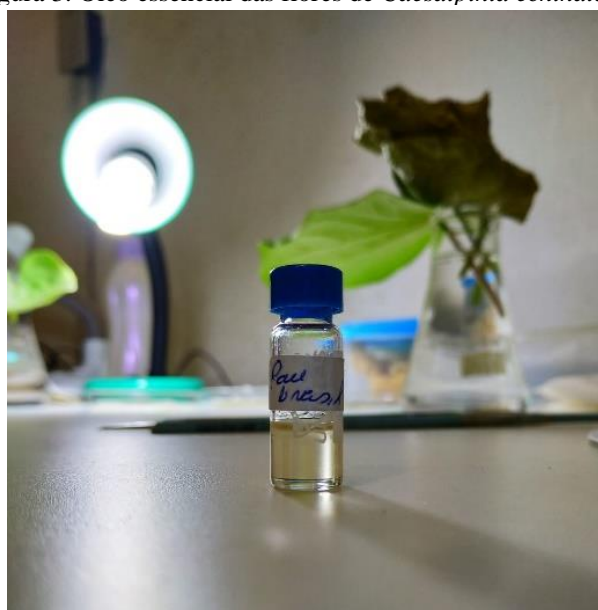
Parte	Atividade	Resultado da atividade	Local de coleta	Referência
Madeira	Antioxidante (DPPH')	CE ₅₀ = 234,2	Pernambuco/Brasil	Gomes, 2014
Caule	Isolamento de diterpenos	-	Minas Gerais/Brasil	Cota, 2011

2.2 METABOLISMO SECUNDÁRIO E ÓLEO ESSENCIAL

Em um organismo vivo, compostos químicos são sintetizados e degradados por uma série de reações química, medidas por diversas enzimas. Essas reações originam o metabolismo, e após serem biossintetizadas os compostos químicos formados, degradados ou transformados são chamados de metabólitos. Alguns organismos vivos apresentam um arsenal metabólico capaz de produzir inúmeras substâncias não necessariamente relacionadas a utilização na vida do organismo produtor, esse conjunto é chamado metabolismo secundário, onde os produtos embora não sejam essenciais para o organismo que produziu, garantem vantagem para sua sobrevivência e para perpetuação de sua espécie em seu ecossistema. Várias substâncias foram identificadas com funções para esses metabólitos, como, defesa contra herbívoros e micro-organismos, atração de animais polinizadores ou dispersores de sementes. Assim, os metabólitos secundários, por serem fatores de interação entre organismos, frequentemente, apresentam atividades biológicas interessantes (SIMÕES, 2003).

A designação “óleo” se dá por conta das propriedades físico-químicas, tendo uma baixa solubilidade em água e líquidos de textura gordurosa, e “essencial” por causa do aroma intenso e agradável que a maioria dos óleos essenciais apresentam. Segundo a International Standard Organization (ISO), óleos essenciais são produtos oriundos de matéria prima vegetal, geralmente apresentando um sabor acre e picante, colorações ligeiramente amareladas ou incolores, sendo bastante instáveis a presença de luz, calor e umidade. Os óleos essenciais apresentam em sua composição química, compostos como monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides, o que vai depender da rota biossintética a qual foi metabolizado na planta (DEWICK, 2002; SIMÕES, 2003). Sendo definidos também, como uma mistura complexa de substâncias lipofílicas, odoríferas e voláteis (SIMÕES, 2003; SPITZER, 2003).

Figura 3. Óleo essencial das flores de *Caesalpinia echinata*.



Fonte: Autor

2.3 PROCESSO DE EXTRAÇÃO POR HIDRODESTILAÇÃO

Diversos métodos podem ser empregados para a extração de óleos essenciais. Dentre as principais técnicas temos a enfloração, extração com solvente orgânico, prensagem, extração por CO₂ supercrítico e hidrodestilação (SANTOS *et al.*, 2004).

A hidrodestilação é empregada para extrair óleos essenciais de plantas frescas. Os óleos essenciais possuem pressão de vapor mais elevada que a da água, sendo por isso, arrastados pelo vapor d'água. Na técnica emprega-se o aparelho do tipo Clevenger e o óleo obtido, após separar-se da água, deve ser seco e mantido a baixa temperatura (SIMÕES *et al.*, 2004).

Figura 4. Aparelho tipo Clevenger modificado



Fonte: Autor

2.4 ÁCARO

2.4.1 *Tetranychus urticae* Koch

O *Tetranychus urticae* Koch, conhecido popularmente como ácaro rajado ou ácaro de duas manchas pertence à família Tetranychidae, essa espécie é uma praga que ataca principalmente o *Arachis hypogaea*, conhecido como amendoim (CHIAVEGATO. 1991). Desenvolvem-se melhor em climas quentes, e com baixa umidade, as fêmeas medem em média 0,5 mm de comprimento e apresentam um dorso de cor esverdeada e com duas manchas brancas, enquanto os machos medem cerca de 0,25 mm e não apresentam nenhuma mancha, mas tem o dorso na cor amarelada (FADINI *et al.*, 2004; MARUYAMA *et al.*, 2002). O seu ciclo biológico dura em média 21 dias, sob temperatura de 20 °C e cerca de 7 dias sob temperatura de 30 °C (GERSON. 2012).

Essa espécie possui uma enorme capacidade de reprodução, onde as fêmeas podem ovopositar sem a necessidade de acasalar, a fecundidade média das fêmeas é entre 90 e 110 ovos, e o período de incubação deles é de três a cinco dias e o ciclo biológico de oito a doze dias. Chegando a 20-25 gerações por ano e formando colônias compactas que se recobrem com teias, os ovos são esféricos e possuem uma coloração amarelada, sendo postos por entre os fios de teia (BONTETI *et al.*, 1999; MARUYAMA *et al.*, 2002).

Figura 5. *Tetranychus urticae* Koch



Fonte: Featured Creatures

O sítio de ovoposição do ácaro rajado e de decomposição de fezes correspondem ao sítio de alimentação, o terço inferior das folhas (CHIAVEGATO; MISCHAN 1991). Alimentando-se da seiva, tanto as ninfas quanto os adultos escarificam o tecido vegetal, isso afeta diretamente o desenvolvimento da planta, aparecendo manchas cloróticas que reduzem a capacidade fotossintética (DEGRANDE; VIVIAN 2010).

2.4.2 Alvo do *Tetranychus urticae* Koch

O *Tetranychus urticae* é uma praga sugadora e, durante o processo de alimentação causa danos irreversíveis para a planta, que ocorre através do rompimento das células da epiderme dos órgãos atacados, o que afeta diretamente na fotossíntese. Os impactos causados levam a perda na produtividade na ordem de 4 a 8 sacos/ha, em função de ataques de colônias de ácaros formadas nas safras. (AGRO BAYER).

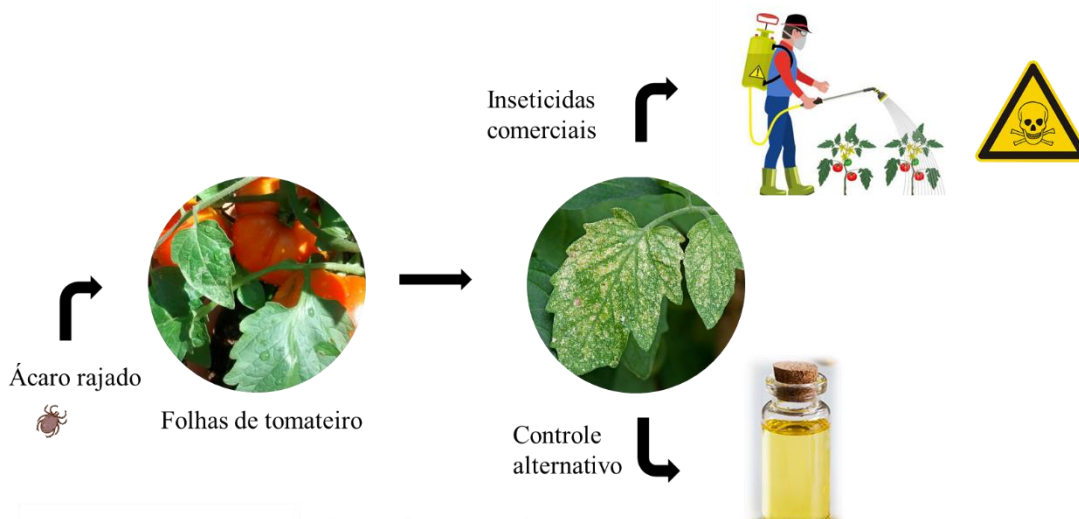
Considerado uma praga agrícola e de alta proliferação, o *T. urticae* ocorre em várias culturas de alimentos e plantas ornamentais que são importantes para a agricultura (GAMA *et*

al., 2007). Dentre essas culturas as principais são o amendoim (*Arachis hypogala* L.) e o feijão-de-porco (*Canavalia ensiformes* L.), onde o ácaro é considerado uma praga da parte aérea (WENZEL 2011). Citado também em plantações como a do mamoeiro (*Carica papaya* L.) e do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) (SANCHES *et al.*, 2000; MARICONI. 1972).

2.4.3 Controle para o *Tetranychus urticae* Koch

O controle do ácaro rajado é realizado de forma biológica, utilizando um predador natural do *T. urticae* para o controle, o qual podemos destacar o ácaro predador (*Neoseiulus californicus*), que vem sendo utilizado no Brasil e em diversos países do mundo (TOLDI *et al.*, 2013). O que não dá uma confiabilidade de 100% no controle total da praga. Outra forma de controle que é fortemente utilizada são os inseticidas sintéticos, os quais merecem destaques por serem mais usados comercialmente, o dicofol, dimetoato e ortus, apresentando uma alta eficácia no combate ao ácaro rajado.

No ano de 2009, o Brasil se tornou o maior consumidor de agrotóxicos do mundo (MERLINO, 2009), e no ano de 2019, dez anos depois, houve uma liberação recorde de 290 produtos aprovados para uso, onde desses 41% possui uma extrema ou alta toxicidade e 32% estão banidos de uso na União Europeia (DAMASIO, 2019). No entanto, a utilização de inseticidas sintéticos causa danos como contaminação ambiental e em mamíferos, possuindo uma ação letal sobre organismos não-alvo e o surgimento de populações resistentes da praga (GONÇALVES *et al.*, 2001) como podemos ver a forma que é realizado o uso desses agrotóxicos no esquema 1.

Esquema 1. Controle para o *Tetranychus urticae*

Com base nisso, surgiu o intuito de reduzir a utilização de inseticidas sintéticos devido aos danos acarretados, então, surge como uma alternativa o Manejo Integrado de Pragas (MIP). O MIP traz a defesa de estratégias conscientes de controle disponíveis, com preferência para aquelas que tenham menor impacto ambiental, respeitando a filosofia de um sistema de produção integrada, com foco na adequação de processos produtivos para obtenção de produtos agrícolas de qualidade e com níveis de resíduos de agrotóxicos com base no que é estabelecido pela ANVISA (CARVALHO *et al.*, 2014).

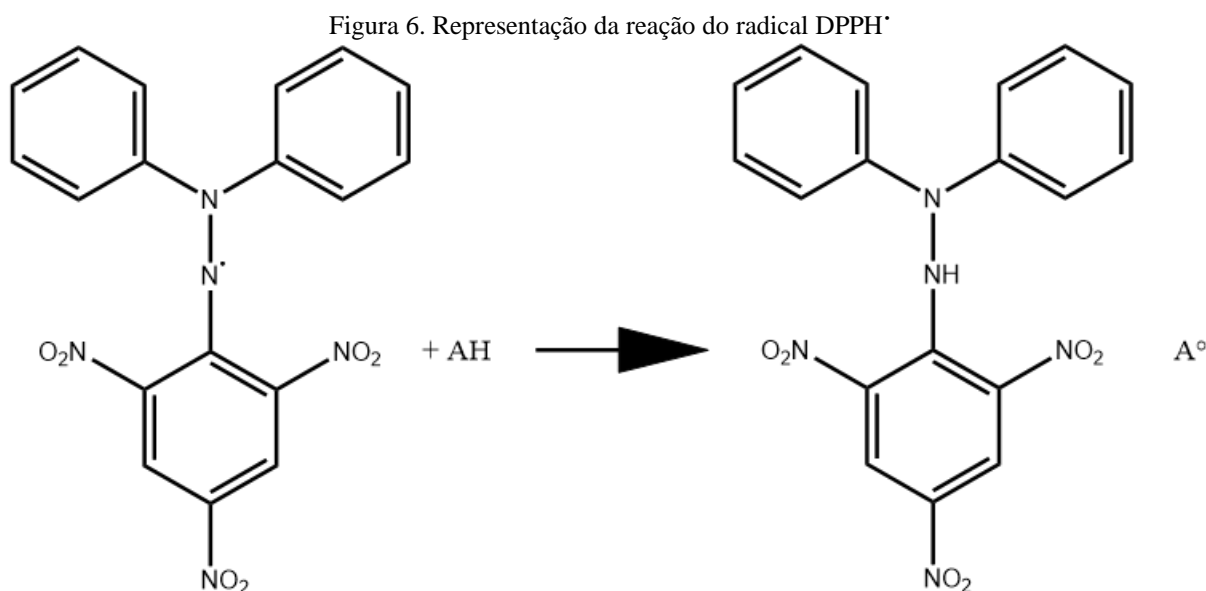
O MIP tem como intuito a redução do uso de agrotóxicos na produção convencional com um conjunto de medidas que priorizam os controles biológico, comportamental, cultural, genético, varietal e como última alternativa o controle químico, ou seja, os inseticidas sintéticos. Isso visando evitar populações resistentes da praga (EMBRAPA, 2014).

Atualmente, já sendo comercializado os inseticidas botânicos, com destaque para o inseticida botânico Azamax®, produzido a partir da nim (*Azadirachta indica*), a qual apresenta como princípio ativo a Azadiractina. Entretanto, inseticidas a base de Óleos Essenciais (OE) apresentam-se como um potencial fonte de controle de pragas agrícolas, por possuírem mais de uma substância presente que atua na praga. O alto crescimento do estudo quanto ao potencial de espécies vegetais como inseticidas botânicos vêm crescendo cada dia mais (ARAÚJO, 2018). O presente trabalho visa usar a bioprospecção de plantas aromáticas para uma avaliação química e biológica.

2.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante é uma técnica de eliminação de radicais livres, podendo ser determinada espectrofotometricamente por diversos métodos diferentes, e os quais foram utilizados no presente trabalho que é a atividade de eliminação de radicais DPPH \cdot (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate) e geração do cátion radical ABTS \cdot^+ (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) (SMAILI *et al.*, 2021).

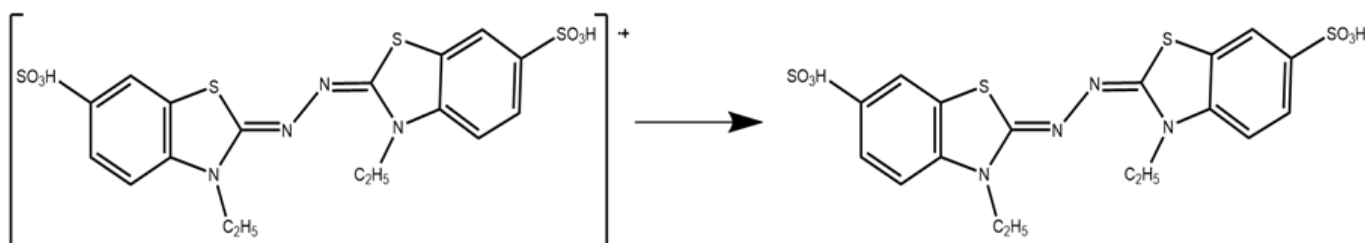
O método de eliminação de radicais DPPH \cdot é uma técnica onde é realizada uma análise estrutural do composto a ser testado, com isso observa-se a capacidade da molécula de agir como um eliminador de radicais livres, e também a influência no comportamento eletroquímico. O método que pode ser usado para a determinação da capacidade antioxidante da mesma maneira que a eliminação do radical DPPH \cdot , como pode ver na Figura 6, devido à correlação encontrada entre os potenciais de oxidação e o poder anti-radical. Essa determinação eletroquímica é barata e também rápida, permitindo fazer medições em uma variedade de condições experimentais. (ARTEAGA *et al.*, 2012).



Fonte: autor

A geração do cátion radical $ABTS^{+\cdot}$ é baseada na ativação da metamioglobina com peróxido de hidrogênio na presença de $ABTS^{+\cdot}$ para produzir o cátion radical, isso na presença ou ausência de antioxidantes. Isso é com base no fato que os antioxidantes de reação mais rápida também podem contribuir para a redução do radical ferrilmioglobina, isso pode ser observado a partir da Figura 7. Esse método é aplicável ao estudo de antioxidantes solúveis em água e solúveis em lipídeos, compostos puros e extratos alimentares (RE *et al.*, 1999).

Figura 7. Representação da reação do radical $ABTS^{+\cdot}$



Fonte: Autor

2.6 *Artemia salina* Leach

A *Artemia salina* Leach é um microcrustáceo da família *Artemiidae* e da ordem Anostraca, vive em meio salino e serve como alimento vivo para peixes. Esta espécie pode produzir cistos e náuplios. Os cistos, que são os ovos de resistência, apresentam um diâmetro médio de 250 μm , podendo ser armazenados a seco, suportando o vácuo. Os náuplios recém eclodidos possuem cerca de 450 μm de comprimento e a artemia adulta possui um corpo alongado, medindo em média 10 mm de comprimento (NASCIMENTO *et al.*, 2008; IGARASHI, 2008).

Figura 8. *Artemia salina* Leach

Autor: André Coelho

Os cistos de *A. salina* são facilmente encontradas em comércios e lojas de animais, e para realizar a eclosão basta serem colocados em uma solução salina e submetidos a luz, num intervalo de 48 horas (MCLAUGHLIN, 1998).

De forma geral, os compostos bioativos apresentam uma certa toxicidade frente as larvas de *A. salina*. Assim, a letalidade ao microcrustáceo pode ser utilizada como um teste preliminar rápido e simples durante o processo de isolamento de produtos naturais (RAHMAN, 2001).

Meyer em 1982 estabeleceu junto com seus colaboradores uma relação entre o grau de toxicidade e a dose letal média, DL_{50} , apresentada por extratos de plantas sobre larvas de *A. salina* L. Com isso, considera-se que os valores notados acima de $1000 \mu\text{g/mL}$, são consideradas não tóxicas, e quando inferior a $1000 \mu\text{g/mL}$ são consideradas tóxicas (MEYER, 1982). Há relatos na literatura que correlacionam a atividade frente a *A. salina* com o ensaio de atividade antitumoral (HARADA, 2009) e além disso, essa metodologia também é utilizada como bio-monitora e bioindicadora da qualidade da água, e também na determinação da citotoxicidade de pesticidas organofosforados (VARÓ, 2002).

O bioensaio com os náuplios de *A. salina* mostra-se bastante útil, podendo poupar a necessidade de ensaios antitumorais caros ou em animais, avaliando e no fracionamento para bioatividades, podendo levar ao isolamento de diversos produtos naturais. Além do ensaio está sendo utilizado em diversas outras atividades biológicas, confirmando assim, a sua sensibilidade e versatilidade em estudos de toxicidade (HARADA, 2009).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.4 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

A escolha da espécie *Caesalpinia echinata* foi realizada levando em consideração a família e o gênero, que apresenta um perfil de metabólitos secundários, e também a disponibilidade da planta.

As flores da espécie de *C. echinata* foram coletadas no campus SEDE da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no bairro de Dois Irmãos – Recife – Pernambuco – Brasil. De coordenada: 8° 01' 03" S 34° 57' 05" O. A coleta foi realizada em período matutino e sem chuvas. A amostra exsicata (Figura 9) foi depositada no Herbário Professor Vasconcelos Sobrinho (PEUFR), da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela Dra. Margareth F. de Sales Com número de registro 55809.

Figura 9. Exsicata *Caesalpinia echinata*

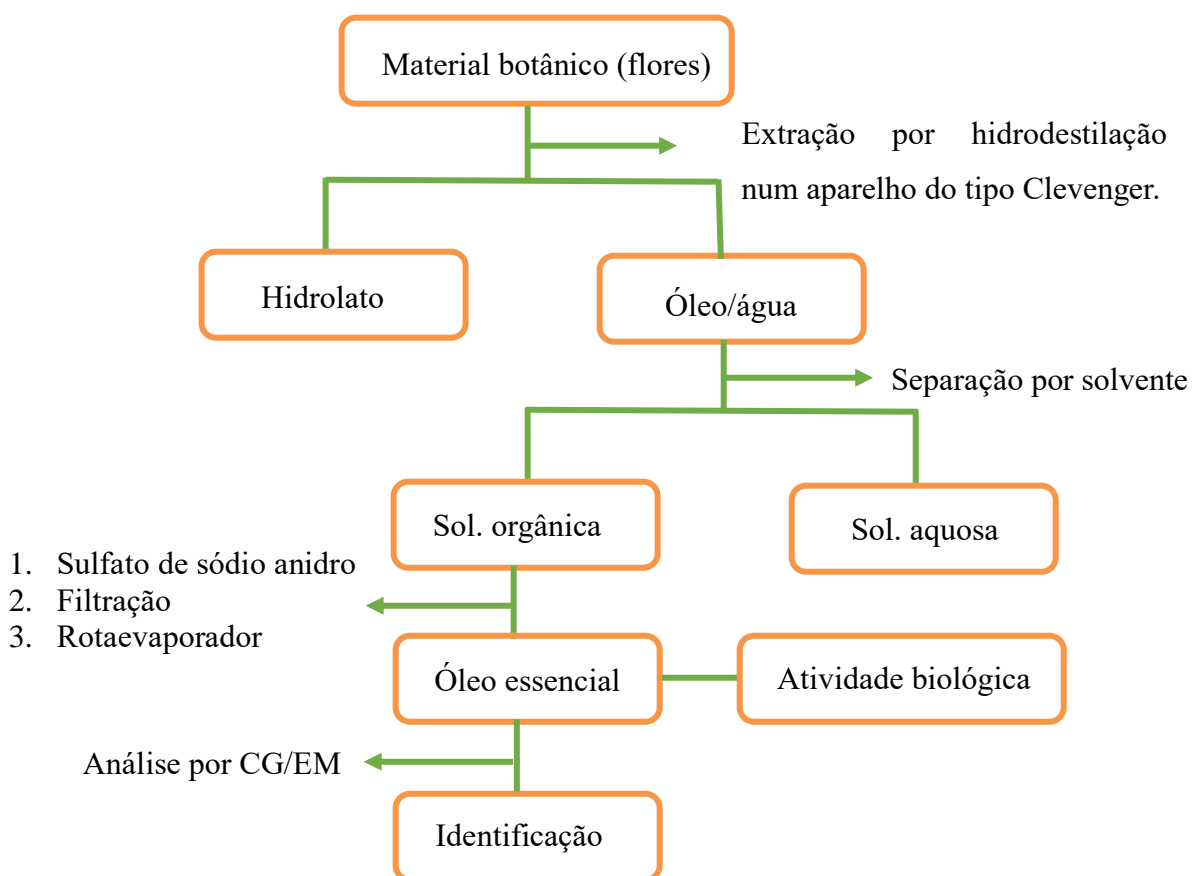


Fonte: Autor

3.5 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAS

As flores de *C. echinata* foram submetidas ao método de hidrodestilação em um aparelho do tipo Clevenger. Após duas horas de extração foi retirada uma alíquota do óleo, foi separada da água por diferença de densidade, e o excesso de umidade foi retirado com sulfato de sódio anidro, a alíquota do óleo foi utilizada para o cálculo do rendimento da extração, sendo realizado a partir do peso do material das flores da planta coletada. O material vegetal que restou continuou sendo extraído de forma exaustiva. Por fim, o óleo foi armazenado em recipiente de vidro hermeticamente fechado guardado em freezer, a uma temperatura inferior a -5°C , a representação está descrita no esquema a seguir.

Esquema 2. Extração e tratamento do óleo essencial



Fonte: Autor

3.6 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (CG-EM)

A análise qualitativa por cromatografia gasosa – acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) foi realizada utilizando um sistema cromatográfico CG-EM QP2010 SE Plus Shimadzu com detector seletivo de massa, operando com um impacto de elétrons de 70 eV com intervalo de varredura de 0,5s e fragmentos de m/z 40 a 550 Da. com os seguintes parâmetros: gás de arraste = hélio, fluxo = 1 mL/min, modo Split (1:30); volume de injeção de 1 μ L diluído (1/100) do óleo em *n*-hexano.

Figura 10. Cromatógrafo gasoso e espectrômetro de massas



Fonte: Autor

3.6.1 Identificação dos componentes do óleo essencial

A identificação dos componentes foi baseada em índices de retenção de CG-EM com referência a uma série homóloga de C_8 - C_{40} *n*-alcanos calculados usando a equação de Van der Dool e Kratz (Van den Dool e Kratz, 1963) e por computador comparando com a massa biblioteca espectral do sistema de dados CG-EM (NIST 14 e WILEY 14^o) e coinjeção com padrões autênticos, bem como outros espectros de massa publicados (Adams, 2017).

3.6.2 Padrões químicos

Todos os terpenos utilizados como padrões na identificação dos componentes voláteis dos óleos essenciais foram obtidos da Merck (Brasil) com 99% de pureza. Azamax® e Ortus® utilizados como controle positivo botânico e sintético, respectivamente, foram adquiridos em mercado de defensivos agrícolas local.

3.7 CRIAÇÃO DO *Tetranychus urticae* Koch

Folhas de *Canavalia ensiformes* L. (feijão-de-porco) foram cultivadas em vasos com capacidade de 5 L contendo terra misturada com húmus (3:1), em casa de vegetação. Após 20 dias de idade foram levadas para o Laboratório de Produtos Naturais Bioativos (LPNBio) da UFRPE e infestadas com ovos, larvas, ninfas e adultos do ácaro rajado, para manutenção da criação. A criação não foi exposta aos acaricidas e foi mantida sob a temperatura de 25 ± 5 °C, umidade relativa de $65 \pm 5\%$ e fotofase de 12h.

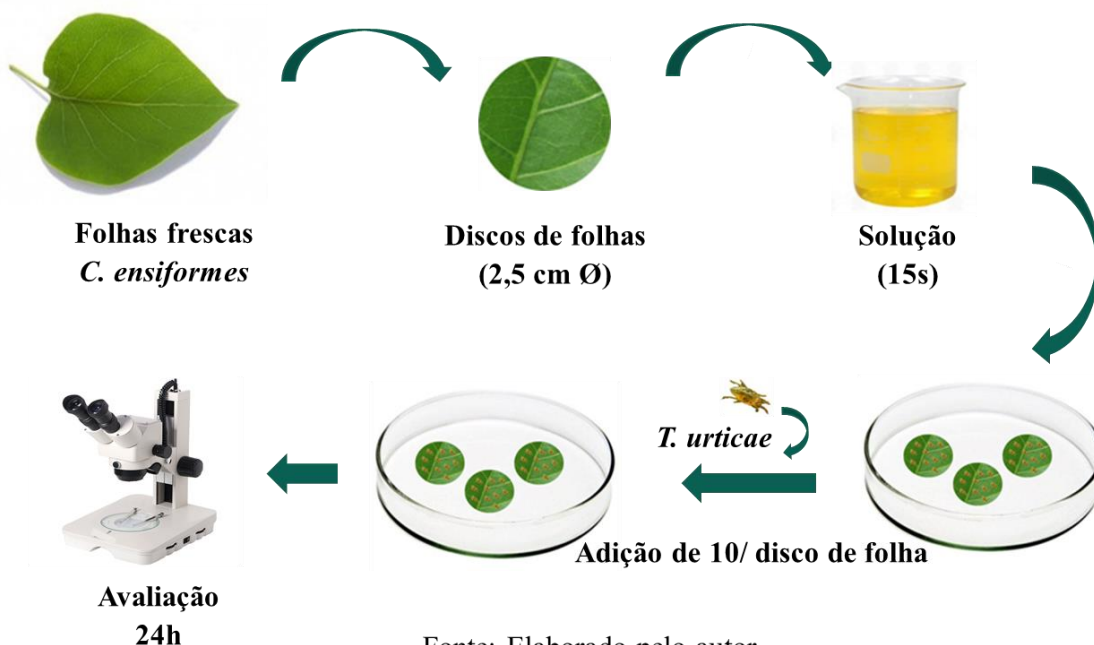
3.8 BIOENSAIOS

3.8.1 Bioensaio de contato residual

O método descrito por Ribeiro, Camara e Ramos (2016) com modificações foi utilizado para avaliar a toxicidade por contato residual do óleo essencial das flores de *Caesalpinia echinata*. Foram confeccionados discos foliares de feijão-de-porco (2,5 cm Ø) e imersos em soluções de diferentes concentrações dos óleos essenciais, constituintes químicos ou misturas binárias diluídos em água e Tween 20. Para o controle negativo os discos foram imersos em solução contendo água e Tween 20. Para o controle positivo os discos foram imersos em soluções contendo diferentes concentrações do Azamax®. Após secagem a temperatura ambiente os discos foliares foram transferidos para uma placa de Petri (10 cm Ø e 1,5 cm de altura) contendo espuma de polietileno e disco de papel de filtro saturado com água para evitar a fuga dos ácaros e manter a turgidez das folhas. Em cada disco foliar foram colocadas 10 fêmeas adultas do ácaro rajado, totalizando 30 ácaros por placa de Petri. Foram realizadas 3 repetições por tratamento e repetidas no tempo, totalizando 90 ácaros por tratamento.

A mortalidade foi determinada após 24h de exposição do ácaro aos produtos testados. Os ácaros foram considerados mortos quando incapazes de se mover por uma distância superior ao comprimento do seu corpo após leve toque com as cerdas finas de um pincel comum, a demonstração desse bioensaio pode ser visto no esquema abaixo.

Esquema 3. Bioensaio de toxicidade sobre o *Tetranychus urticae*



3.9 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

3.9.1 Atividade antioxidante de sequestro de radicais livres DPPH[·]

A atividade antioxidante dos óleos essenciais das flores *C. echinata* foi realizada contra o radical livre DPPH[·] seguindo a metodologia de Silva et al. 2006. Soluções estoque foram preparadas a partir dos extratos e da fração de metanol em várias concentrações (0,10 a 5,0 mg/mL). Por meio de análise preliminar, quantidades adequadas de soluções estoque das amostras e 450 µL da solução de DPPH[·] (23,6 mg/mL em EtOH) foram transferidas para tubos Eppendorf de 0,5 mL e o volume foi completado com EtOH, após homogeneização. As amostras foram sonicadas por 30 min e a quantidade de DPPH[·] foi registrada em um dispositivo UV-vis (Biochrom EZ Read 2000) em um comprimento de onda de 517 nm em uma placa de 96 poços. O ácido ascórbico foi usado como controle positivo e todas as concentrações foram testadas em triplicata. A porcentagem de atividade de eliminação (% SA) foi calculada a partir da

equação:

$$\% AS = 100 \times \frac{(Abs_{controle} - Abs_{amostra})}{Abs_{controle}}$$

onde $Abs_{controle}$ é a absorbância do controle contendo apenas a solução de etanol de DPPH \cdot , e $Abs_{amostra}$ é a absorbância do radical na presença da amostra ou ácido ascórbico padrão. O índice de atividade antioxidante (AAI) foi calculado de acordo com Scherer e Godoy, 2009, da seguinte forma:

$$AAI = \frac{\text{concentração final de DPPH } (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})}{IC_{50} (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})}$$

Valores de AAI abaixo de 0,5 indicam baixa atividade antioxidante, valores entre 0,5 e 1,0 indicam atividade moderada, valores entre 1,0 e 2,0 indicam atividade forte e valores de AAI acima de 2,0 indicam atividade antioxidante muito forte.

3.9.2 Atividade antioxidante de sequestro de radicais livres ABTS \cdot^+

A determinação da atividade antioxidante de OE de flores de *P. echinata* contra o cátion radical ABTS \cdot^+ foi realizada seguindo a metodologia descrita por Re et al., 1999, em um aparelho UV-vis (Biochrom EZ Read 2000, Figura 11), utilizando Trolox como o composto padrão. As concentrações iniciais das soluções das amostras foram de 0,1–1,0 mg/mL, com a adição de 450 μ L da solução radical ABTS \cdot^+ para dar concentrações finais de amostras de 2,5–100,0 μ g / mL. As amostras foram protegidas da luz e sonicadas por 6 min. A absorvância das amostras e o controle positivo foram medidos em um comprimento de onda de 734 nm usando uma microplaca de 96 poços. Cada concentração foi testada em triplicado. A porcentagem de atividade de eliminação de radicais livres de ABTS \cdot^+ foi calculada pela equação:

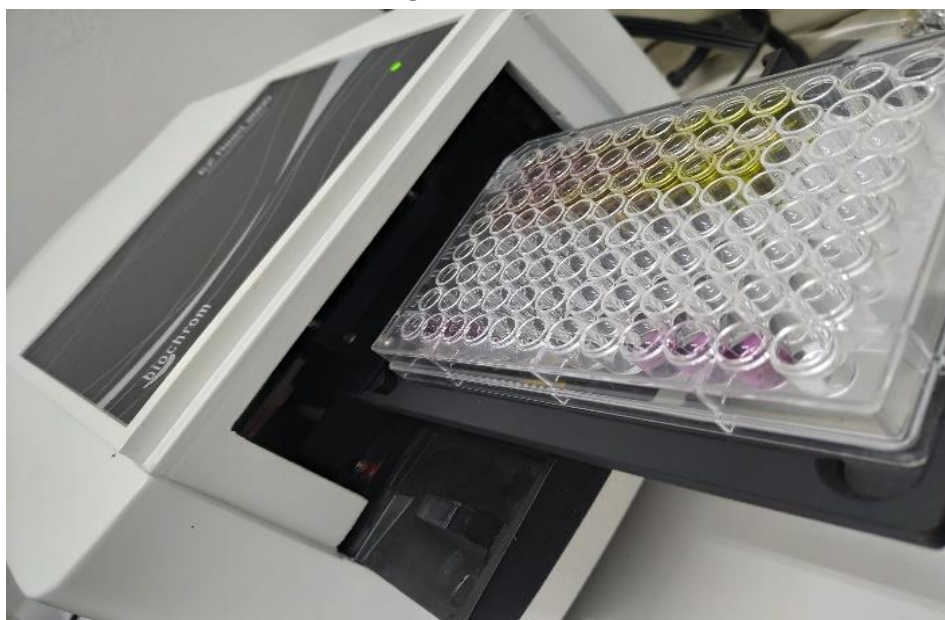
$$\% AS = 100 \times \frac{(Abs_{controle} - Abs_{amostra})}{Abs_{controle}}$$

onde $Abs_{controle}$ é a absorbância do controle contendo apenas a solução de etanol de ABTS \cdot^+ e $Abs_{amostra}$ é a absorbância do radical na presença da amostra ou TROLLOX padrão.

A eficiência antirradicalar foi estabelecida por meio de análise de regressão linear e o

intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) obtido por meio do programa estatístico GraphPad Prism 5.0. Os resultados foram expressos através do valor da Concentração Efetiva média (CE_{50}), que representa a concentração da amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais.

Figura 11. ELISA



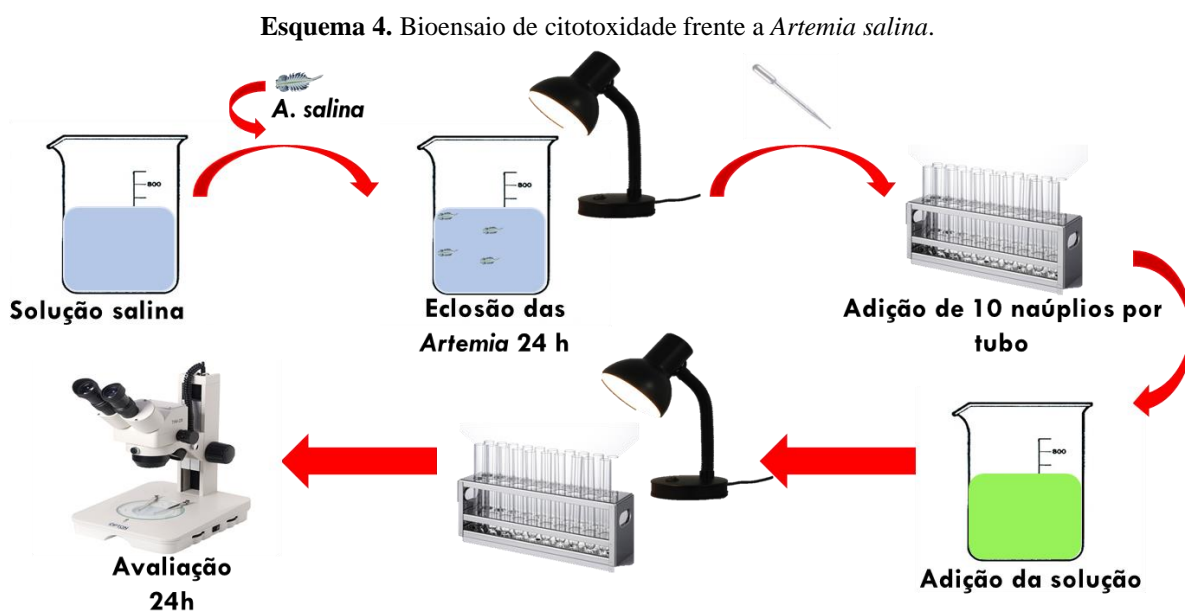
Fonte: Autor

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de mortalidade obtidos a partir do bioensaio de contato e do bioensaio de letalidade, após atenderem aos testes de normalidade e homogeneidade foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$) através do programa estatístico SAS (SAS Institute 2002). Os dados de mortalidade e letalidade obtidos foram submetidos à análise de Probit e as concentrações que matam 50% da população de *T. urticae* (CL_{50}) e que matam 50% dos náuplios de *A. salina* foram estimadas utilizando o programa POLO (LEORA, 1987). A metodologia de (ROBERTSON *et al.*, 1992) foi utilizada para o cálculo das razões de toxicidade, com seus respectivos intervalos de confiança de 5% a 95%.

3.11 METODOLOGIA DE TOXICIDADE FRENTE A *Artemia salina* L.

O bioensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina* foi realizado utilizando a metodologia descrita por Meyer et al. (1982) com algumas modificações. Os cistos do microcrustáceo *Artemia salina* foram colocados em um recipiente plástico com solução salina artificial (23 g de sal marinho/1 litro de água destilada/0,7 g de bicarbonato de sódio), sob iluminação artificial, aeração e controle da temperatura (20-30 °C) para a eclosão dos ovos por 24 horas. Após 24 horas, as larvas foram expostas a diferentes concentrações (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 µg/mL) dos produtos a serem testados por 24 horas, utilizando-se tubos de ensaio, cada um contendo cerca de 10 náuplios, nas 10 diferentes concentrações, cada uma em triplicata constituindo um ensaio, buscando sempre a maior concentração em que se observasse 0% de mortalidade e a menor concentração em que se deflagrasse 100% de mortalidade, de modo a obter a CL₅₀; 24 h (concentração letal para 50% da população em 24 h). As soluções foram preparadas em 2% de DMSO (dimetilsulfóxido) e avolumadas com solução salina artificial. Após 24 h de exposição, foi realizada a contagem de náuplios vivos e mortos e os resultados foram submetidos a tratamento estatístico utilizando a regressão linear, o qual forneceu os valores de CL₅₀; 24 h, o esquema abaixo representa como foi realizado esse bioensaio.



Fonte: Elaborado pelo autor

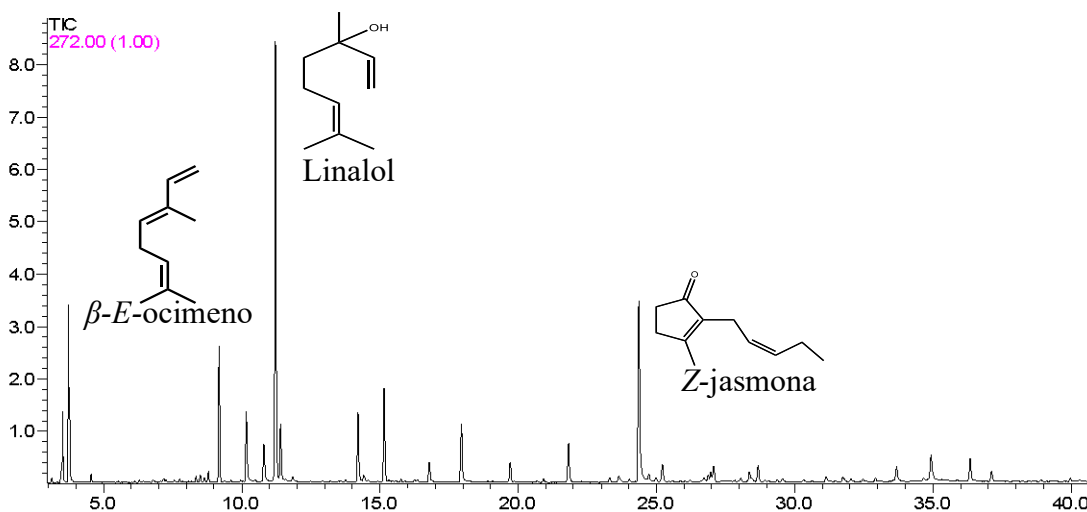
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FLORES DE *Caesalpinia echinata*

OE obtido apresentou uma coloração amarelada e com um forte e agradável. O OE das flores apresentou um rendimento calculado de 0,007% m/m. Esse é o primeiro relato para o rendimento do OE das flores de *C. echinata*, porém, de acordo com Rezende (2003) o óleo essencial das folhas de pau-brasil apresentou um rendimento médio de 0,006% sendo coletadas no estado do Rio de Janeiro.

A análise da composição química do OE das flores de *C. echinata*, por CG-EM permitiu a identificação de 21 compostos, representando um percentual de identificação correspondente a 97,35% dos constituintes, como pode ser visto na figura abaixo.

Figura 12. Cromatograma do óleo essencial das flores de *Caesalpinia echinata*



Fonte: Autor

Todos os constituintes identificados estão listados na tabela 2, organizados de acordo com a ordem crescente de eluição em uma coluna apolar. A classe dos compostos de maior frequência são os monoterpênicos oxigenados com 63,45% dos compostos identificados, enquanto os monoterpênicos vêm em seguida com 20,40%. Os alcaloides apresentam-se com 4,16% correspondendo aos compostos Indol e o Antranilato de metila. Classes como os sesquiterpênicos, sesquiterpênicos oxigenados e os fenilpropanoides também foram identificadas.

É possível observar os constituintes majoritários: o linalol (32,33%), o (*Z*)-jasmona (16,25%) e o (*E*)- β -ocimeno (10,44%). Relatados segundo o Rezende (2003), sendo o (*E*)- β -ocimeno como sendo o mais abundante com (57,2%), além do linalol (6,9%) aparecer como o seguinte em majoritariedade.

Tabela 3. Composição química do óleo essencial das flores de *Paubrasilia echinata*

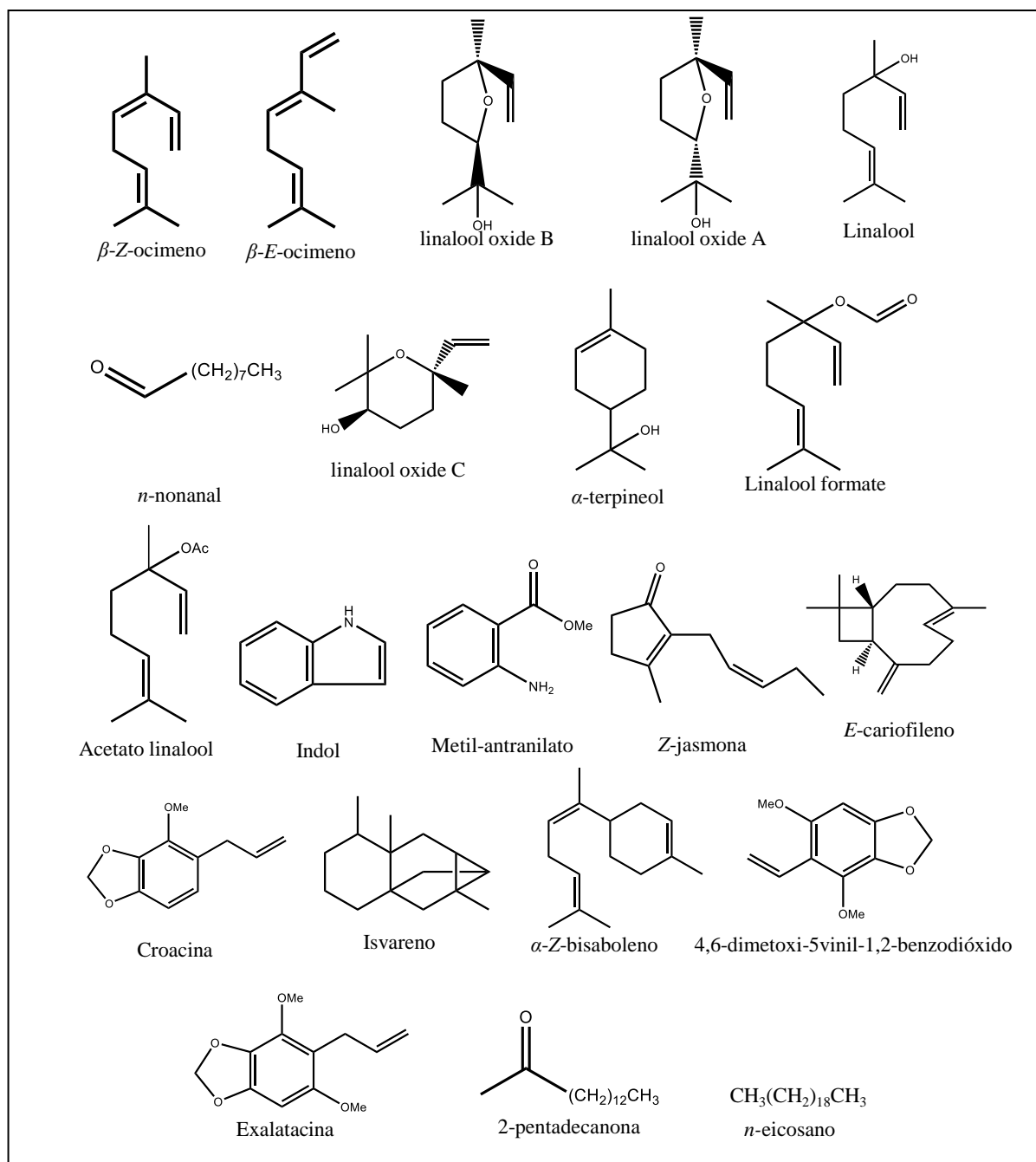
Compostos	IR ^a	IR ^b	%
β - <i>Z</i> -ocimeno	1035	1032	0,55
β - <i>E</i> -ocimeno	1046	1044	10,44
linalool oxide B	1073	1067	4,13
linalool oxide A	1091	1084	2,36
Linalol	1102	1095	32,33
<i>n</i> -Nonanal	1106	1100	3,27
linalool oxide C	1173	1173	4,42
α -Terpineol	1196	1186	6,14
Linalool formate	1217	1214	1,30
Acetato linalool	1261	1254	3,97
Indol	1302	1290	1,39
Antranilato de metila	1351	1334	2,77
<i>Z</i> -jasmona	1411	1392	14,94
<i>E</i> -cariofileno	1432	1417	1,22
Croacina	1474	1457	0,55
Isvareno	1477	1465	0,96
α - <i>Z</i> -bisaboleno	1517	1506	1,05

4,6-dimetoxi-5vinil-1,2-benzodióxido	1646	1653	1,09
Exalatacina	1679	1655	2,11
2-pentadecanona	1718	1697	1,64
<i>n</i> -Eicosano	2027	2000	0,72

Monoterpenos	20,4%
Monoterpenos oxigenados	63,45%
Alcaloides	4,16%
Sesquiterpenos	3,23%
Sesquiterpenos oxigenados	2,36%
Fenilpropanoides	3,75%
Não identificado	2,65%
Identificados	97,35%

IR^a = índice de retenção calculado; **IR^b** = índice de retenção da literatura

As estruturas químicas de todos os constituintes químicos do óleo essencial das flores de pau-brasil identificados por CG/EM são mostrados no quadro abaixo:

Quadro 1. Estrutura química dos constituintes do óleo essencial das flores de *Caesalpinia echinata*

Fonte: Autor

Com base no levantamento realizado é possível observar que os compostos majoritários identificados no presente trabalho estão de acordo com os relatados na literatura. Por ser uma planta ameaçada de extinção ela foi pouco estudada, e apenas um trabalho relata a composição química do óleo essencial e do extrato obtido das flores e das folhas de pau-brasil, segundo Rezende (2003), e foi identificado 15 constituintes químicos. Realizando uma comparação com os resultados obtidos, observa-se que, 5 compostos encontram-se em ambos estudos, são eles,

o β -(*E*)-ocimeno (57,2%), o linalol (6,9%), o indol (1,6%), o antranilato de metila (1,2%) e o (*Z*)-jasmona (1,2%), diferindo apenas no percentual.

Essa alteração na composição do óleo essencial, pode se dar por diferentes fatores, dentre eles a fatores genéticos, ser proveniente de diferentes regiões de coleta, fatores fisiológicos e ambientais. Podem influenciar também, o clima, o dia da coleta, método utilizado para a extração desse óleo, a idade da planta, além do período de colheita (SIMÕES *et al.*, 2004).

4.5 TOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FLORES DE *Caesalpinia echinata* SOBRE O *Tetranychus urticae*

O bioensaio realizado com o OE das flores de pau-brasil sobre o *T. urticae* foi realizado com a praga em sua fase adulta. Com o objetivo de observar a toxicidade, foi realizado o bioensaio de contato residual com as fêmeas da praga comparando os inseticidas comerciais utilizados atualmente para avaliar o potencial de mortalidade do óleo essencial.

O bioensaio de contato residual é realizado pela imersão das folhas de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) na solução, é nomeado dessa forma, porque os ácaros tem contato com a folha após seca, sendo atingido pelos resíduos, ao se alimentar.

Através do teste de contato residual, foi observado que o OE das flores de *C. echinata* se mostraram tóxicos frente a praga *T. urticae* como pode observar na tabela abaixo.

Tabela 4. Toxicidade por contato residual (CL₅₀ em µL/mL) dos inseticidas comerciais sobre o *Tetranychus urticae*

Compostos	N	G.L.	Inclinação± E.P.	CL ₅₀ (IC 95%)	χ ²
-----------	---	------	---------------------	------------------------------	----------------

<i>Caesalpinia echinata</i>	420	5	2,16 (1,84 – 2,47)	290,15 (217,68 – 525,72)	6,47
Azamax®	630	5	2,46 (2,26 – 2,66)	25,82 (21,63 – 31,57)	8,42
Ortus®	720	6	1,20 (1,12 – 1,28)	0,12 (0,08 – 0,16)	7,37

N: Número de ácaros utilizados. CL₅₀: Concentração letal média para reduzir a população em 50%. E.P.: Erro padrão. X²: Qui-quadrado. G.L.: Grau de Liberdade.

Como pode-se observar na Tabela 3, o OE das flores de pau-brasil se revelou tóxico ao ácaro rajado por meio de contato residual, nota-se também que os resultados foram de dose-dependente, ou seja, a mortalidade do ácaro aumentou conforme o aumento da concentração. É apresentado na Tabela a concentração letal que mata 50% (CL₅₀ = 290,15 µL/mL) para o OE das flores de pau-brasil sobre o *T. urticae*.

O ácaro rajado possui um mecanismo de desintoxicação, o qual é responsável pelo desenvolvimento de sua própria resistência a diversos inseticidas (MOTA-SANCHEZ e WISE, 2021). Com isso, dependendo do caso, o ácaro consegue decompor o princípio ativo dos inseticidas em compostos menos tóxicos, resistindo aos seus efeitos. Porém, a mistura complexa proveniente dos óleos essenciais permite a ação por diferentes vias sobre a praga, agindo no seu mecanismo de desintoxicação e apresentando um efeito tóxico sobre o *T. urticae*.

Em comparação as CL₅₀ utilizadas atualmente pelos inseticidas comerciais o Azamax® e o Ortus®, é visto que o óleo essencial das flores de pau-brasil, apresentam uma toxicidade significativa. Com uma CL₅₀ de 25,82 µL/mL, o acaricida botânico registrado para o manejo do *T. urticae*, o Azamax® se mostra bastante tóxico para as ninfas do ácaro rajado, enquanto o Ortus® que é um acaricida sintético registrado para o manejo do ácaro rajado apresentou uma CL₅₀ de 0,12 µL/mL sobre as ninfas do *T. urticae*.

Este é o primeiro relato de um OE de pau-brasil submetido ao ácaro rajado, além disso, é o primeiro relato de um óleo essencial de qualquer espécie de *Caesalpinia* submetido a uma espécie de praga. Com base nisso, é observado que ao submeter os ácaros a concentração de 290,15 µL/mL do óleo essencial das flores de *C. echinata* foi notado um percentual de mortalidade de 50,00%. Esse percentual pode ser justificado pela mistura complexa de compostos presentes no OE, e a toxicidade pode estar diretamente relacionada com as atividades que os

constituintes apresentam sinergicamente quando misturados, podendo potencializar ou diminuir a toxicidade, uma vez que, alguns desses compostos possuem relatos na literatura apresentando toxicidade frente ao *T. urticae* como podemos ver no levantamento feito na tabela 4, (SILVA *et al.*, 2019; MORAES *et al.*, 2017 e MELO *et al.*, 2018).

Tabela 5. Constituintes majoritários que possuem atividade acaricida registrada

Composto	CL₅₀ (µL/mL) (95% I.C.)
<i>α</i> -terpineol	40,43 (27,48-58,72)
<i>β</i> -cariofileno	2,25 (1,97-2,52)
linalool	63,14 (40,22-91,16)

Este relato do bioensaio de contato residual sobre o *Tetranychus urticae* com o óleo essencial das flores de pau-brasil é inédito e não possui relato na literatura de qualquer praga submetida a esse OE, contribuindo assim com mais informações da literatura.

4.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O óleo essencial das flores de *C. echinata* foi submetido a atividade antioxidante com o intuito de avaliar o potencial de radicais livres DPPH[·] e ABTS^{·+}. O índice de atividade antioxidante para os radicais livres DPPH[·] foi calculado de acordo com Scherer e Godoy, 2009. Foi observado um AAI de 1,45, o que indica uma atividade antioxidante forte. O AAI é calculado da seguinte forma:

$$AAI = \frac{\text{concentração final de DPPH} (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})}{IC_{50} (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})}$$

Para os radicais livres ABTS^{•+} a eficiência antirradicalar foi estabelecida por meio de uma análise de regressão linear e o intervalo de confiança de 95%, calculado e obtido pelo programa estatístico GraphPad Prism 5.0. O valor obtido representa a concentração da amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais, e será expresso através da Concentração Efetiva média (CE₅₀). Essa análise de regressão linear e intervalo de confiança foi realizada também para os resultados do teste para os radicais livres DPPH[•]. Os resultados do ABTS^{•+} e DPPH[•] foram comparados como sendo as referências de antioxidante, o TROLOX e o ácido ascórbico, respectivamente, como pode ser visto na tabela abaixo.

Tabela 6. Atividade antioxidante do óleo essencial das flores de *Caesalpinia echinata*

Amostras	DPPH	ABTS
	EC ₅₀ µg/ml (intervalo de confiança)	EC ₅₀ µg/ml (intervalo de confiança)
<i>C. echinata</i>	364,1 ± 29,9	280,5 ± 6,6
Ácido ascórbico	1,6 ± 0,2	-
Trolox	-	4,1 ± 1,1

EC₅₀: Concentração Efetiva média; Ácido ascórbico e Trolox: (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)

Com isso, esse é o primeiro relato na literatura de atividade antioxidante para o óleo essencial para as flores de pau-brasil, tendo em vista a Tabela 5, o OE apresentou atividade antioxidante para os radicais livres ABTS^{•+} e DPPH[•] esse resultado pode ser explicado pelo fato desta planta apresentar um maior percentual de compostos oxigenados em sua composição (65,81%). Dentre esses constituintes, o linalool que foi relatado com maior porcentagem possui relato na literatura por exibir atividade antioxidante apresentando (EC₅₀ = 6,78 µg/mL) (TELES *et al.*, 2021).

4.7 ATIVIDADE DE CITOTOXICIDADE FRENTE A *Artemia salina* Leach

O ensaio de citotoxicidade frente a *Artemia salina* foi realizado em triplicata para o OE das flores de pau-brasil. Os valores registrados apresentaram uma CL₅₀ < 1000 µg/mL, não há relatos na literatura dessa atividade realizada para o OE das flores de *C. echinata*, porém, ao

ser realizado um levantamento buscando as atividades realizadas com o gênero *Casealpinia* foi observado um único artigo que relata a atividade citotóxica frente a *A. salina* com outra espécie de *Casealpinia*, é a *Casealpinia pulcherrima*.

Como pode observar na Tabela 6, vemos a CL_{50} encontrada no presente trabalho para o óleo essencial das flores de *C. echinata*, e ao ser comparado com os resultados obtidos por Erharuyi (2017), que realizou as atividades citotóxicas frente a *A. salina* com o óleo fixo e extrato das raízes de *C. pulcherrima*, podemos observar que a CL_{50} do extrato foi de 110,88 $\mu\text{g/mL}$ e o óleo fixo apresentou uma CL_{50} de 23,85 $\mu\text{g/mL}$. A dose letal do OE das flores de pau-brasil foi de 97,41 $\mu\text{g/mL}$, o qual se mostra próximo a dose obtida para o extrato como dito por Erharuyi.

Tabela 7. Atividade citotóxica frente a *Artemia salina* do óleo essencial das flores de *Caesalpinia echinata*

Amostras	N	Inclinação \pm	CL_{50}	X^2
		E.P.	(I.C. 95%)	
<i>Caesalpinia</i>	330	2,25	97,41	1.99
<i>echinata</i>		(1,88 – 2,63)	(80,03 – 134,17)	

CL_{50} : Concentração letal média para reduzir a população em 50%. I.C.: Intervalo de confiança. X^2 : Qui-quadrado. E.P.: Erro Padrão.

Meyer *et al* (1982), estabeleceram a partir de seus estudos uma classificação, cuja as amostras que apresentarem uma $CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ são consideradas não tóxicas e as amostras que apresentem uma $CL_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ são consideradas tóxicas frente ao micro crustáceo. Com uma CL_{50} inferior a 1000 $\mu\text{g/mL}$ o OE das flores de pau-brasil se apresentou tóxico, com o valor da sua dose letal de 97,41 $\mu\text{g/mL}$.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Análise química realizada a partir o óleo essencial das flores de *Caesalpinia echinata* revelaram como constituintes majoritários o linalol (32,33%), *Z*-jasmona (14,94%) e o *E*- β -ocimeno (10,44%), além de apresentar um rendimento de 0,007%.

Este é o primeiro relato da atividade acaricida do óleo essencial das flores de pau-brasil sobre o *Tetranychus urticae*, que apresentou uma $CL_{50} = 290,15 \mu\text{g/mL}$ possuindo uma toxicidade sobre a praga ácaro rajado.

Também é o primeiro relato de uma atividade antioxidante com o óleo essencial das flores de *C. echinata*, a partir do método de sequestro de radicais livres ABTS^{•+} e DPPH[•], apresentando uma CE_{50} de 280,5 e de 364,1 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

E por fim, os testes de citotoxicidade realizados frente aos naúplios de *Artemia salina* puderam concluir que o óleo apresenta toxicidade frente os microcrustáceos fornecendo uma $CL_{50} = 97,41 \mu\text{g/mL}$, esse é mais um teste que não apresenta relato na literatura realizado através do OE das flores de pau-brasil, sendo o primeiro no presente trabalho.

REFERÊNCIAS

- Ácaro rajado. Agro Bayer Brasil, -. Documento eletrônico. Disponível em: <<https://www.agro.bayer.com.br/essenciais-do-campo/alvos-e-ulturas/pragas/acaro-rajado#:~:text=O%20C3%A1caro%20Tetranychus%20urticae%20C3%A9,%20C20uva%20C20citros%20entre%20outras.>> Acesso em: 02, de junho de 2021.
- ADAMS RP. 2017. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy, 4.1th ed. Allured Publishing Corporation: Carol Stream, Illinois, 809p.
- AGOSTINI, S. D.; BACILIERI, S.; HOJO, H.; VITIELLO, N. BILYNSKYJ, M. C. V.; BATISTA FILHO, A. REBBOUÇAS, M. M. Ciclo econômico do pau-brasil – *Caesalpinia echinata* Lam. **Páginas do Instituto de Biologia, São Paulo**, v. 9, n. 1, p. 15-30, 2013.
- AGYALOSSY, V.; AMANO, E.; ALVES, E. S. Anatomical features of woods used in the manufacture of bows for stringed instruments. **SciELO Brasil**, v. 19, n. 4, 2005.
- ARAUJO, C. A.; CAMARA, C. A. G.; MORAES, M. M.; VASCONCELOS, G. J. N.; PEREIRA, M. R. S.; Zartman, C. E. First record of the chemical composition of essential oil of *Piper bellidifolium*, *Piper durilignum*, *Piper acutilimum* and *Piper consanguineum* from the Brazilian Amazon forest. **Acta Amazonica**, v. 48, n. 4, p. 330-337, 2018.
- ARAÚJO, C. FL.; GRAMACHO, K. P.; BEZERRA, J. L. R. Estudy of *Anthomyces brasiliensis* on *Caesalpinia echinata* in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 5, p. 510-515, 2005.
- ARTEAGA, J.F.; RUIZ-MONTOYA, M.; PALMA, A.; ALONSO-GARRIDO, G.; PINTADO, S.; RODRÍGUEZ-MELLADO, J.M. Comparison of the Simple Cyclic Voltammetry (CV) and DPPH Assays for the Determination of Antioxidant Capacity of Active Principles. **Molecules** **2012**, *17*, 5126-5138. <https://doi.org/10.3390/molecules17055126>
- BONETTI, J. I. DA S.; RIBEIRO, L. G.; KATSURAYAMA, Y. **Manual de identificação de doenças e pragas da macieira**. Florianópolis: Epagri, 1999,149p.
- CANSIAN, R. L.; VANIN, A. B.; ORLANDO, T.; PIAZZA, S. P.; PUTON, B. M. S.; CARDOSO, R. I.; GONÇALVES, I. L.; HONAISSER, T. C.; PAROUL, N.; OLIVEIRA, D. Toxicity of clove essential oil and its ester eugenyl acetate against *Artemia salina*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 77, n. 1, p. 155-161, 2017.
- CARVALHO, P.C.F.; MORAES, A.; PONTES, L.S.; ANGHINONI, I.; SULC, R.M.; BATELLO, C. Definições e terminologias para Sistema Integrado de Produção Agropecuária. **Revista Ciência Agronômica**, v.45, n.5 (Especial), p.1040-1046, 2014.
- CHIAVEGATO, L.G.; MISCHAN, M.M. Efeito de *Tetranychus (T.) urticae* na produção do morangueiro *Fragaria* sp. (Koch, 1836) Boudreaux & Dosse, 1963 (Acari, Tetranychidae) cv. ‘Campinas’. **Científica** **9**: p. 257-266, 1991.

CHRISTENHUSZ, M. J. M.; BYNG, J. W. The number of known plants species in the world and its annual increase. **Phytotaxa**, 261, p. 201-217, 2016.

CORRÊA, M. P.; Dicionário de Plantas Úteis do Brasil, **Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal: Rio de Janeiro**, 1984, vol. 5.

COTA, B. B.; OLIVEIRA, D. M.; SIQUEIRA, E. P.; SOUZA-FAGUNDES, E. M.; PIMENTA, A. M. C.; SANTOS, D. M.; RABELLO, A.; ZANI, C. L. New cassane diterpenes from *Caesalpinia echinata*. **Elsevier**, v. 82, p. 969-975, 2011.

DAMASIO, K. Liberação recorde reacende debate sobre uso de agrotóxicos no Brasil. National Geographic, 2019. Documento eletrônico. Disponível em: <<https://www.nationalgeographicbrasil.com/meio-ambiente/2019/07/liberacao-recorde-reacende-debate-sobre-uso-de-agrototoxicos-no-brasil-entenda>>. Acesso em: 02 de junho de 2021.

DE OLIVEIRA, A. S.; ZAPP, E.; BRONDANI, D.; HOPPE, T. D.; MEIER, L.; & BRIGHENTE, I. M. C. Investigation of antioxidant activity, acute toxicity and Anticholinesterasic potential of *Lippia hirta* (Verbenaceae). **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 2, p. 432-448, 2019.

DE OLIVEIRA, L. F. C.; EDWARDS, H. G.; VELOZO, E. S.; NESBITT, M. Vibrational spectroscopic study of brazilin and brazilin, the main constituents of brazilwood from Brazil. **Vibrational spectroscopy**, v. 28, n. 2, p. 243-249, 2002.

DEWICK, P. M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. **Chichester: University of Nottingham**, 2002, 507 p. ISBNs: 0471496405.

DICKSON, R. A.; HOUGHTON, P. J.; HYLANDS, P. J. Antibacterial and antioxidant cassane diterpenoids from *Caesalpinia benthiana*. **Phytochemistry**, v. 68, n. 10, p. 1436-1441, 2007.

EMBRAPA. Embrapa mostra a importância do Manejo Integrado de Pragas na Agri-show. Documento eletrônico. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1671932/embrapa-mostra-a-importancia-do-manejo-integrado-de-pragas-na-agrishow>>. Acesso em: 02 jun. 2021.

ERHARUYI, O.; IMIEJE, V. O.; OSEGHLE, I. O.; UBHENIN, A. E.; FALODUN, A.; CHOUDHARY, M. I. Identification of Compounds and Insecticidal Activity of the Root of Pride of Barbados (*Caesalpinia Pulcherrima* L.). **Jasem ISSN**, v. 21(2), p. 281-287, 2017.

FADINI, M. A. M.; PALLINI, A.; VENZON, M. Controle de ácaros em sistema de produção integrada de morango. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1271-1277, 2004.

GAMAL, A. El. K.; SHARABASY, H. M. El; MAHMOUD, M. F.; BAHGAT, I. M. Toxicity of Two Potential Bioinsecticides Against Moveable Stages of *Tetranychus urticae* Koch. **Journal of Applied Sciences Research**, v.3, p11-13, 2007.

GAGNON, E.; LEWIS, G. P.; LIMA, H. C. A new system for the pantropical *Caesalpinia* group (Leguminosae). **PhytoKeys**, 71, p. 1-160, 2016.

GAGNON, E.; LEWIS, G. P.; LIMA, H. C. *Paubrasilia* in Flora do Brasil 2020. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB602727>>. Acesso em: 12 nov. 2021

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

GOMES, E. C. B. S.; JIMENEZ, G. C.; SILVA, L. C. N.; SÁ, F. B.; SOUZA, K. P. C.; PAIVA, G. S.; SOUZA, I. A. Evaluation of antioxidant and antiangiogenic properties of *Caesalpinia echinata* extracts. **Journal of Cancer**, v. 5, p. 143-150, 2014

HARADA, T. N. Correlação entre os ensaios de citotoxicidade em *Artemia salina* Leach e atividade antineoplásica sobre linhagens de células tumorais para algumas classes de produtos naturais. 2009. 92 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2009.

IBAMA. 1992. Lista oficial de espécies da flora Brasileira ameaçadas de extinção (unpublished).

IGARASHI, M. A. Pubvet, v. 2(31), Ed. 42, Art. 386, 2008.

IPEF. *Caesalpinia echinata* in Identificação de Espécies Florestais, Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais. **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**.

IUCN 2021. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021-1. <<https://www.iucn-redlist.org>> Acesso em: 25 mai. 2021.

JIANG, R. W. MA, S. C. BUT, P. P. H., & MAK, T. C. New Antiviral Cassane Furanoditerpenes from *Caesalpinia minax*. **Journal of natural products**, v. 64, n. 10, p. 1266-1272, 2001.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. Plant Systematics: a phylogenetic approach, Sinauer Assoc, 287-292, ISBN 0-87893-403-0. 2002.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. **Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético**. Artmed Editora, 2009.

LEAL, A. L. A. B.; BEZERRA, C. F.; CONFORTIN, C.; da SILVA, L. E.; MARINHO, E. M., MARINHO, M. M., ... & Dos SANTOS, H. S. Chemical composition and potentiating action of Norfloxacin mediated by the essential oil of *Piper caldense* CDC against *Staphylococcus aureus* strains overexpressing efflux pump genes. *Archives of Microbiology*, 1-10. (2021).

LOPES, J. M. S.; MOREIRA, S. G. C.; NETO, N. M. B. Selective Inner-Filter on the Fluorescence Response of Chlorophyll na Pheophytin Molecules Extracted for *Caesalpinia echinata* Leaves. **Sociedade Brasileira de Química**. v. 31, n. 1, p. 162-169, 2020.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. **São Paulo: Instituto Plantarum**, p. 368, 2002.

- MAGALLON, S.; SANDERSON, M. J. Absolute diversification rates in angiosperm clades. **Evolution**, v. 55, n. 9, p. 1762-1780, 2001.
- MARUYAMA, W. I.; TOSCANO, L. C.; BOIÇA JÚNIOR, A. L.; BARBOSA, J. C. Resistência de genótipos de tomateiro ao ácaro rajado. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n.3, p.480-484. 2002.
- MELO, J. P. R.; CAMARA, C. A. G.; LIMA, G. S. L.; MORAES, M. M.; ALVES, P. B. Aca-ricidal properties of the essential oil from *Aristolochia trilobata* and its major constituents aga-
inst the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*). **NRC Research Press**. v. 98, 2018.
- MERLINO, T. O veneno no pão nosso de cada dia. **Revista Caros Amigos, São Paulo: Casa Amarela, edição de dezembro de**, 2009.
- MEYER, B.N.; FRERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; McLAUGHLIN, J.L. Brine Shrimp: A Convenient General Biosay for Active Plant Constitu-
ents. **J. Med. Plants Res.** v.45, p. 31-34, 1982.
- MITSUI, T.; ISHIHARA, R.; HAYASHI, K. I.; MATSUURA, N.; AKASHI, H.; & NOZAKI, H. Cassane-type diterpenoids from *Caesalpinia echinata* (Leguminosae) and their NF- κ B sig-
naling inhibition activities. **Phytochemistry**, v. 116, p. 349-358, 2015.
- MORAES M. M.; CAMARA C. A. G.; SILVA M. M. C. Comparative toxicity of essential oil and blends of selected terpenes of *Ocotea* species from Pernambuco, Brazil, Against *Tetranychus urticae* Koch. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**. v. 89, 2017.
- NASCIMENTO J. E.; MELO A. F. M.; LIMA T. C.; VERAS FILHO J.; SANTOS E. M.; ALBUQUERQUE U. P.; AMORIM E. L. C. Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (*Phyllanthaceae*). **Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada**, v. 29, n. 2, p. 145-150, 2008.
- RAHMAN, A.; CHOUDHARY, M. I.; THOMSON, W. J. Bioassay techniques for drug devel-
opment, **Harwood academic publishers**, 2001.
- RAHMAN, A. H. M. M.; PARVIN, M. Ismot Ara. Study of medicinal uses on Fabaceae family at Rajshahi, Bangladesh. **Research in Plant Sciences**, v. 2, n. 1, p. 6-8, 2014.
- RE R.; PELEGRINI N.; PROTEGGENTE A.; PANNALA A.; YANG M.; RICEEVANS C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radic. Biol. Med.** 26:1231–1237.
- REZENDE, C. M.; CORRÊA, V. F.; COSTA, A. V.; CASTRO, B.; & ALVES, R. J. Consti-
tuintes químicos voláteis das flores e folhas do pau-brasil (*Caesalpinia echinata*, Lam.). **Quí-
mica Nova**, v. 27, n. 3, p. 414-416, 2004.
- RIBEIRO, N.; CAMARA, C.; RAMOS, C. Toxicity of essential oils of *Piper marginatum* Jacq. against *Tetranychus urticae* Koch and *Neoseiulus californicus* (McGregor). **Chilean journal of agricultural research**, v. 76, n. 1, p. 71-76, 2016.

ROCHA, Y. T. Ibirapitanga: história, distribuição geográfica e conservação do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* LAM., Leguminosae) do descobrimento à atualidade. Tese (Doutorado em Geografia Física) – Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas. **Universidade de São Paulo**, doi:10.11606/T.8.2004.tde-30062021-110505, 2004.

SANCHES, N. F.; NASCIMENTO, A. S.; MARTINS, D. S.; MARIN, S. L. D. Pragas. In: RITZINGER, C. H. S. P., SOUZA, J. S. Mamão: Fitossanidade. Brasília: EMBRAPA: **Comunicação para Transferência de Tecnologia**, 2000, p.91.

SANTOS, A. S.; ALVES, S. D. M.; FIGUEIREDO, F. J. C.; DA ROCHA NETO, O. G. Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. **Embrapa Amazônia Oriental Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2004.

SAS INSTITUTE. SAS User's Guide: Statistics, Version 9.0, 7th ed. **SAS Institute, Cary, NC**. 2002.

SILVA E. M. S.; FREITAS B. M.; SANTOS F. A. R. Chemical Composition and Free Radical Scavenging Activity of Pollen loads from Stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. **J. Food Compost. Anal.** 19:507–511, 2006.

SILVA, I. C.; GOZZO, A. J.; NUNES, V. A.; TANAKA, A. S.; ARAUJO, M. S. Bioengineering of an elastase inhibitor from *Caesalpinia echinata* (Brazil wood) seeds. **Phytochemistry**. V. 182, 2021.

SIMÕES, C. M. O.; & SPITZER, V. OLEOS VOLATEIS. IN: SIMOES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. & PETROVICK, (orgs). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Florianópolis: Ed. UFSC. 2003. 467 p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora UFSC. 5 ed, P.404, 2004.

SMAILI, T.; BENDIF H.; ÖZTÜRK M.; FLAMINI G. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oil from *Daucus reboudii* Coss., an Endemic Plant of Algeria. **Applied Sciences**, v. 11, n. 4, p. 1843, 2021.

STEVENS, P. F. Fabaceae. Angiosperm Phylogeny Website. Verson 7 May 2006. Retrived 28 April 2008.

TELES, A. M.; SILVA, J. V. S.; FERNANDES, J. M. P.; CALABRESE, K. S.; SILVA, A. L. A.; MARINHO, S. C.; MOUCHREK, A. N.; FILHO, V. E. M.; SOUZA, F. A. *Aniba rosaeodora* (Var. amazônica Ducke) Essential Oil: Chemical Composition, Antibacterial, Antioxidant and Antitrypanosomal Activity. **Antibiotics**, v. 24, 2021.

TOLDI, M.; FERLA, N. J.; DAMEDA, C.; MAJOLO, F. Biology of *Neoseiulus californicus* feeding on two-spotted spider mite. **Biotemas**, v. 26, n.2, p.105-111, 2013.

VAN DEN DOOL H, KRATZ P. D. 1963. A Generalization of the Retention Index System Including Linear Temperature Programmed Gas-Liquid Partition Chromatography. *J Chromatogr A*. 11:463-471.

VARÓ, I.; NAVARRO, J. C.; AMAT, F.; GUILHERMINO, L. Characterisation of cholinesterases and evaluation of the inhibitory potential of chlorpyrifos and dichlorvos to *Artemia salina* and *Artemia parthenogenetica*. **Chemosphere**, v. 48, n. 6, p. 563-569, 2002.

WENZEL, I. M.; BATISTA, A. Efeito de agrotóxicos na patogenicidade dos conídios de *Lecanicillium lecanii* a *Tetranychus urticae*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, p. 261-266, 2020.