UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

VIVIANE CRISTINA GUMIERO

Estudo do efeito de respostas de hipersensibilidade do extrato de nim

(Azadirachta indica)

sobre cultura de células de *Rubus fruticosus*

RIBEIRÃO PRETO

2008

VIVIANE CRISTINA GUMIERO

Estudo do efeito de respostas de hipersensibilidade do extrato de nim

(Azadirachta indica)

sobre cultura de células de *Rubus fruticosus*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientadora: Profa. Dra. Carem Gledes Vargas Rechia

RIBEIRÃO PRETO

2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação

Serviço de Documentação Farmacêutica

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

da Universidade de São Paulo

Gumiero, Viviane Cristina.

Estudo do efeito de respostas de hipersensibilidade do extrato de nim (*Azadirachta indica*) sobre cultura de células de *Rubus fruticosus*/ Viviane Cristina Gumiero; orientadora Carem Gledes Vargas Rechia. – Ribeirão Preto, 2008.

123 f.: fig.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Concentração: Produtos Naturais) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. Respostas de hipersensibilidade. 2. *Azadirachta indica*. 3. Nim. 4. *Rubus fruticosus*. 5. Espécies reativas de oxigênio. 6. Elicitor. 7. Cultura de células.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Viviane Cristina Gumiero

Estudo do efeito de respostas de hipersensibilidade do extrato de nim (*Azadirachta indica*) sobre cultura de células de *Rubus fruticosus*

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre.
Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Aprovada em:/...../.....

Banca Examinadora

Profa. Dra. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Profa. Dra. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Profa. Dra. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico às pessoas que quando olho para trás, sinto muitas saudades, das quais me aconselharam quando me senti sozinha, e me deram força quando eu não estava muito animada. Guardo todas as pessoas importantes da minha vida em uma caixinha dentro do meu coração...

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Carem Gledes Vargas Rechia, orientadora, que logo que me conheceu abriu as portas de seu laboratório e que rapidamente me encaminhou para o tema tratado nesta dissertação. Agradeço pela disponibilidade de tempo e paciência revelada ao longo destes anos e pelas críticas e sugestões relevantes feitas durante a orientação.

Aos meus pais, pelo estímulo e apoio incondicional; pela paciência e grande amizade com que sempre me ouviram e sensatez com que sempre me ajudaram, apesar do 'débito' de atenção para com vocês; e pela excitação com que sempre reagi aos resultados acadêmicos ao longo da minha vida curricular.

À minha irmã, Helen Cássia Gumiero, pelo carinho e força que me dá, desculpe-me por não estarmos sempre juntas nos momentos mais importantes.

Aos estimados colegas de laboratório, Verônica Paviani, Vitor Francisco dos Santos, Cibele Aparecida Cesila, Wagner Rodrigo dos Santos, Roberta de Mello, Fernando Aparecido Mariano de Souza e José Franciraldo Lima, agradeço pela amizade, humildade, apoio e disponibilidade de tempo e acertos necessários para que eu pudesse cumprir com todas as minhas obrigações acadêmicas. Espero que o entusiasmo, seriedade e empenho que ponho neste trabalho lhes possa servir de estímulo para fazerem sempre “mais e melhor” e que a relação pessoal e profissional que criamos e não se perca jamais.

Agradeço em especial a Roberta de Mello por ter sido mais que colega de trabalho, uma das melhores amigas que tive após mudar para Ribeirão Preto, vou sempre lembrar de você com carinho e torcer para que seja muito feliz.

Aos meus amigos do Laboratório de Farmacotécnica do Prof. Dr. Luís Alexandre Pedro de Freitas por terem compartilhado comigo suas histórias, e assim me inspirando e incentivando para o caminhar desta jornada.

Às minhas amigas Sílvia Tognoli e Bruna Moreira pela amizade e por terem me acolhido numa época em que mais precisei.

Ao Thiago Santos Hirose, pelas inúmeras trocas de impressões, comentários do meu trabalho e, acima de tudo, pelo inestimável companherismo que obtive no fim desta jornada que preencheu as diversas falhas que fui tendo por força das circunstâncias e, que me deu mais forças de crescer profissionalmente e como pessoa. Agradeço também pela paciência e compreensão reveladas ao longo destes meses.

Ao Alcides Silva Pereira, pela competência, amizade, humildade, presteza e por sempre levantar o meu astral mesmo quando não estava muito disposta.

À Nadir Mazzucato, pelo auxílio que sempre prestou ao nosso laboratório e que devido a isto fez com que dedicássemos maior tempo em nossos experimentos e os terminássemos mais rapidamente. Obrigada pela vontade de estar sempre nos ajudando.

À Ana Cristina Morseli Polizello, Ieda Maria Razaboni Prado e Ana Elisa Caleiros Seixas Azzolini, pela grande competência, discernimento e atenção dispensada a

todos do laboratório de Bioquímica, mesmo quando não tinham tempo ou obrigação para isto.

Aos colegas de Pós-Graduação do Laboratório de Bioquímica, Luciana Mariko Kabeya, Daniela Paula dos Santos Phelippin, Cezar Rangel Pestana, Denise Pimenta Leitão, Anaísa Fernandes Calgaro Helena, Daniel Dorta Junqueira, Fernando Postalli Rodrigues, Andresa Bernardes Caparroti, Fabiana da Silva Paulo, Andréa da Silva Figueiredo, Carolina Nakau Fuzissaki, Everton de Oliveira Lima dos Santos, Ana Paula Landi Librandi, Mateus Freire Leite e todos aqueles que saíram do nosso convívio e àqueles que estão entrando, agradeço de coração a atenção, amizade e consideração dispensada por vocês. Desejo sucesso a todos.

Aos Profs. Drs. do Laboratório de Bioquímica Ana Isabel de Assis Pandochi, Carlos Curti, Augusto César Spadaro e Yara Maria Lucisano Valim, pela atenção e por terem cedido seus alunos e funcionários no desenvolvimento de meu trabalho.

A Profa. Dra. Hosana Maria Debonisi, pela boa vontade em permitir o uso de seu laboratório e, em particular, ao funcionário José Carlos Tomaz.

À professora Tatiana Ries Vieira, por seu carinho, por ter sido minha orientadora na Iniciação Científica, por me mostrar na prática que os alunos se desenvolvem mais e melhor quando são valorizados.

Ao meu amigo, Gustavo Sivieri de Araújo, por ter me inspirado a fazer o curso de Mestrado em Ribeirão Preto.

Considerando esta dissertação como resultado de uma caminhada que não começou na USP, agradecer pode não ser tarefa fácil, nem justa. Para não ser

injusta, agradeço de antemão a todos que de alguma forma passaram pela minha vida e contribuíram para a construção de quem sou hoje.

Agradeço a todos que compõe a banca examinadora.

A todos que, direta ou indiretamente, tenham participado da realização deste trabalho, desculpem-me se esqueci de citar alguém.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela bolsa concedida durante os anos do curso.

E, finalmente a DEUS, pela oportunidade e privilégio que permitiram compartilhar de tamanha experiência e, ao freqüentar este curso, perceber e atentar para a relevância de temas que não faziam parte, em profundidade, de minha vida anteriormente.

“A vida só pode ser compreendida, olhando-se para trás; mas só pode ser vivida, olhando-se para frente”.

Soren Kierkegaard

RESUMO

GUMIERO, V. C. **Estudo do efeito do extrato de nim (*Azadirachta indica*) em cultura de células de *Rubus fruticosus***. 2008. 123 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

O nim (*Azadirachta indica*) é conhecido na Ásia devido a várias propriedades biológicas conhecidas desde a antigüidade. Os estudos referentes à ação inseticida dessa planta restringem-se a análise de seus mecanismos de ação sobre insetos e também de seus efeitos sobre trabalhadores rurais que fazem uso de produtos a base de nim; não havendo, na literatura pesquisada, trabalhos relativos aos impactos causados sobre o sistema vegetal. As plantas, assim como outros organismos, possuem a capacidade de se defenderem contra ataque de patógenos. Uma das respostas desencadeadas pelo reconhecimento do patógeno pelas células vegetais é a reação de hipersensibilidade (RH), que envolve a morte imediata das células do sítio primário de infecção, oferecendo resistência ao crescimento do patógeno. A RH é caracterizada pela necrose dos tecidos onde primeiro se manifestou a infecção, e este processo de morte celular programada envolve uma série de sinais que ainda não estão completamente elucidados. Neste trabalho, foram estabelecidas as condições do meio de cultura de células de *Rubus fruticosus* para os estudos com extrato de sementes de nim, avaliado o efeito elicitor deste sobre a cultura. Foram obtidos extratos hidroalcoólicos E1 e E2 e suas respectivas frações liofilizadas, L1 e L2. Estes extratos apresentaram maior teor de açúcares e lipídeos em sua composição e revelaram potencial antioxidante. Detectou-se a presença de AZA-A em L1 e L2, por meio de CLAE, cujos teores foram de 5,03 e 1,1

µg/mL, respectivamente, com tempo de retenção em torno de 9,5 minutos, confirmado por meio de análises via espectrometria de massas. O extrato L2 foi fracionado nas frações L2 inicial e AZA2. O extrato L2, nas concentrações de 0,1; 0,5; 1 e 5 mg/mL, e destas frações AZA2 e L2 inicial nas proporções do extrato L2 nestas concentrações, elicitaram células de *Rubus fruticosus*. O extrato L2, nas concentrações de 0,1; 0,5; 1 e 5 mg/mL, e suas frações AZA2 e L2 inicial nas proporções do extrato L2 nestas concentrações, elicitaram células de *Rubus fruticosus*. As células de *Rubus fruticosus* (1,8g) foram incubadas em tampão citrato de sódio contendo o extrato L2 e as frações L2 inicial e AZA2, separadamente, até a concentração de 5 mg/mL, por 1h, em temperatura ambiente. Após este período, os compostos fenólicos, proteínas e açúcares redutores foram determinados no meio extracelular e intracelular por métodos colorimétricos. O efeito destas frações e do extrato L2, na produção de EROs em células intactas de *Rubus fruticosus*, foi analisado usando a sonda diacetato 2,7-diclorofluoresceína (LEE et al., 1999; MURATA et al., 2001). Os resultados obtidos indicam que AZA isolada não teve efeito sobre respostas de defesa. A fração L2 inicial teve aumento de fenólicos intracelulares, de açúcares redutores extracelulares e diminuição de EROs, com o aumento da concentração do elicitor, indicando potencial antioxidante e mecanismo de defesa. O extrato L2 também demonstrou potencial antioxidante e protetor das células com o aumento da concentração do elicitor, além de possuir ação inseticida.

Palavras-chave: Respostas de hipersensibilidade. *Azadirachta indica*. Nim. *Rubus fruticosus*. Espécies reativas de oxigênio. Elicitor. Cultura de células.

ABSTRACT

GUMIERO, V. C. **Study of the effects of neem (*Azadirachta indica*) extract in *Rubus fruticosus* cell culture**. 2008. 123 f. Master's degree - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

The neem (*Azadirachta indica*) is known in Asia due to their several biological properties. The studies on the insecticide action of neem extracts have only been restrict to the insect mechanisms and their effects on rural workers; studies on the impact in the vegetable system are not available. The plants, like the other organisms, have the ability to self-defend against attack of pathogens. The hypersensitive response (RH), a type of programmed cell death (PCD) in plants, is triggered by plant cells when they recognize the pathogen, and is characterized by necrosis of tissues in the local region surrounding the infection; the signals involved are still not completely elucidated. The present study evaluated the effects of neem extracts in *Rubus fruticosus* cell. The powdered seeds were submitted to two consecutive extractions with ethanol:water (1:1, v/v) at room temperature for 10 minutes, yielding E1 and E2 fractions. The solvent was evaporated and the aqueous extracts were concentrated and lyophilized, resulting in two samples, L1 and L2. They are used for analyses by high performance liquid chromatograph (HPLC) in C-18 column (4.6 x 250 mm), with acetonitrile–water (4:6 v/v) as mobile phase, flow rate 1 mL/min, monitored at 214 nm. The principal compound of this fraction was azadirachtin (5.03 and 1.1 µg/mL, respectively), the retention time was 9.5 min; it was confirmed using mass spectrophotometry. The L2 extract was partially

fractionated by high performance liquid chromatograph (HPLC) in semi preparative C-18 column. The main fractions, analyzed by colorimetric methods, ESI-MS, were L2 initial and AZA2. The *Rubus fruticosus* cells (18-21 days; 1.8 g) were incubated in sodium citrate buffer containing L2, L2 initial and AZA2 at concentrations up to 5 mg/mL, for 1h, at room temperature. After this period, the phenolic compounds, proteins and reducing sugar were determined in the extracellular and intracellular medium by colorimetric methods. Also, the effects of these fractions over the production of reactive oxygen species (ROS) in intact cell of *Rubus fruticosus*, was analyzed using 2,7-dichloro-fluorescein diacetate. AZA2 had no effect on the defense response. The initial L2 fraction increased the phenolic compounds in the intracellular medium and the reducing sugars in the extracellular medium. The same fraction showed an inhibitory effect on ROS and also increased the concentration of the elicitor. These results indicate the antioxidant potential and protector effect of the L2 initial. The L2 extract also demonstrated antioxidant and protective potential of cells with the increase of the elicitor concentration. Therefore, in parallel with its insecticide action, the neem extract contributes to the self-defense ability of the plants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Biossíntese de terpenos	27
Figura 2 -	Estrutura química de azadiractinas isoladas de sementes de nim.....	29
Figura 3 -	Via do ácido chiquímico.....	42
Figura 4 -	Via metabólica do corismato	43
Figura 5 -	Fluxograma de obtenção dos extratos a partir de sementes de nim.....	50
Figura 6 -	Perfil de absorbância em UV/VIS	65
Figura 7 -	Perfil cromatográfico dos extratos L1, L2 e do padrão de AZA-A.....	68
Figura 8 -	Perfil cromatográfico das amostras fortificadas.....	69
Figura 9 -	Curva analítica do padrão de AZA-A	70
Figura 10 -	Perfil cromatográfico dos extratos em escala semi- preparativa.....	72
Figura 11 -	Perfil cromatográfico dos picos isolados de AZA	73
Figura 12 -	Perfil cromatográfico dos picos isolados das frações L1 e L2 iniciais.....	74
Figura 13 -	Espectro de MS-ESI do padrão de AZA-A	77
Figura 14 -	Espectro de MSI-ESI do extrato L1	78
Figura 15 -	Espectro de MSI-ESI do extrato L2	79
Figura 16 -	Espectro de MS/MS-ESI do padrão de AZA-A	80
Figura 17 -	Espectro de MS/MS-ESI do pico de m/z 703 presente no	

	extrato de L1.....	81
Figura 18 -	Espectro de MS/MS-ESI do pico de <i>m/z</i> 703 presente no extrato de L2.....	82
Figura 19 -	Avaliação da atividade de inibição de espécies reativas de oxigênio	86
Figura 20 -	Liberação de proteínas totais	90
Figura 21 -	Liberação de açúcares redutores	93
Figura 22 -	Liberação de fenólicos totais	96
Figura 23 -	Curvas de liberação de EROs	99
Figura 24 -	Resposta da liberação de EROs do elicitor em relação ao controle.....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Quantidades de macro e microelementos utilizados para preparação do meio de Heller.....	57
Tabela 2 -	Composição das frações obtidas por extração hidroalcoólica de sementes de nim.....	63
Tabela 3 -	Composição das frações obtidas por extração hidroalcoólica dos extratos liofilizados de sementes de nim.....	63
Tabela 4 -	Valores de absorbância das frações no UV/VIS	65
Tabela 5 -	Porcentagem de inibição de EROs	86

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Acetil-CoA	Acetil-Coenzima A
ACN	Acetonitrila
AS	Ácido Salicílico
Avr	Avirulência
AZA	Azadiractina
BA2H	Ácido-Benzóico 2-Hidroxilase
BSA	Albumina de Soro Bovino
CAT	Catalase
C4H	Cinamato 4-Hidroxilase
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cm	Centímetro
c.f.m.	Fótons Contados por Minuto
DMAPP	Dimetilalil-Difosfato
DNS	Dinitro Salicilato
E1	Extrato Bruto 1
E2	Extrato Bruto 2
EB	Extrato Bruto
EL	Extrato Liofilizado
ELISA	“Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay” (Ensaio Enzimático)
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ESI	Ionização por <i>Spray</i> de Elétrons
F-I	Ramnoglucoronogalactana extraída do tegumento das sementes

	de paineira
FAL	Fenilalanina Amônia-Liase
FE	Fração Extracelular
FI	Fração Intracelular
FPP	Farnesil-Difosfato
g	Grama
GPP	Geranil-Difosfato
GGPP	Geranil-Geranil-Difosfato
GGT	Gama Glutamil-Transpeptidase
GSH	Glutathione Reduzida
GSH-Px	Glutathione-Peroxidase
GST	Glutathione-S-Transferase
h	Hora
H ₂ DCF-DA	Diacetato de 2,7-Diclorofluoresceína
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IAA	Ácido Indol-3-Acético
IAPAR	Instituto Agrônomo do Paraná
IC ₅₀	Concentração Inibitória de 50% de Atividade Biológica
IPP	Isopentenil-Difosfato
kV	Kilovolt
L	Litro
L1	Extrato Liofilizado 1
L2	Extrato Liofilizado 2
L2 inicial	Fração inicial do extrato L2
LOX	Lipoxigenase

m	Metro
M	Massa Molecular de Azadiractina
MAPK	Proteína Quinase Mitógeno-Ativada
MeJA	Metil Jasmonato
MeSA	Metil Salicilato
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmol	Milimol
MNNG	Nitrosamina Carcinogênica <i>N</i> -Metil- <i>N'</i> -Nitro- <i>N</i> -Nitrosaguanidina
mRNA	Ácido Ribonucléico Mensageiro
MS	Espectrometria de Massas
m/v	Massa por Volume
m/z	Relação Massa-Carga
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzida
nm	Nanômetro
OSD	Octadecilsilano
pH	Potencial Hidrogeniônico
POX	Peroxidase
Proteínas PR	Proteína Relacionada á Patogênese
QL ^{HRP}	Quimioluminescência produzida pela Reação HRP-H ₂ O ₂ -Luminol
QLlum	Quimioluminescência dependente de Luminol
RH	Resposta de Hipersensibilidade
RMN	Ressonância Magnética Nuclear

RSA	Resistência Sistêmica Adquirida
s	Segundo
SOD	Superóxido-Dismutase
t.a.	Temperatura Ambiente
TC	Tampão Citrato
Tris	Tris-Hidroximetil Aminometano
µg	Micrograma
UI	Unidade Internacional
µL	Microlitro
µm	Micrometro
URF	Unidades Relativa à Fluorescência
UV	Ultravioleta
v/v	Volume/Volume
V	Volt
W	Watt

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	23
1.1	O nim, <i>Azadirachta indica</i>	24
1.2	Funções biológicas do nim.....	29
2	Espécies reativas de oxigênio (EROS)	33
3	Resposta de hipersensibilidade (RH).....	36
3.1	Ácido salicílico.....	40
3.2	<i>Rubus fruticosus</i> (amora preta).....	43
4	OBJETIVOS	46
4.1	Objetivo geral.....	46
4.2	Objetivos específicos	46
5	MATERIAL E MÉTODOS	47
5.1	Equipamentos	48
5.2	Reagentes.....	48
5.3	Obtenção das sementes	48
5.4	Preparação do extrato bruto (EB), a partir de sementes de <i>Azadirachta indica</i> , nim	49
5.5	Caracterização dos extratos E1, E2, L1 e L2.....	51
5.5.1	Determinação do teor de açúcares totais	51
5.5.2	Determinação do teor de açúcares redutores.....	51
5.5.3	Determinação do teor de compostos fenólicos.....	51

5.5.4	Determinação do teor de proteínas.....	52
5.5.5	Determinação do teor de lipídeos	52
5.5.6	Análise em espectrofotômetro de varredura dos extratos L1 e L2	53
5.5.7	Determinação do teor de AZA nos extratos por análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	53
5.5.8	Fracionamento dos extratos L1 e L2 por CLAE em escala preparativa	54
5.5.9	Caracterização das frações L1 e L2 iniciais.....	54
5.5.10	Análise do extrato de sementes de nim através de espectrometria de massas com ionização por <i>electrospray</i> (ESI-MS)	54
5.5.11	Determinação do efeito antioxidante do extrato de nim empregando a reação HRP-H ₂ O ₂ -luminol.....	55
5.6	Ensaio biológicos	56
5.6.1	Cultivo de células de <i>Rubus fruticosus</i>	56
5.6.2	Viabilidade das células de <i>Rubus fruticosus</i>	57
5.6.3	Ensaio de elicitação	57
5.6.4	Obtenção da fração intracelular (FI)	58
5.6.5	Análise das frações intracelular (FI) e extracelular (FE)	59
5.6.5.1	Determinação do teor de açúcar redutor nas frações FI e FE	59
5.6.5.2	Determinação do teor de compostos fenólicos nas frações FI e FE.....	59
5.6.5.3	Determinação do teor de proteínas nas frações FI e FE	59
5.6.5.4	Determinação de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	59
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
6.1	Padronização da preparação do EB obtido a partir de sementes de	

	<i>Azadirachta indica</i> , nim	61
6.2	Caracterização de EB e EL partir de sementes de nim	61
6.2.1	Avaliação do perfil de absorção dos extratos em UV/VIS.....	64
6.2.2	Identificação e quantificação de AZA nos extratos por CLAE.....	66
6.2.3	Análise por MS-ESI das frações L1 e L2	75
6.2.4	Caracterização cromatográfica das frações L1 e L2 iniciais	83
6.2.5	Determinação do potencial antioxidante do extrato de nim empregando a reação HRP-H ₂ O ₂ -luminol.....	83
6.3	Atividade elicitora dos extratos de nim.....	87
6.3.1	Análise do teor de proteínas nas frações FI e FE.....	87
6.3.2	Determinação do teor de açúcares redutores nas frações FI e FE	91
6.3.3	Determinação do teor de fenólicos nas frações FI e FE	94
6.4	Efeito do extrato de nim sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	97
7	CONCLUSÕES.....	102
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

1 – INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

O uso constante de produtos químicos nas lavouras acarreta a presença de altos níveis de resíduos tóxicos nos alimentos, desequilíbrio biológico, contaminações ambientais, intoxicações de pessoas e animais, ressurgência de pragas, surtos de pragas secundárias e o aparecimento de linhagens de insetos resistentes (SAXENA, 1989; TRINDADE et al., 2000).

Devido aos efeitos nocivos ocasionados no meio ambiente pelo uso de pesticidas químicos e devido à restrição destes produtos em alguns países, muita ênfase tem sido dada aos biopesticidas (BRAHMACHARI, 2004).

Segundo Schoonhoven e colaboradores (1998), é necessário saber a concentração exata de compostos presentes nos extratos de plantas usadas como biopesticidas. Os compostos ativos e suas concentrações podem diferir com as partes das plantas usadas, condições de crescimento, clima e idade da planta. Van der Nat e colaboradores (1991) relataram que muitos metabólitos secundários têm sido identificados e purificados, o que torna mais seguro utilizar biopesticidas comerciais contendo metabólitos secundários, cujas concentrações e caracterizações estruturais estão estabelecidas na formulação e avaliadas quanto à toxicidade em humanos e animais (BOEKE et al., 2004).

Os biopesticidas podem proteger as plantas do ataque de patógenos devido à presença de metabólitos secundários que atuam como inseticida ou que aumentem a resistência da planta afetada. Essa resistência ocorre quando da interação planta-biopesticida há o desencadeamento da Resposta de Hipersensibilidade (RH), seguida por Resposta Sistêmica Adquirida (RSA).

A indústria de defensivos tem desenvolvido moléculas capazes de protegerem diferentes plantas contra os patógenos causadores de doenças apenas pela indução

de mecanismos de defesa da planta (ZADOKS, 1997). Diversos trabalhos mostram o potencial de plantas no controle de fitopatógenos, tanto por sua ação fungicida quanto pela capacidade de induzir o acúmulo de fitoalexinas (SCHWAN-ESTRADA et al., 1997; STANGARLIN et al., 1999), indicando a presença de moléculas com característica elicitora. Portanto, estudos de análise do potencial de biopesticidas em induzir respostas de defesa nas plantas são de grande importância para o aproveitamento destes compostos.

1.1 - O nim, *Azadirachta indica*

O gênero *Azadirachta* contém apenas três espécies: *Azadirachta indica* A. Juss, *Azadirachta siamensis* Valetton e *Azadirachta excelsa* (Jack) Jacobs, todas pertencentes à família Meliaceae. A primeira espécie cresce principalmente na área costeira da Índia, *Azadirachta excelsa* no sul da Tailândia e *Azadirachta siamensis* cresce em toda a Tailândia (KANOKMEDHAKUL et al., 2005). No Brasil, a espécie *Azadirachta indica* (nim) foi introduzida em 1984 e, hoje se encontra em quase todas as regiões do País, pois este possui áreas com condições climáticas adequadas para o plantio do nim, principalmente nas regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste (MARTINEZ, 2002).

O nim é característico de clima tropical, possui de 15 a 20 m de altura, de casca cinza-escura e fissurada. Floresce de fevereiro a maio e seus frutos amadurecem de junho a agosto, na área de ocorrência natural. O solo ideal para o desenvolvimento do nim deve ser bem drenado e poroso, com pH em torno de 7,0. O cultivo do nim, preferencialmente, é realizado a partir de sementes frescas ou através de mudas, removendo as folhas e plantando-as em terra úmida, podendo ser propagada por sementes, estacas provenientes de raízes e ainda por

propagação *in vitro*. A produção de sementes inicia-se após dois a três anos do plantio da muda. As sementes são retiradas de frutos maduros, colhidos da planta ou de frutos recém caídos ao solo, os quais são despulpados à mão e as sementes são secadas à sombra. Após a secagem, as sementes devem ser acondicionadas em sacos de fibra para facilitar a aeração, mantendo-as em ambiente fresco e seco (EMBRAPA, 2006).

As sementes perdem rapidamente a viabilidade, de 85% a 95% a partir do primeiro dia da colheita, até as duas primeiras semanas. Então, a sua capacidade germinativa começa a diminuir aceleradamente. Consegue-se boa germinação até seis ou sete semanas da colheita, o que dependerá do processo de secagem e do ambiente em que se armazenarem as sementes (MARTINEZ, 2002).

Extratos de nim são muito utilizados na agricultura orgânica visto que são biodegradáveis e permanecem pouco tempo no solo. Existem poucos efeitos nocivos provocados pelo nim, em humanos e em animais, já documentados na literatura, sendo a maioria deles facilmente reversíveis. A toxicidade pode variar de acordo com o tipo de solvente empregado durante a extração (CARNEIRO, 2003).

O nim possui vários metabólitos secundários sendo, na sua maioria, solúveis em água o que torna as extrações rápidas e de baixo custo. Todavia, a extração alcoólica permite obter maior quantidade de compostos em tempo menor. Para extração, as sementes devem estar bem secas para evitar a ativação de enzimas e posterior degradação do extrato. Os extratos podem ser veiculados em xampus, dentifrícios, sabões medicinais e pomadas (UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS, 2006).

Mais de 300 componentes foram caracterizados das sementes de nim, sendo que a maioria são limonóides. Azadiractina é o limonóide mais importante presente

nas sementes de nim (SILVA et al., 2007). Os limonóides pertencem à classe dos terpenos. São conhecidos como meliacinas, devido ao seu sabor amargo e por terem como principais fontes as espécies da família Meliaceae (VIEGAS JÚNIOR, 2003).

Os terpenos são formados, principalmente, a partir da via do mevalonato (Figura 1). O mevalonato é formado pela condensação de uma unidade da acetoacetil-CoA com uma molécula da acetil-CoA. Após a condensação aldólica, ocorre uma hidrólise originando o 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA que é reduzido a mevalonato, numa reação irreversível. O mevalonato é, então, convertido em isopentenil-difosfato (IPP), ou isopreno ativo, a unidade básica na formação dos terpenos e esteróides. Uma isomerase catalisa a conversão do isopentenil-difosfato a seu isômero dimetilalil-difosfato (DMAPP), os dois reagem, formando o *trans*-geranil-difosfato que dará origem aos monoterpenos. O geranil-difosfato (GPP) condensa no sentido cabeça-cauda com o isopentenil-difosfato formando farnesil-difosfato (FPP), resultando em sequiterpenóides (C₁₅). Uma nova molécula de IPP reage com o farnesil-difosfato, originando o geranil-geranil-difosfato (GGPP) que será a precursor dos diterpenos (C₂₀). Finalmente, FPP e GGPP se dimerizam originando os triterpenos (C₃₀) e os tetraterpenos (C₄₀), respectivamente (TAIZ; ZEIGER, 2002).

Figura 1. Biossíntese de terpenos (adaptado de TAI, ZEIGER, 2002).

Segundo Kanokmedhakul e colaboradores (2005), vários isômeros de azadiractina foram encontrados na espécie *Azadirachta indica* (Figura 2), tais como as azadiractinas A, B, C, D, E, F e G (KLENK; BOKEL; KRAUS, 1986; REMBOLD; FOSTER; SONNENBICHLER, 1987; REMBOLD, 1989), H e I (GOVINDACHARI; SANDHYA; RAJ, 1992; RAMJI; VENKATAKRISHNAN; MADYASTHA, 1996), J e K (GOVINDACHARI; SANDHYA; RAJ, 1992; GOVINDACHARI et al., 1996).

As azadiractinas A e B são os principais metabólitos presentes nas sementes do nim e são consideradas as mais importantes para a comercialização da planta como biopesticida. Klenk e sua equipe (1986) e Rembold (1990) relataram que a percentagem de azadiractina B, em relação a azadiractina A, é de 1 a 5%, ao contrário da relação das outras azadiractinas que é de 0,1 a 0,01% em relação à azadiractina A, nas sementes de nim (SIDHU; KUMAR; BEHL, 2003).

A azadiractina A (dimetil (2a*R*,3*S*,4*S*,4a*R*,5*S*,7a*S*,8*S*,10*R*,10a*S*,10b*R*,)-10-(acetiloxi)-3,5-di-hidroxi-4-[(1a*R*,2*S*,3a*S*,6a*S*,7*S*,7a*S*)-6a-hidroxi-7a-metil-3a,6a,7,7a-tetra-hidro-2,7-metanofuro[2,3-*b*] oxireno[*e*]oxepin-1a(2*H*)-*y*]]-4-metil-8-{[(2*E*)-2-metilbut-2-enoil]oxi}octa-hidro-1*H*-naftol[1,8a-*c*:4,5-*b'**c'*] difurano-5,10a(8*H*)-dicarboxilato) foi isolada pela primeira vez por Butterworth e Morgan em 1968 (BUTTERWORTH; MORGAN, 1971). A estrutura molecular da azadiractina A foi proposta em 1975 (ZANNO et al., 1975), porém sua estrutura foi definida corretamente depois de quase 20 anos (BILTON et al., 1987; KANOKMEDHAKUL et al., 2005; KRAUS et al., 1985).

Figura 2. Estrutura química de azadiractinas isoladas de sementes de nim. (A) azadiractina A, (B) azadiractina B e (C) azadiractina H (adaptado de SILVA et al., 2007).

A azadiractina é acumulada principalmente nos frutos, aumentando sua concentração ao longo do desenvolvimento (MARTINEZ, 2002; MOSSINI; KEMMELMEIER, 2005). Ermel (1995) afirma que o conteúdo de azadiractina nas sementes é influenciado por diferenças agroclimáticas entre diferentes regiões demográficas como pela temperatura, umidade, luz solar, modo de colheita e armazenamento. Entretanto, Sidhu e colaboradores (2003) acreditam que a produção de azadiractina não dependa apenas das variações climáticas e sim, da variabilidade genética que existe entre árvores individuais de nim.

1.1.1 - Funções biológicas do nim

Há muitos séculos, o valor medicinal das folhas e das sementes de nim (*Azadirachta indica*) tem sido reconhecido na Ásia. Esta planta, nativa da Índia vem sendo utilizada para fins medicinais como praguicida, o que a tornou de grande

interesse para a pesquisa científica. Ela fornece grande número de metabólitos secundários com atividade biológica, sendo a azadiractina considerada a de maior importância ecológica na busca por métodos ambientalmente seguros e no controle de pragas de forma mais econômica.

Segundo a revisão de artigos realizada por Subapriya e Nagini (2005), o nim é usado no tratamento de diabetes, reumatismo, úlcera gástrica, pediculose e câncer. Atua também como vermífugo, antiinflamatório, antitérmico, antifúngico, inseticida, sarnicida, antibactericida, antioxidante e possui potente atividade imunoestimulatória em respostas celulares mediata e humoral. Entretanto, a maioria dos estudos sobre esta espécie estão voltados para as atividades inseticida e antioxidante.

Alguns estudos tentando estabelecer a relação estrutura-atividade permitiram concluir que limonóides com o anel C-seco são os mais ativos ou para a atividade inseticida (CHAMPAGNE et al., 1992; VIEGAS JÚNIOR, 2003). A azadiractina possui o anel C-seco e sua ocorrência foi constatada apenas em três espécies da família Meliaceae, *Azadirachta indica*, *Melia toosendan* e *Melia azedarach* (BOHNENSTENGEL et al., 1999; CHAMPAGNE et al., 1992; NAKATAMI et al., 1998, 1999; NDUMU; GEORGE; CHOUDHURY, 1999; VIEGAS JÚNIOR, 2003).

A azadiractina desempenha um importante papel na defesa contra insetos, interferindo no crescimento desses e atuando como fagorrepelente. Essa substância repele ou reduz a ingestão de alimentos para várias espécies de insetos prejudiciais às lavouras, bem como de alguns nematóides. Ela causa malformações e impede o processo da ecdise dos insetos (PURI, 1999).

Os extratos de nim podem causar fitotoxicidade em concentrações altas, como por exemplo, óleo emulsionável acima de 1% (SRIVASATAVA; PARMAR, 1985). Esta reação depende da espécie de planta sobre a qual os extratos são

aplicados, sua idade e fase de desenvolvimento. A fitotoxicidade, causada pelo nim, manifesta-se nas plantas tratadas, por meio de folhas enrijecidas, quebradiças, de cor verde-pálido, geralmente menores, com pontos necróticos. Porém, as doses usuais na agricultura não contaminaram o solo, nem provocaram sintomas visíveis às plantas (MARTINEZ, 2002).

Várias partes da planta do nim revelaram presença de fenólicos, como ácido gálico, ferúlico, tânico e clorogênico. A maior quantidade de fenólicos foi encontrada nas sementes, seguida pelo epicarpo e polpa (SINGH; MAURYA; SINGH, 2005). A atividade antioxidante de compostos fenólicos é principalmente devido às suas propriedades de óxido-redução, as quais podem desempenhar um importante papel na absorção e neutralização de radicais livres (DEGÁSPARI, WASZCZYNSKYJ, 2004).

Antioxidantes são largamente usados como inibidores da lipoxigenase (LOX). Estudos em sementes tratadas com extrato de semente de nim demonstraram que este extrato inibe tanto a LOX, como a peroxidação lipídica durante a germinação das sementes. Isso sugere que o extrato de nim desempenhe papel de antioxidante no sistema vegetal (RAO; DEVI; THYAGARAJU, 1998; GANGAR et al, 2006a).

A atividade biológica dos extratos de nim foi observada também em diferentes sistemas animais como aves, ratos e humanos. A bactéria *Propionibacterium acnes*, ao causar a acne, induz mediadores inflamatórios no local de invasão. Esses mediadores incluem citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio (EROs). Jain e Basal (2003) constataram que extrato de *Azadirachta indica* suprime significativamente a produção de EROs e das citocinas induzidas por monócitos, demonstrando tanto papel antioxidante como antiinflamatório.

Muitos estudos relatam sua atividade anticancerígena por diminuir a peroxidação lipídica e aumentar os níveis das enzimas antioxidantes intracelulares em vários órgãos (BALASENTHIL et al., 1999; SITHISARN; SUPABPHOL; GRITSANAPAN, 2005; SRITANAUDOMCHAI et al., 2005).

As folhas de nim contêm várias substâncias incluindo ácido ascórbico e flavonóides que são reconhecidas como antioxidantes e inibidores da carcinogênese. Os efeitos dos extratos de folhas de nim foram avaliados durante a administração de uma nitrosamina carcinogênica *N*-metil-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidina (MNNG) em ratos. Com esta aplicação, houve diminuição significativa de glutathiona reduzida (GSH) e da atividade da glutathiona-peroxidase (GSH-Px), glutathiona-*S*-transferase (GST) e gama glutamil-transpeptidase (GGT) no estômago, fígado e circulação dos ratos. A administração do extrato diminuiu a peroxidação lipídica no fígado e aumentou os níveis de enzimas antioxidantes e detoxificadoras, sugerindo que o nim possui compostos com potencial quimiopreventivo contra o câncer gástrico, que retardaram o desenvolvimento do tumor (ARIVAZHAGAN; BALASENTHIL; NAGINI, 2000).

Baral e Chattopadhyay (2004) relataram a diminuição significativa do crescimento do carcinoma Ehrlich e de células de melanoma B16, depois da administração do extrato das folhas de nim. Yadav e Rathore (1976) afirmam que a atividade mitótica de células cancerígenas pode ser inibida por extratos de folhas de nim. Akudugu, Gade e Boohm (2001) relataram atividade citotóxica de azadiractina A em células humanas com glioblastoma (GANGAR et al., 2006b).

Extratos do caule de *Azadirachta indica* preveniu o dano oxidativo da mucosa gástrica por bloquear significativamente a peroxidação lipídica e por captar o radical hidroxil (HO[•]) endógeno, o principal fator causador da úlcera, sendo seus efeitos

comparados a fármacos como omeprazol e ranitidina. Resultados indicam que o principal componente antiulceroso do extrato aquoso do caule de nim é uma substância fenólica glicosilada (BANDYOPADHAYAY et al., 2002).

O óleo de nim demonstrou atividade espermicida em humanos, sugerindo que esse possa ser utilizado como método contraceptivo em mulheres em forma de pomada vaginal (BISWAS et al., 2002; KAUSHIC; UPADHYAY, 1995; SINHA et al., 1984; UPADHAYAY; KAUSHIC; TALWAR, 1990; UPADHYAY et al., 1994).

2 - Espécies reativas de oxigênio (EROs)

O oxigênio pode dar origem a diversas espécies reativas (EROs), que incluem radicais livres e espécies não radicalares. Quando o oxigênio no estado fundamental absorve energia, forma uma espécie eletronicamente excitada chamada oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). Na redução do oxigênio à água, ocorre a formação do radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\text{HO}^\cdot$). Essas EROs podem interagir com diversas estruturas celulares, lesando-as (ABDALLA, 1993; HASANOGLU et al., 1994; RICHARD et al., 1991).

Os compostos antioxidantes protegem os sistemas biológicos contra os efeitos potencialmente danosos provocados pelas espécies reativas de oxigênio. Eles podem ser divididos em dois tipos: o primeiro atua retardando a geração ou seqüestrando espécies reativas; o segundo atua bloqueando a cadeia radicalar, o que promove a remoção de radicais intermediários (SCHENEIDER; DE OLIVEIRA, 2004).

A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) ocorre normalmente no metabolismo das células vegetais. No entanto, podem ser potencializados frente a estresses de diferentes origens. Algumas enzimas, como a peroxidase, catalase e

superóxido dismutase, atuam sobre as EROs, protegendo a célula. A atividade dessas enzimas é aumentada não só quando as plantas são infectadas por patógenos, mas também quando são expostas a outros tipos de estresses, como os provocados pelos fatores abióticos (LABANCA, 2002; SBALCHEIRO, 2006).

- Oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$)

É a forma excitada de oxigênio molecular e não possui elétrons desemparelhados em sua última camada. O $^1\text{O}_2$ tem importância em certos eventos biológicos, mas poucas doenças foram relacionadas à sua presença. Em plantas, o $^1\text{O}_2$ é predominantemente gerado nos cloroplastos, por meio da transferência de energia de uma clorofila foto-excitada para o elétron do oxigênio molecular (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003).

- Radical hidroperoxila ($\text{HO}_2^\cdot$)

Representa a forma protonada do radical superóxido. Estudos indicam que o radical hidroperoxila seja mais reativo que o superóxido, por sua maior facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas, porém é menos reativo que o radical hidroxila (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).

- Radical hidroxila ($\text{HO}^\cdot$)

O radical hidroxila é considerado a espécie mais reativa de oxigênio em sistemas biológicos. Pode ser formado quando o H_2O_2 reage com íons ferro ou cobre (Reação de Fenton) ou quando íons de metais de transição catalisam a reação entre H_2O_2 e íon superóxido (Reação de Haber-Weiss) (SCHENEIDER; DE OLIVEIRA, 2004).

Estudos recentes indicam que o radical $\text{HO}^\cdot$ pode ser prejudicial para o crescimento das células, pois cliva os polissacarídeos de parede celular pela remoção de um átomo de hidrogênio dos polissacarídeos (COSGROVE, 2005).

Reação de Fenton:

Reação de Haber-Weiss:

- Superóxido ($\text{O}_2^\cdot$)

O íon superóxido pode ser produzido na planta por meio da ativação de NADPH-oxidases/sintases ligadas à membrana, peroxidases (POX) da parede celular, lipoxigenases (LOX) e como resultado da transferência de elétrons da mitocôndria ou do cloroplasto. Geralmente, o íon superóxido oxida várias moléculas

orgânicas e atua como redutor de metais nas reações de Fenton (BREUSEGEM et al., 2001).

- Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, o H_2O_2 é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa da reação que produz o $HO^\cdot$ (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

O peróxido de hidrogênio é formado pela redução de O_2 e faz parte de várias respostas de defesa, como também na sinalização de hormônios em plantas (COSGROVE, 2005; FRY, 1998).

O H_2O_2 é capaz de atravessar camadas lipídicas. Pelo fato de conseguir atravessar facilmente a membrana celular, ocorre a rápida elicitación da resposta vegetal na presença deste composto (APOSTOL; HEINSTEIN; LOW, 1989). O acúmulo de H_2O_2 pode depender da redução do O_2 molecular a $O_2^\cdot$, seguida pela dismutação espontânea ou catalisada de $O_2^\cdot$ a H_2O_2 . A enzima SOD (superóxido dismutase) pode catalisar uma conversão altamente eficiente de $O_2^\cdot/HO_2^\cdot$ a H_2O_2 (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003).

3 - Resposta de Hipersensibilidade (RH)

Os vegetais sofrem várias agressões por agentes bióticos e abióticos. Agentes bióticos são os vírus, insetos, fungos, bactérias e nematóides. Os abióticos são a radiação ultravioleta, temperatura e umidade. Entretanto, as plantas são também agredidas por fatores não-naturais como a chuva ácida, efeito estufa, mau uso de agrotóxicos e poluição do ar. Por isso, é interessante conhecer os

mecanismos de proteção das plantas para que, por meio da bioengenharia, seja capaz de se obter variedades agrícolas mais resistentes, aumentando até mesmo a produção e qualidade dos alimentos (PINHEIRO et al., 1999).

As plantas possuem mecanismos de defesa. Um deles é a resistência constitutiva que ocorre mesmo sem a ação de agentes agressores: recebida por herança dos ancestrais. Este tipo de resistência torna as plantas imunes (ou não-hospedeiras) à maioria dos patógenos. Os outros tipos de resistência são a resistência localizada, que é ativada no ponto onde ocorre a agressão, e a resistência sistêmica adquirida, que protege a planta contra ataques subsequêntes (BALARDIN, 2006; RIZZARDI, 2003).

A RH é um dos principais mecanismos de resistência encontrados nas plantas. Ela atua em resposta a um estímulo externo biótico ou abiótico sobre a planta, é um mecanismo de resistência adquirida. A RH pode, muitas vezes, ser visualizada macroscopicamente na forma de lesões necróticas restritas ao sítio de infecção. São estas lesões que impossibilitam a propagação do patógeno para outros tecidos da planta, interrompendo assim, a manifestação da doença (HAMMOND-KOSACK; JONES, 1996; LAU et al., 2006).

A característica principal que diferencia a RH de outro tipo de mecanismo de resistência adquirida nas plantas, a RSA (Resposta Sistêmica Adquirida), é que ela se manifesta no local da planta onde ocorreu o primeiro contato do agente externo biótico ou abiótico. Ela é uma resposta de defesa rápida, cujos eventos celulares iniciam-se imediatamente após o primeiro contato do patógeno com a planta (DE SOUZA, 2007; STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997).

Na planta, ao se defender dos agentes agressores, ocorre aumento intracelular da concentração de espécies reativas de oxigênio, lignificação e o

fortalecimento de paredes celulares, aumento de substâncias antimicrobianas, expressão de proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas), bem como aumento das moléculas sinalizadoras, como o ácido salicílico, responsável pela ativação de respostas de defesa em células adjacentes (RH) e tecidos mais distantes do sítio primário de infecção da planta (RSA) (DURRANT; DONG, 2004; HUTCHESON, 1998).

As interações planta-patógeno são classificadas em compatíveis (patógeno virulento e hospedeiro susceptível) e incompatíveis (patógeno avirulento e hospedeiro resistente). Nas interações compatíveis, ocorre a progressão da infecção na planta. Em interações incompatíveis, o sistema de defesa da planta é ativado, conduzindo à resistência. A planta possui genes que codificam receptores protéicos que reconhecem e se ligam a moléculas específicas derivadas dos patógenos. A presença de um gene de resistência, dominante na planta (R), que funciona como um receptor e um gene de avirulência dominante no patógeno (Avr) condiciona a incompatibilidade em interações gene-a-gene. A interação desses dois genes provoca diversas respostas fisiológicas nas plantas (FLOR, 1955; NIMCHUK et al., 2003).

Geralmente, o reconhecimento do patógeno pela planta rapidamente estimula grande influxo de íons Ca^{2+} e H^+ e efluxo de K^+ e Cl^- . O fluxo de íons é mediado por proteínas G. O aumento do cálcio intracelular leva à ativação de enzimas como a peroxidase de parede celular e a NADPH oxidase de membrana, que por sua vez geram EROs. Além destes íons, o ácido salicílico (AS) e o metil jasmonato (MeJA) atuam na produção de EROs e sobre a expressão de gene de resistência (ALLAN; FLUHR, 1997; ANDI et al., 2001; LAMB; DIXON, 1997).

Este fluxo de íons induz a ativação de proteínas-quinase mitógeno-ativadas (MAPKs) e a geração de EROs. As MAPKs ativadas são translocadas para o núcleo e várias proteínas são rapidamente fosforiladas e desfosforiladas. Sabe-se que há o acúmulo de ácido salicílico e a subsequente formação de espécies reativas de oxigênio, principalmente peróxido de hidrogênio (H_2O_2), já que o AS inibe a catalase (ALLAN; FLUHR, 1997; LAMB; DIXON, 1997).

As peroxidases (POX) são capazes de catalisar diversas reações, como a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 age como sinalizador para outras respostas de defesa, participa de reações catalisadas por peroxidases, resultando na polimerização de fenóis e na formação de lignina, formação de ligações cruzadas de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina e a sua incorporação à parede celular (LABANCA, 2002; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1998; SBALCHEIRO, 2006; ZHAO et al., 2005).

O peróxido de hidrogênio também induz a atividade da enzima ácido-benzóico 2-hidroxilase (BA2H) que é necessária para a biossíntese de ácido salicílico (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000). O peróxido de hidrogênio auxilia na ativação da via dos fenilpropanóides e no fluxo de íons. Ele também ativa genes que codificam enzimas que participam na defesa da planta contra os próprios radicais gerados como a catalase e a glutathione-S-transferase (CLEMENTS; SAFFREY, 2001; GERSHENZON, 2002).

A peroxidase participa nas ligações de polissacarídeos, na oxidação do ácido indol-3-acético (IAA) e de fenóis, cicatrização de ferimentos, defesa de patógenos e regulação da elongação de células (CAMPOS et al., 2004; KAO, 2003; SBALCHEIRO, 2006).

As catalases (CATs) são enzimas que convertem o H_2O_2 em H_2O e O_2 . As plantas possuem várias isoformas de catalase. A primeira (classe 1) remove o H_2O_2 produzido durante a fotorespiração em tecidos fotossintéticos. A segunda (classe 2) é produzida em tecidos vasculares e a terceira (classe 3) são as catalases presentes em sementes e plantas jovens, cuja atividade está relacionada à remoção do H_2O_2 produzido durante a degradação dos ácidos graxos (BREUSEGEM et al., 2001; DE SOUZA, 2007).

3.1 - Ácido salicílico

Os compostos fenólicos são sintetizados a partir de duas rotas principais: a via do acetato, que inicia com o acetil coenzima A e malonil coenzima A, e principalmente, a via do chiquimato a partir de carboidratos (SIMÕES, 2003).

O ácido chiquímico é formado pela condensação de dois metabólitos derivados da glucose, o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato (Figura 3). O ácido chiquímico liga-se a uma molécula de fosfoenolpiruvato, originando o ácido corísmico. O ácido corísmico gera os aminoácidos aromáticos, que são precursores de vários alcalóides, como por exemplo, a fenilalanina. A partir deste aminoácido, ocorre a formação dos fenilpropanóides que originam os grupos fenólicos (PERES, 2006).

De acordo com Sbalcheiro (2006), a via biossintética responsável pela síntese fenilpropanóidica também responde pela síntese de flavonóides, fitoalexinas, ligninas e derivados do ácido benzóico. Esses compostos atuam em diversas funções das plantas, como antioxidantes, agentes antimicrobianos, pigmentos coloridos suberinas e ligninas como constituintes estruturais (SARMA; SREELAKSHMI; SHARMA, 1998). Eles possuem um ou mais anéis aromáticos com

pelo menos um grupo hidroxílico. Em geral, podem reagir com radicais livres, devido à facilidade com que o átomo de hidrogênio do grupo hidroxila pode ser abstraído por um radical livre (PANNALA et al., 2001).

Alvarez (2000) afirma que, quando a planta sofre estímulos, como na invasão de patógenos, ocorre a ativação da transcrição do mRNA que codifica a enzima fenilalanina amônia-liase (FAL), aumentando a produção desta na planta (DIXON; PAIVA, 1995). Entre as substâncias formadas após a ação da FAL, está o ácido benzóico, o qual dá origem ao ácido salicílico, um importante composto na defesa das plantas contra patógenos. A enzima ácido benzóico 2-hidroxilase converte o ácido benzóico em ácido salicílico (LEE; LÉON; RASKIN, 1995).

O ácido salicílico pode também ser biossintetizado a partir do corismato, pela via do isocorismato (Figura 4) (LEE, LÉON, RASKIN, 1995; SCHINEIDER et al., 1996). Embora a via dos fenilpropanóides seja responsável pela rápida produção de AS associada com a morte celular local, característica da RH, a via do isocorismato é considerada a mais importante na produção de AS durante a RSA (DE SOUZA, 2007; WILDERMUTH et al., 2001).

Figura 3. Via do ácido chiquímico. Biossíntese de compostos fenólicos (adaptado de PERES, 2006).

Figura 4. Via metabólica do corismato (adaptado de DE SOUZA, 2005).

Ainda não se sabe quais são os mecanismos exatos pelo qual o AS ativa a defesa das plantas. Aplicações exógenas do ácido salicílico (AS) promovem o aumento da síntese de fenilpropanóides em diversas espécies vegetais, por meio de uma via intermediária para a síntese dos flavonóides. Isto aumenta as chances do vegetal se defender do ataque de patógenos (TAIZ; ZEIGER, 2002).

3.2 - *Rubus fruticosus* (amora preta)

As células em suspensão ou os protoplastos de *Rubus fruticosus* têm sido bastante utilizados como modelo biológico, tanto em investigações sobre o sistema de defesa de plantas como em experimentos para o estudo do crescimento e desenvolvimento celular das mesmas (NITA-LAZAR; CHEVOLOT; LIÉNART, 1998; PATIER et al., 1995; VARGAS-RECHIA et al., 1998).

Estudos no laboratório de Bioquímica Vegetal (FCFRP – USP) demonstraram a eficiência de um polissacarídeo ácido extraído de sementes de paineira (*Chorisia speciosa*), denominado F-I e do ácido salicílico como elicitores de algumas respostas cruciais para o desenvolvimento de RH, incluindo o acúmulo de AS intracelular, produção de compostos fenólicos e ativação de proteínas relacionadas à patogênese, em cultura de *Rubus fruticosus* (DE SOUZA, 2005).

A avaliação do efeito das respostas de RH sobre a parede celular demonstraram que F-I e AS ativam EROs com simultânea liberação de fragmentos de carboidratos de baixa massa molecular da parede celular, resultando em uma degradação desta, enquanto outro elicitor (MeJA) promove uma maior liberação de fragmentos com uma massa molecular maior que podem ter a função de sinalizadores para o espessamento de parede, liberação de enzimas e de outras moléculas de defesa (DE SOUZA, 2007).

As plantas reagem à penetração do fungo *Fusarium* sp. acumulando calose e outros componentes da parede celular. Sendo assim, Nita-Lazar e colaboradores (1998) investigaram O-glicanas, extraídas de glicoproteínas de *Fusarium* sp., que podem agir como moléculas sinalizadoras. Verificaram que incubando uma fração de O-glicana, com protoplastos de *Rubus fruticosus*, houve uma indução da atividade do complexo fenil amônio-liase (FAL).

Patier e colaboradores (1995) mostraram que β -1,3-glucanas, que são os componentes principais de herbicidas líquidos, são capazes de elicitar D-glucanases (β -1,3-glucanase e α -amilase) em células de *Rubus fruticosus*. Uma κ -carragenana elicitou a atividade da enzima β -1,3-glucanase no mesmo sistema de células em suspensão.

Desta forma, no presente trabalho, utilizamos esse conhecimento prévio, tanto do efeito de alguns elicitores como do modelo biológico, para estabelecer o efeito do extrato de nim sobre respostas de hipersensibilidade em *Rubus fruticosus*.

Os estudos sobre a ação inseticida de *Azadirachta indica* restringem-se à análise de seu mecanismo de ação sobre insetos e também de seus efeitos sobre trabalhadores rurais que fazem uso de produtos a base de nim não havendo, na literatura pesquisada, trabalhos de seus impactos sobre o sistema vegetal.

Este trabalho vislumbrou, portanto, relacionar os efeitos do extrato, obtido a partir de sementes de nim, sobre algumas respostas de hipersensibilidade, caracterizar os compostos presentes nas frações do extrato e ainda avaliar a atividade antioxidante destes.

4 - OBJETIVOS

4.1 - Objetivo geral

Este projeto teve como objetivo geral caracterizar o extrato das sementes do nim, *Azadirachta indica*, e estudar o efeito deste extrato sobre respostas de hipersensibilidade, em cultura de células de *Rubus fruticosus*, verificando se seu efeito como bioinseticida se restringia à ação sobre os insetos ou se gerava respostas de defesa na própria planta.

4.2 - Objetivos específicos

- a) Caracterizar o extrato bruto (EB) e liofilizado (L) obtido a partir de sementes moídas de nim;
- b) Quantificar a azadiractina (AZA) nos extratos de nim;
- c) Avaliar a atividade antioxidante de L;
- d) Fracionar o extrato L2, obtendo-se L2 inicial e AZA2;
- e) Caracterizar a fração L2 inicial;
- f) Estabelecer as condições experimentais para os estudos de elicitação com L2, L2 inicial e AZA2 em células de *Rubus fruticosus*;
- g) Caracterizar o meio intracelular e extracelular após elicitação células de *Rubus fruticosus* com L2, L2 inicial e AZA2, determinando o efeito dos elicitores sobre a produção de proteínas, fenólicos e açúcares redutores;
- h) Determinar o efeito da elicitação com L2, L2 inicial e AZA2 sobre a produção de EROs;
- i) Determinar as curvas de dose dependência e de tempo para a produção de EROs por estes elicitores em células de *Rubus fruticosus*.

CONCLUSÃO

- A caracterização dos extratos de sementes de nim demonstrou que os açúcares e lipídeos são os componentes majoritários nos extratos e confirmou a presença da azadiractina A, pelas análises de CLAE, ESI-MS e ESI-MS-MSI;

- Os resultados de quimioluminescência sugeriram uma atividade antioxidante do extrato L2, medida pela reação HRP-H₂O₂-luminol, demonstrando ser dose-dependente, com valor de inibição de 63,5 a 96,4% em relação ao controle;

- Os resultados demonstraram que a molécula de AZA2 tem atividade inibitória na liberação de compostos fenólicos intra e extracelulares, açúcares e proteínas extracelulares, significando que apenas a molécula de AZA isolada não induz respostas de defesa nas células de *Rubus fruticosus*;

- A elicitação das células com a fração L2 inicial causou aumento da liberação de fenólicos intracelulares com o aumento da sua concentração, porém os valores obtidos são inferiores ao do controle. Por outro lado, há diminuição de EROs no meio intracelular e aumento de açúcares redutor no meio extracelular, sugerindo que esta fração, nessas concentrações avaliadas, atue como antioxidante e cause liberação de fragmentos de parede celular como mecanismo de defesa celular;

- O extrato L2 provocou aumento da liberação de fenólicos intracelulares e constância do teor de açúcares redutor extracelulares, seguida de inibição na liberação de EROs em concentrações acima de 0,1 mg/mL. Isso indica que o extrato bruto, que possui tanto AZA2 como a fração L2 inicial, atue sinergicamente como agente antioxidante e protetor das células com o aumento da concentração do elicitor, além de possuir ação inseticida, como já foi descrito na literatura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASI, P. A.; CUPPELS, D. A.; LAZAROVITS, G. Effect of foliar applications of neem oil and fish emulsion on bacterial spot and yield of tomatoes and peppers. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 25, n. 1, p. 41-48, 2003.
- ABDALLA, D. S. P. **Antioxidantes: conceitos básicos e perspectivas terapêuticas**. São Paulo: ARS CVRANDI, v. 26, p.141-164, 1993.
- AKUDUGU, J.; GADE, G.; BOOHM, L. Cytotoxicity of azadirachtin A in human glioblastoma cell lines. **Life Sciences**, Oxford, v. 68, n. 10, p. 1153-1160, 2001.
- ALLAN, A. C.; FLUHR, R. Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cell. **The Plant Cell**, Rockville, v. 9, n. 9, p. 1559-1572, 1997.
- ALVAREZ, M. E. Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 44, n. 3, p. 429- 442, 2000.
- ALVES, V. **Avaliação do potencial bioindicador de *Psidium guajava* “Paluma” e *Psidium cattleianum* à poluição atmosférica na cidade de São Paulo**. 2006. 104 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Botânica). Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- AMBROZINO, P.; FRESA, R.; FOGLIANO, V.; MONTI, S. M.; RITIENI, A. Extraction of azadirachtin A from neem seed kernels by supercritical fluid and its evaluation by HPLC and LC/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chur, v. 47, n. 12, p. 5252-5256, 1999.
- ANDI, S.; TAGUCHI, F.; TOYODA, K.; SHIRAISHI, T.; ICHINOSE, Y. Effect of methyl jasmonate on harpin-induced hypersensitive cell death, generation of hydrogen

peroxide and expression of PAL mRNA in tobacco suspension cultured BY-2 cells.

Plant Cell Physiology, Tokyo, v. 42, n. 4, p. 446-449, 2001.

ANNIS, S. L. GOODWIN, P. H. Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 103, n. 1, p. 1-14, 1997.

ARIVAZHAGAN, S.; BALASENTHIL, S.; NAGINI, S. Modulatory effects of garlic and neem leaf extracts on *N*-methyl- *N*'-nitro- *N*-nitrosoguanidine (MNNG)-induced oxidative stress in wistar rats. **Cell Biochemistry and Function**, Guildford, v. 18, n. 1, p. 17-21, 2000.

BAILEY, A. E.; SHAHIDI, F. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. 5 ed. New York: John Wiley, 1996, 600 p.

BALARDIN, R. S. **Fundamentos da resistência de plantas**. Google Brasil. Word for Windows. Disponível em: <http://www.balardin.com/adm/arquivos/5_fundderesistencia.pdf>. Acesso em: 22 jul. 2006.

BALASENTHIL, S.; ARIVAZHAGAN, S.; RAMACHANDRAN, C. R.; RAMACHANDRAN, V.; NAGINI, S. Chemopreventive potential of neem (*Azadirachta indica*) on 7.12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) induced hamster buccal pouch carcinogenesis. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 67, n. 2, p. 189-195, 1999.

BANDYOPADHYAY, U.; BISWAS, K.; CHATTERJEE, R.; BANDYOPADHYAY, D.; CHATTOPADHYAY, I.; GANGULY, C. K.; CHAKRABORT, T.; BHATTACHARYA, K.; BANERJEE, R. K. Gastroprotective effect of neem (*Azadirachta indica*) bark extract: possible involvement of H⁺/K⁺-ATPase inhibition and scavenging of hydroxyl radical. **Life Sciences**, Oxford, v. 71, n. 24, p. 2845-2865, 2002.

BARAL, R.; CHATTOPADHAY, U. Neem (*Azadirachta indica*) leaf mediated immune activation causes prophylatic growth inhibition of murine Erlich carcinoma and B16 melanoma. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 4, n. 3, p. 355-366, 2004.

BARREK, S.; PAISSE, O.; LOUSTALOT, M. F. G. Analysis of neem oils by LC-MS and degradation kinetics of azadirachtin-A in a controlled environment characterization of degradation products by HPLC-MS-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 378, n. 3, p. 753-763, 2004.

BERFELD, P.; KAPLAN, N. D. **Methods in Enzymology**, New York, v. 1, n. 1, p. 149, 1955.

BI, H. H.; ZENG, R. S.; SU, L. M.; AN, M.; LUO, S. M. Rice allelopathy induced by methyl jasmonate and methyl salicylate. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 33, n. 5, p. 1089-1103, 2007.

BILTON, J. N.; BROUGHTON, H. B.; JONES, P. S.; LEY, S. V.; LIDERT, Z.; MORGAN, E. D.; RZEPA, H. S.; SHEPPARD, R. N.; SLAWIN, A. M. Z.; WILLIAMS, D. J. An x-cristallographic mass spectroscopic and NMR study of the limonoid insect antifeedant azadirachtin and relateds. **Tetrahedron**, Oxford, v. 43, n. 12; p. 2805-2815, 1987.

BISWAS, K.; CHATTOPADHYAY, I.; BANERJEE, R. K.; BANDYOPADHYAY, U. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). **Current Science**, Bangalore, v. 82, n. 11, p. 1336-1345, 2002.

BOEKE, S. J.; BOERSMA, M. G.; ALINK, G. M.; VAN LOON, J. J. A.; VAN HUIS, A.; DICKE, M.; RIETJENS, I. M. C. M. Safety evaluation of neem (*Azadirachta indica*) derived pesticides. **Journal of Ethnopharmacolgy**, Lausanne, v. 94, n. 1, p. 25-41, 2004.

BOHNENSTENGEL, F. I.; WRAY, V.; WITTE, L.; SRIVASTAVA, R. P.; PROKSCH, P.; Insecticidal meliacarpins (C-seco limonoids) from *Melia azedarach*, **Phytochemistry**, New York, v. 50, n. 6, p. 977-982, 1999.

BOLWELL, G. P.; ROBBINS, P.; DIXON, R. A. Metabolic changes in elicitor-treated bean cells: enzymic responses associated with rapid changes in cell wall components. **FEBS Journal (Federation of European Biochemical Societies)**, Oxford, v. 148, n. 3, p. 571-578, 1985.

BONALDO, S. M., SCHWAN-ESTRADA, K. R. F., STANGARLIN, J. R., TESSMANN, D. J.; SCAPIM, C. A. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 128-134, 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1, p. 248-256, 1976.

BRAHMACHARI, G. Neem - An omnipotent plant: A retrospection. **ChemBioChem**, Weinheim, v. 5, n. 1, p. 408-421, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. **Usos e aplicações do nim (*Azadirachta indica*)**. Google Brasil.

Word for Windows. Disponível em: <http://www.cnpmf.embrapa.br/publicacoes/cartilha/cartilha_nim_2006.pdf>. Acesso em 30 mai. 2006.

BRASIL. Ministério da Educação. Universidade Federal de Lavras. **Cultivo e usos do nim (*Azadirachta indica* A Juss)**. Lavras: UFLA, 2006, 14 p.

BRESSEUGEM, F. V.; VIRANOVÁ, E.; DAT, J. F.; INZÉ, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, Oxford, v. 161, n. 3, p. 405-414, 2001.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. 1 ed. Rockville, Maryland: ASP Press, 2000. 1367 p.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. 1 ed. Rockville, Maryland: ASP Press, 2000. 1367 p.

BUTTERWORTH, J. H.; MORGAN, E. D. Investigation of the locust feeding inhibition of the seeds of the neem tree, *Azadirachta indica*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 17, n. 6, p. 969-977, 1971.

CAMPOS, A. D.; FERREIRA, A. G.; HAMPE, M. M. V.; ANTUNES, I. F.; BRANCÃO, N.; DA SILVEIRA, E. P.; OSÓRIO, V. A.; AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 7, p. 637-643, 2004.

CARBONI, P.; SARAIS, G.; ANGIONI, A.; GARCIA, A. J.; LAI, F.; DEDOLA, F.; CABRAS, P. Residues and persistence of neem formulations on strawberry after field treatment. **Journal of Agriculture Food Chemistry**. Chur, v. 54, n. 26, p. 10026-10032, 2006.

CARNEIRO, S. M. T. P. G. Efeito de extratos de folhas e do óleo de nim sobre o oídio do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 29, n. 1, p. 262-265, 2003.

CARNEIRO, S. M. T. P. G.; PIGNONI, E.; VASCONCELLOS, M. E. C.; GOMES, J. C. Eficácia de extratos de nim para o controle do oídio do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 1, p. 34-39, 2007.

CHAMPAGNE, D. E.; KOUL, O.; ISMAN, M. B.; SCUDDER, G. G. E.; TOWERS, H. N. Biological activity of limonoids from the rutales, **Phytochemistry**, New York, v. 31, n. 2, p. 377-394, 1992.

CLEMENTS, M.; SAFFREY, J. Cell communication. In: SAFFREY, J. **The Core of Life**, Milton Keynes: The Open University, 2001, v. II, 2001.

COSGROVE, D. J. Growth of the plant cell wall. **Nature Reviews, Molecular and Cell Biology**, Washington, v. 6, n. 1, p. 850-861, 2005.

D' OVIDIO, R.; MATTEI, B.; ROBERTI, S.; BELLINCAMPI, D. Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant-pathogen interactions. **Biochimica and Biophysica Acta: Proteins and Proteomics**, Amsterdam, v. 1696, n. 2, p. 237-244, 2004.

DE LORENZO, G.; CASTORIA, R.; BELLINCAMPI, D.; CERVONE, F. Fungal invasion enzymes and their inhibition. In: CARROLL, G. C.; TUDZYNSKI, P. **The Mycota: V. Plant Relationships**: Springer, Berlin, 1997, p. 61–83.

DE SOUZA, F. M. **Estudo do efeito de respostas de hipersensibilidade sobre a parede celular em cultura de células de amora-preta (*Rubus fruticosus*)**. 2007.145 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Fármacos e Medicamentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

DE SOUZA, W. R. **Estudo do efeito elicitor do ácido salicílico e do polissacarídeo extraído de sementes de paineira (*Chorisia speciosa*) em cultura de células de amora-preta (*Rubus fruticosus*)**. 2005. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Fármacos e Medicamentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DIAS, A. P. S.; RINALDI, M. C. S.; MORAES, R. M. Alterações bioquímicas associadas a injúrias foliares visíveis em plantas jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' mantidas em ambiente contaminado por ozônio. **Hoehnea**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 231-238, 2007.

DIXON, R.; PAIVA, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **The Plant Cell**, Rockville, v. 7, n. 7, p. 1085-1097, 1995.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

DURRANT, W. E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, n. 1, p. 185-209, 2004.

ERMEL, K. Azadirachtin content of neem seed kernels from different regions of the world. In: SCHMUTTERER, H. **The neem tree, source of unique natural products for integrated pest management, medicine, industry and other purposes**. Weinheim: VCH, 1995, p. 89-92.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FLOR, H. H. Host-parasite interaction in flax rust. Its genetics and other implications. **Phytopathology**, St. Paul, v. 45, n. 2, p. 680-685, 1955.

FORIM, M. R. **Estudo fitoquímico do enxerto de *Azadirachta indica* sobre *Melia azedarach*: quantificação de substâncias inseticidas**. 257 f. Tese (Doutorado em

Química). Faculdade de Química – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

FOYTER, C. H.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, n. 7, p. 1866-1875, 2005.

FRY, S. C. Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. **The Biochemistry Journal**, London, v. 332 , n. 2, p. 507–515, 1998.

FURLAN, C. M. **Efeitos de poluentes atmosféricos na composição química de indivíduos jovens de *Tibouchina pulchra* (Cham.) Cogn. e *Psidium guajava* L.** 117 f. 2004, Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Ecologia). Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

GANGAR, S. C.; SANDHIR, R.; RAI, D. V.; KOUL, A. Modulatory effects of *Azadirachta indica* on benzo(a)pyrene-induced forestomach tumorigenesis in mice. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 12, n. 17, p. 2749-2755, 2006b.

GANGAR, S. C.; SANDHIR, R.; RAI, D. V.; KOUL, A. Preventive effects of *Azadirachta indica* on benzo(a)pyrene-DNA adduct formation in murine forestomach and hepatic tissues. **Phytoteraphy Research**, London, v. 20, n. 10, p. 889-895, 2006a.

GERSHENZON, J. Secondary Metabolites and Plant Defense. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 3 ed. Sunderland: Sinauer Associates Inc., 2002. Chapter 13, p. 283-308.

GOULD, K. S. Nature's swiss army knife: the diverse protective roles of anthocyanins in leaves. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Akron, v. 5, n. 1, p. 314-320, 2004.

GOVINDACHARI, T. R.; GOPALAKRISHNAN, G.; RAJAN, S. S.; KABALEESWARAN, V.; LESSINGER, L. Molecular and crystal structure of azadirachtin-H. **Acta Crystallographica Section B: Structural Science**, Copenhagen, v. 52, n. 1, p. 145-150, 1996.

GOVINDACHARI, T. R.; SANDHYA, G.; GANESHRAJ, S. P. Simple method for the isolation of azadirachtin by preparative high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 513, n. 1, p. 389-391, 1990.

GOVINDACHARI, T. R.; SANDHYA, G.; RAJ, S. P. G. Azadirachtins H and I: Two new tetranortriterpenoids from *Azadirachta indica*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 55, n. 5, p. 596-601; 1992.

GOZZO, F. Systemic acquired resistance in crop protection: from nature to a chemical approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chur, v. 51, n. 16, p. 4487-4503, 2003.

HALLIWELL B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in Enzymology**, New York, v. 186, n. 1, p. 1-85, 1990.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Resistance gene-dependent plant defense responses. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 8, p. 1173-1791, 1996.

HASANOGLU, E., ALTAN, N., SINDEL, S., ONGUN, C.O, BALI, M., ALTINTAS, E. The relationship between erythrocyte superoxide dismutase activity and plasma levels of some trace elements (Al, Cu, Zn) of dialysis patients. **General Pharmacology**, Oxford, v. 25, n. 1, p. 107-110, 1994.

HELLER, R. Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. **Annuaire des Sciences Naturelles et Biologie Végétale**, Paris, v. 14, n. 1, p. 1-233, 1953.

HIROKO, S.; LE-SUNG, S.; KENG, U.; KATSUICHIRO, K.; SHINSUKE, F. Adaptative mechanism of *Echinolocloa crus-galli* Beauv. var. *formosensis ohwi* under salt stress: effect of salicylic acid on salt sensitivity. **Plant Science**, v. 174, n. 6, p. 583-589, 2008.

HULL, C. J. J.; DUTTON, W. R.; SWITZER, B. S. Quantitation of azadirachtins in insecticidal formulations by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 633, n. 2, p. 300-304, 1993.

HUSTACHE, G.; MOLLARD, A; BARNOUD, F. Culture illimité d' une souche anergiée de *Rosa glauca* par la technique des suspensions cellulaires. **Comptes Rendus de l' Academie des Sciences**, Paris, v. 281, n. 1, p. 1381-1384, 1975.

HUTCHESON, S. W. Current concept of active defense in plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, n. 1, p. 59-90, 1998.

JAIN, A; BASAL, E. Inhibition of *Propionibacterium acnes*-induced mediators of inflammation by India herbs. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 10, n. 1, p. 34-38, 2003.

JOHNSON, S.; MORGAN, E. D. Comparison of chromatographic systems for triterpenoids fromm neem (*Azadirachta indica*) seeds. **Journal of Chromatography**, cidade, v. 761, n. 1, p. 55-63, 1997.

KANAI, R.; EDWARDS, G. E. Purification of enzymatically isolated mesophyll protoplasts from C3, C4 and Crassulacean acid metabolism plants using an aqueous dextran-polyethylene glycol two phase system. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 52, n. 5, p. 484-490, 1973.

KANOKMEDHAKUL, S.; KANOKMEDHAKUL, K.; PRAJUABSUK, T.; PANICHAJAKUL, S.; PANYAMEE, P.; PRABPAI, S.; KONGSAEREE, P. Azadirachtin derivatives from seed kernels of *Azadirachta excelsa*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 68, n. 7, p. 1047-1050, 2005.

KAO, C. H. Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol on antioxidant enzymes in rice leaves. **Plant Growth Regulation**, Boston, v. 39, n. 1, p. 83-89, 2003.

KAUSHIC, C.; UPADHYAY, S. Mode of long-term antifertility effect of intrauterine neem treatment. **Contraception**, Los Altos, v. 51, n. 3, p. 203-207, 1995.

KAUSHIK, N. Determination of azadirachtin and fatty acid methyl esters of *Azadirachta indica* seeds by HPLC and GLC. **Analytical and Bionalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 374, n. 7, p. 1199-1204, 2002.

KIDBY, D. K.; DAVIDSON, D. J. A convenient ferricyanide estimation of reducing sugars in the nanomole range. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 55, n. 1, p. 321-325, 1973.

KLENK, A; BOKEL, M.; KRAUS, W. Tigloylazadirachtol (tigloyl = 2-methylcrotonoyl), an insect growth regulating constituent of *Azadirachta indica*. **Chemical Communications**, Cambridge, v. 1, n. 7, p. 523-524. 1986.

Kraus, W., in **The Neem Tree: Source of Unique Natural Products for Integrated Pest Management, Medicine, Industry and Other Purposes** (ed. Schmutterer, H.), 1995, p 35–88.

KRAUS, W.; BOKEL, M.; KLENK, A.; POHNL, H. The structure of azadirachtin and 22,23-dihydro-23 β -methoxyazadirachtin, **Tetrahedron Letters**, Oxford, New York, v. 26, n. 52, p. 6435-6438, 1985.

KROL, W.; CZUBA, Z.; SCELLER, Z.; SHANI, J. Structure-activity relationship in the ability of flavonols to inhibit chemiluminesce. **Journal of Ethonopharmacology**, Lausanne, v. 41, n. 1, p. 121-126, 1994.

KUBO, I.; MATSUMOTO, A.; MATSUMOTO, T. New insect ecdysis inhibitory limonoideacetylazadirachtol isolated from *Azadirachta indica* (Meliaceae) oil.

Tetrahedron, Oxford, v. 42, n. 2, p. 489-496, 1986.

KUMAR, J.; PARMAR, B. S. Physicochemical and Chemical Variation in Neem Oils and Some Bioactivity Leads against *Spodoptera litura*. **Journal of Agricultural and**

Food Chemistry, Chur, v. 44, n. 8, p. 2137-2143, 1996.

KUMAR, S.; SURESH, P. K.; VIJAYABABU, M. R.; ARUNKUMAR, A;

ARUNAKARAM, J. Anticancer effects of ethanolic neem leaf extract on prostate cancer cell line (PC-3). **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 105, n. 2, p.

246-250, 2006.

LABANCA, E. R. G. **Purificação parcial de elicitores presentes em**

Saccharomyces cerevisiae: **atividade como indutores de resistência em pepino**

(*Cucumis sativus*) **contra** *Colletotrichum lagenarium* **e da síntese de gliceolinas em**

soja (*Glycine max*). 2002. 107 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia -

Fisiopatologia). Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz – Universidade de

São Paulo, Piracicaba, 2002.

LAMB, C. E; DIXON, R. A. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual**

Review of Plant Physiology and Molecular Biology, Palo Alto, v. 48, n. 2, p. 251-

275, 1997.

LANG, C.; DORNENBURG, H. Perspectives in the biological function and the

technological application of polygalacturonases, **Applied Microbiology and**

Biotechnology, Berlin, v. 53, n. 2, p. 366-375, 2000.

LAU, D.; DE OLIVEIRA, J. C. F.; LAU, E. Y.; BROMMONSCHENKEL, S. H.

Hipersensibilidade e necrose sistêmica em *Nicotiana benthamiana* transformada

com o gene de resistência Sw-5 de tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 3, p. 247-253, 2006.

LEE, H. I.; LÉON, J.; RASKIN, I. Biosyntheses and metabolism of salicylic acid. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United State of America**, Washington, v. 92, n. 10, p. 4076-4079, 1995.

LEE, S.; CHOI, H.; SUH, S.; DOO, I.; OH, K.; CHOI, E. J.; TAYLOE, A. N. S.; LOW, P. S.; LEE, Y. Oligogalacturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cells of tomato and *Commelina communis*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 121, n. 1, p. 147-152, 1999.

LIÉNART, Y.; GAUTIER C.; DRIGUEZ, H. Immobilized sugars as abiotic inducers of b D- glycanohydrolases in plant cells. **Plant Science**, Shanon, v. 68, n. 2, p. 197-202, 1990.

LUZZATTO, T.; GOLAN, A.; YISHAY, M.; BILKIS, J.; BEN-ARI, J.; YEDIDA, I. Priming of antimicrobial phenolics during induced resistance response towards *Pectobacterium carotovorum* in the ornamental monocot calla lily. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chur, v. 55, n. 25, p. 10315-10322, 2007.

MARTINEZ, S. S. **O nim: *Azadirachta indica*** – natureza, usos múltiplos, produção. Londrina: IAPAR, 2002. 142 p.

MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J. P. Salicylic acid and systemic acquired resistance to plant pathogen attack. **Annals of Botany**, Oxford, v. 82, n. 4, p. 535-540, 1998.

MILBURY, P. E.; GRAF, B.; CURRAN-CELENTANO, J. M.; BLUMBERG J. B. Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) anthocyanins modulate heme oxygenase-1 and glutathione S-transferase-pi expression in ARPE-19 cells. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, St. Louis , v. 48, n. 5, p. 2343-2349, 2007.

MOSSINI, S. A. G.; KEMMELMEIER, C. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): Múltiplos usos. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 24, n. 1, p. 139-148, 2005.

MURATA, Y.; PEI, Z-M.; MORI, I. C.; SCHOROEDER, J. I. Absciscic and activation of plasma membrane Ca^{2+} channels in guard cells requires NAD(P)H and is diferentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in the *abi1-1* and *abi2* protein phosphatase 2C mutans. **The Plant Cell**, Rockville, v. 13, n. 11, p. 2513-2523, 2001.

NAKATANI, M. M. S.; OKAMURA, J. Z. H.; IWAGAWA, T.; TADERA, K.; NAKAYAMA, N.; NAOKI, H. Limonoids from *Melia toosendan*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 52, n. 4, p. 709-714, 1999.

NAKATANI, M. M.S.; HUANG, R. C.; OKAMURA, J. Z. H.; IWAGAWA, T.; TADERA, K.; Degraded limonoids from *Melia azedarach*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 49, n. 6, p. 1773-1776, 1998.

NDUMU, P. A.; GEORGE, J. B. D.; CHOUDHURY, M. K. Toxicity of neem seed oil (*Azadirachta indica*) against the larvae of *Amblyomma variegatum* a three-host tick in cattle. **Phytotherapy Research**, London, v. 13, n. 6, p. 532-534, 1999.

NIMCHUK, Z.; EULGEM, T.; HOLT, B. F.; DANGL, J. L. Recognition and response in the plant immune system. **Annual Review of Genetics**, Atlanta, v. 37, n. 1, p. 579-609, 2003.

NITA-LAZAR, M.; CHEVOLOT, L.; LIÉNART, Y. O-glycans isolated from *Fusarium* glycoproteins induce a PAL complex activity in raspberry protoplasts. **Second International Electronic Conference on Synt.hesis Organic Chemistry**, Sept.1-30, 1998.

NOJOSA, G. B. A., RESENDE, M. L. V., AGUILAR, M. A. G., BEZERRA, K. M. T.; ANHERT, D. E. Componentes fenólicos e enzimas oxidativas em clones de *Theobroma cacao* resistentes e suscetíveis a *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p.148-154, 2003.

PANNALA, A. S.; CHAN, T. S.; BRIEN, P. J. O.; EVANS, C. A. R. Flavonoid B-Ring Chemistry and Antioxidant Activity: Fast Reaction Kinetics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, n. 5, v. 282, p. 1161-1168, 2001.

PATIER, P.; POTIN, P.; ROCHAS, C.; KLOAREG, B.; YVIN, J. C.; LIENART, Y. Free or silica bound oligokappa,-carragenans elicit laminarinase activity in *Rubus* cells and protoplasts. **Plant Science**, Shanon-Ireland, v. 10, n. 1, p. 27-35, 1995.

PAUL, P. K.; SHARMA, P. D. *Azadirachta indica* leaf extract induces resistance in barley against leaf stripe disease. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Orlando, v. 61, n. 1, p. 3-13, 2002.

PERES, P. E. P. **Metabolismo secundário**. Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz. Google Brasil. Word for Windows. Disponível em: <<http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp/FisioVegGradBio/MetSec.pdf>>. Acesso em: 22 jul. 2006.

PINHEIRO, M. M.; SANDRONI, M.; LUMMERZHEIM, M.; OLIVEIRA, D. E. A defesa das plantas contra as doenças. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 147, n. 3, 1999. Disponível em: <<http://cienciahoje.uol.com.br/materia/resources/files/chmais/pass/ch147/planta.rtf>>. Acesso em: 20 jul. 2006.

POZO, O. J.; MARIN, J. M.; SANCHO, J. V.; HERNÁNDEZ, F. Determination of abamectin and azadirachtin residues in orange samples by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 992, n. 1, p. 133-140, 2003.

PURI, H. S. **Neem: The Divine Tree -Azadirachta Indica**. Amsterdam: Harwood Academic, 1999. 182 p.

RADIN, N. S. Preparation of lipid extracts. **Methods in Enzimology**, New York, v. 14, n. 1, p. 245-254, 1969.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RAMESH A.; BALASUBRAMANIAN, M. Rapid preconcentration method for the determination of azadirachtin-A and -B, nimbin and salannin in neem oil samples by using graphitised carbon solid phase extraction. **The Analyst**, Cambridge, v. 1, n. 19, p. 19-24, 1999.

RAMJI, N.; VENKATAKRISHNAN, K.; MADYASTHA, M. Epi-azadirachtin H from *Azadirachta indica*, **Phytochemistry**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 561-562, 1996.

RAO, A. D.; DEVI, K. N., THYAGARAJU, K. Isolation of antioxidant principle from *Azadirachta* seed kernels: determination of its role on plant lipoxygenases. **Journal of Enzyme Inhibition**, Chur, v. 14, n. 1, p. 85-96, 1998.

REMBOLD, H. Isomeric azadirachtins and their mode of action. In: JACOBSON, M. **The neem tree**. London: CRC Press Inc, 1989, p. 47-50.

REMBOLD, H. Isomeric azadirachtins and their mode of action. In: JACOBSON, M. **The Neem Tree**. London: CRC Press, 1990; p. 47-67.

RENGASAMY S.; KAUSHIK, N.; KUMAR, J.; KOUL, O; PARMAR, B. S. Azadirachtin content and bioactivity of neem ecotypes of India. In: SINGH, R. P. **World Neem Conference**. Oxford: IBHCO, 1993, p. 207.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fisiopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 123-130, 2003.

REYMOND, P.; FARMER, E. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 1, n. 5, p. 404-411, 1998.

RICHARD, M.J., ARNAUD, J., JURKOVITZ, C., HACHACHE, T., MEFTAH, H., LAPORTE, F., FORET, M., FAVIER, A., CORDONNIER, D. Trace elements and lipid peroxidation abnormalities in patients with chronic renal failure. **Nephron**, Basel, v. 57, n. 1, p.10-15, 1991.

RORY, F. DEGNHARDT, P.; BONHARN S. Transcript profiling demonstrates absence of loss a single RPL2a paralog, **Planta**, v. 15, n. 1, p. 12-16, 2008.

SANINO, A. Determination of three natural pesticides in processed fruit and vegetables using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, London, v. 21, n. 1, p. 2079-2086, 2007.

SANZ, M. J., PEÑA, G. S., CALATAYUD, V., GALLEGU, M. T., CERVERÓ, J. **La Contaminación Atmosférica de los Bosques: Guía para la Identificación de Daños Visibles Causados por Ozono**. Ministerio del Medio Ambiente – Parques Nacionales, Madrid, 2004.

SARAI, G.; CARBONI, P.; SARRITZU, E.; RUSSO, M.; CABRAS, P. A simple and selective method for the measurement of azadirachtin and related azadirachoid levels in fruits and vegetables using liquid chromatography electrospray ionization

tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chur, v. 56, n. 9, p. 2939-2943, 2008.

SAXENA, R. C. Inseticides from Neem. In: ARNASON, J. T.; PHILOGENE, B. J. R.; MORAND, P. **Inseticides of plant origin**. Washington: ACS, 1989. Chapter 9, p. 110-129.

SBALCHEIRO, C. C. **Ação do biocontrolador com atividade de Indução de resistência no controle do feijoeiro** (*Phaseolus vulgaris* L.). 2006. 112 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Fisiopatologia). Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2006.

SCALIZE, F. E. **Indução e detecção de azadiractina em calos de *Azadirachta indica* Adr. Juss (nim)**. 2003. 32 f. Disertação (Mestrado em Agronomia - Genética e Melhoramento de Plantas). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária - Universidade Estadual Paulista Jaboticabal, 2003.

SCHAAF, O.; JARVIS, A. P.; VAN DER ESCH, A.; GIAGNACOVO, G.; OLDHAM, N. J. Rapid and sensitive analysis of azadirachtin and related triterpenoids from neem (*Azadirachta indica*) by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 886, n. 1, p. 89-97, 2000.

SCHNEIDER, M.; SCHWEIZER, P.; MEUWLY, P.; MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance in plants. **International Journal of Cytology**, New York, v. 168, n. 1, p. 303-304, 1996.

SCHNEIDER, C. D.; DE OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, São Paulo, v. 10, n. 4, p. 308-313, 2004.

SCHOONHOVEN, L. M.; JERMY, T.; VAN LOON, J. J. **A insect-plant biology:** from physiology to evolution. London: Chapman & Hall, 1998. Chapter 3, p. 31-82.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F., CRUZ, M. E. S., STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI S. F. Efeito do extrato bruto de plantas medicinais na indução de fitoalexinas em soja e sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, n. 3, p. 346-347, 1997.

SHARMA, V.; WALIA, S.; DHINGRA,, S.; KUMAR, J.; PARMAR, B. S. Azadirachtin-A and tetrahydroazadirachtin-A concentrates: preparation, LC-MS characterization and insect antifeedant/IGR activity against *Helicoverpa armigera* (Hubner). **Pest Management Science**, v. 62, n. 10, p. 965-975, 2006.

SHARMA, V.; WALIA, S.; KUMAR, J.; NAIR, M. G.; PARMAR, B. S. An efficient for the purification and characterization of nematicidal azadirachtins A, B and H, using MPLC and ESIMS. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, Chur, v. 51, n. 14, p. 3966-3972, 2003.

SIDHU, O. P.; KUMAR, V.; BEHL, H. M. Variability in neem (*Azadirachta indica*) with respect to azadirachtin content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chur, v. 51, n. 4, p. 910-915, 2003.

SILVA, J. C. T.; JHAM, G. N.; OLIVEIRA, R. D. L.; BROWN, L. Purification of the seven tetranortriterpenoids in neem (*Azadirachta indica*) seed by counter-current chromatography sequentially followed by isocratic preparative reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1151, n. 1, p. 203-210, 2007.

SIMMONDS, M. S. J.; JARVIS, A. P.; JOHNSON, S.; JONES, G. R.; MORGAN, D. Comparison of anti-feedant and insecticidal activity of nimbin and salannin photo-oxidation products with neem (*Azadirachta indica*) limonoids. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 60, n. 5, p. 459-464, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre: UFRGS, 2003. 1104 p.

SINGH, U. P.; MAURYA, S.; SINGH, D. P. Phenolic acids in neem (*Azadirachta indica*): a major pre-existing secondary metabolites. **Journal of Herbal Pharmacoterapy**, Binghamton, v. 5, n. 1, p. 35-43, 2005.

SINGH, U. P.; PRITHIVIRAJ, B. Neemazal, a product of neem (*Azadirachta indica*), induces resistance in pea (*Pisum sativum*) against *Erysiphe pisi*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 51, n. 3, p. 181-194, 1997.

SINHA, K.C.; RIAR, S. S.; TIWARY, R. S.; DHAWAN, A. K.; BHADHAN, J.; THOMAS, P.; KAIN, A. K.; JAIN, R. K. Neem oil as a vaginal contraceptive. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v. 79, n.1, p. 131-136, 1984.

SITHISARN, P.; SUPABPHOL, R., GRITSANAPAN, W. Antioxidant activity of Siamese neem tree. **Journal of Ethopharmacology**, Lausanne, v. 99, n. 1, p. 109-112, 2005.

SLINKARD, K.; SINGLETON, V. L. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. **American Journal of Enology Viticulture**, California, v. 28, n. 1, p. 49-55, 1977.

SRITANAUDOMCHAI, H.; KUSAMRAN, T.; KUAKULKIAT, W.; BUNYAPRAPHATSARA, N.; HIRANSALEE, A.; TEPSUWAN, A.; KUSAMRAN, W. R. Quinone reductase inducers in *Azadirachta indica* A. Juss flowers, and their mechanisms of action. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, Khon Kaen, v. 6, n. 3, p. 263-239, 2005.

SRIVASARAVA, K. P.; PARMAR, B. S. Evaluation of neem oil emulsifiable concentrate against sorghum aphids. *Neem Newsletter*, v. 2, n. 1, p.7, 1985.

- STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Proteção de plântulas de milho pipoca contra *Exserohilum turcicum* pelo uso de *graminicola*. **Summa Phytopathologica**, v. 20, n. 1, p. 16-21. 1994.
- STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J. P. Systemic Acquired Resistance. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 35, n. 1, p. 235-270, 1997.
- SUBAPRYIA, R.; NAGINI, S. Medicinal properties of neem leaves. **Current Medicinal Chemistry Anti- Cancer Agents**, Hilversum, v. 5, n. 2, p. 149-156, 2005.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 3. ed. Sunderland: Sinauer, 2002. 690 p.
- TRINDADE, R. C. P.; MARQUES, I. M. R.; XAVIER, H. S.; DE OLIVEIRA, J. V. Extrato metanólico da amêndoa da semente de nim e a mortalidade de ovos e lagartas da traça-do-tomateiro. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, n. 3, p. 407-413, 2000.
- UPADHYAY, S. N.; DHAWAN, S.; SHARMA, M. G.; TALWAR, G. P. Long-term contraceptive effects of intrauterine neem treatment in bonnet monkeys: an alternate to intrauterine contraceptive devices. **Contraception**, Los Altos, v. 49, n. 2, p. 161-169, 1994.
- UPADHYAY, S. N.; KAUSHIC, C.; TALWAR, G. P. Antifertility effects of neem (*Azadirachta indica*) oil by single intrauterine administration: A novel method for contraception. **Proceedings: Biological Sciences**, London, v. 242, n. 1305, p. 175-179, 1990.
- VAN DER NAT, J. M.; VAN DER SLUIS, W. G.; DE SILVA, K. T. D.; LABADIE, R. P. Ethnopharmacognostical survey of *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae). **Journal of Ethonopharmacology**, Lausanne, v. 35, n. 1, p. 1-24, 1991.

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

WILDERMUTH, M. C.; DEWNEY, J.; WU, G.; AUSUBEL, F. M. Isocorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defense. **Nature**, London, v. 414, n. 1, p. 562-565, 2001.

YADAV, S. K.; RATHORE, J. S. Mitotic inhibition by *Melia azadirachta* leaf extracts. **Proceedings of the National Academy of Sciences India**, Allahabad, v. 46, n. 2, p. 527-535, 1976.

YAKKUNDI, S. R.; THEJAVATHI. R.; RAVINDRANATH, B. Variation of azadirachtin content during growth and storage of neem (*Azadirachta indica*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chur, v. 43, n. 9, p. 2517-2519, 1995.

YAMASAKI, R. B.; KLOCKE J.A.; LEE, S. M.; STONE, G. A.; DARLINGTON, M. V. Isolation and purification of azadirachtin from neem (*Azadirachta indica*) seeds using flash chromatography and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 356, n. 1, p. 220-226, 1986.

ZADOKS, J. C. Modern plant protection: developments and perspectives. In 30° CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 1997, Poços de Caldas. Resumos de Palestras, p.16-26.

ZANNO, P. R.; MIURA, I.; NAKANISH, K.; ELDER, D. I. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 97, n. 7, p. 1975-1977, 1975.

ZHAO, H., WANG, B. C., ZHAO, H. C.; WANG, J. B. Stress stimulus induced resistance to *Cladosporium cucumerinum* in cucumber seedling. **Colloids and Surfaces: B Biointerfaces**, New York, v. 44, n. 1, p. 36-40, 2005.