



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E MOLECULAR DE
QUATRO ESPÉCIES DE *Vitex* (LAMIACEAE) E
BIOATIVIDADE CONTRA O ÁCARO-DA-NECROSE-DO-
COQUEIRO *Aceria guerreronis* (ACARI: ERIOPHYIDAE)**

IGHOR COSTA BARRETO

São Cristovão

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E MOLECULAR DE
QUATRO ESPÉCIES DE *Vitex* (LAMIACEAE) E
BIOATIVIDADE CONTRA O ÁCARO-DA-NECROSE-DO-
COQUEIRO *Aceria guerreronis* (ACARI: ERIOPHYIDAE)**

IGHOR COSTA BARRETO

Dissertação apresentado ao Núcleo de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. José Guedes de Sena Filho

São Cristovão

2017

LOMBADA

BARRETO, I.C.	CAACTERIZAÇÃO QUÍMICA E MOLECULAR DE QUATRO ESPECIES DE <i>Vitex</i> (LAMIACEAE) E BIOATIVIDADE CONTRA O ÁCARO-DA-NECROSE-DO-COQUEIRO <i>Aceria guerreronis</i> (ACARI: ERIOPHYIDAE)	2017

FICHA CATALOGRÁFICA

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

B273c Barreto, Ighor Costa
Caracterização química e molecular de quatro espécies de *Vitex* (Lamiaceae) e bioatividade contra o ácaro-da-necrose-do-coqueiro *Aceria guerreronis* (Acari : Eriophyidae) / Ighor Costa Barreto ; orientador José Guedes de Sena Filho. – São Cristovão, 2017.
73 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) –
Universidade Federal de Sergipe, 2017.

1. Ácaro de plantas. 2. Vitex. 3. Coqueiro – Doenças e pragas. 4. Acaricidas. 5. Testes de toxicidade. I. Sena Filho, José Guedes de, orient.
II. Título.

CDU 615.322:581.2

IGHOR COSTA BARRETO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E MOLECULAR DE
QUATRO ESPÉCIES DE *Vitex* (LAMIACEAE) E
BIOATIVIDADE CONTRA O ÁCARO-DA-NECROSE-DO-
COQUEIRO *Aceria guerreronis* (ACARI: ERIOPHYIDAE)**

Dissertação apresentado ao Núcleo de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 03/03/2017

Orientador: Prof. Dr. José Guedes de Sena Filho

1º Examinador: Profª Drª Rogéria de Souza Nunes

2º Examinador: Profª Drª. Allívia Rouse Carregosa Rabbani

PARECER

*Aos meus pais,
Joan B. Barreto e Maria Olivia Flores
Dedico*

RESUMO

O ácaro-da-necrose-de-coqueiro *Aceria guerreronis* keifer é uma das principais pragas de coqueiro do Brasil, seu ataque causa queda prematura, redução no tamanho e peso dos frutos e volume de água, além dos danos estéticos (necroses) na casca que diminui o valor comercial do produto. Atualmente, existem cinco agrotóxicos registrados para o controle dessa praga. No entanto, não há especificidade ao *A. guerreronis*. A família Lamiaceae se destaca com alguns exemplares com notória atividade inseticida, dentre eles, o gênero *Vitex*, conhecido por possuir dentre seus constituintes os ecdisteroides e iridoides como marcadores do gênero, todavia, há uma escassez de estudo quimiotaxonômicos específicos para compostos voláteis. O objetivo deste trabalho foi identificar os compostos voláteis presentes nos óleos essenciais das espécies de *Vitex gardneriana* Schauer, *Vitex capitata* Vahl., *Vitex rufescens* A. Juss., *Vitex megapotamica* (Spreng.) Moldenk e avaliar possíveis efeitos de toxicidade e repelência frente ao *A. guerreronis*, além de analisar a diversidade genética de espécies do gênero *Vitex*. Técnicas cromatográficas e espectroscópicas (CG-MS/FID) foram utilizadas para detecção dos compostos voláteis, e os marcadores moleculares de ISSR foram empregados para a caracterização genética das espécies, além de testes de toxicidade e repelência contra ao ácaro-da-necrose. Os resultados mostraram 46, 45, 41 e 37 constituintes para *V. capitata*, *V. megapotamica*, *V. gardneriana* e *V. rufences* respectivamente, dentre os quais, α -copaeno, (*E*)-cariofileno, γ -elemeno, α -humuleno, trans-cadina-1(6),4-dieno, viridiflorene e δ -cadineno foram os principais componentes de *V. capitata* e *V. megapotamica*. 6,9- guaiadieno, óxido de cariofileno, *L*-calameneno para *V. gardneriana* e (*E*)-cariofileno, ledol, germacreno D, α -humuleno, allo-aromadendreno, viridiflorene e α -elemene para *V. rufences*. Os resultados dos marcadores moleculares de ISSR geraram um total de 90 fragmentos, dos quais 100% foram polimórficos. Os genótipos das quatro espécies de *Vitex* selecionadas para este estudo foram agrupados utilizando o coeficiente Jaccard (JC). A média de similaridade foi de 0,21 JC (0,08-0,45 JC). Observou-se uma clara separação de dois grupos, sendo *V. gardneriana* a mais isolada das quatro espécies, e *V. capitata* e *V. megapotamica* mais próxima geneticamente entre si. A atividade acaricida dos quatro óleos também foi avaliada por meio de ensaios de toxicidade e repelência contra o ácaro-da-necrose. O óleo essencial de *V. gardneriana* mostrou atividade acaricida ao *A. guerreronis* com uma CL_{50} de $0,85 \text{ mg.mL}^{-1}$, enquanto que os óleos de *V. capitata*, *V. megapotamica* e *V. rufecens* não foram tóxicos para esta praga até $2,3 \text{ mg.ml}^{-1}$, quando testados através do bioensaio de toxicidade. Em geral, os óleos essenciais destilados a partir das espécies de *Vitex* repeliram o *A. guerreronis* após 24 horas a uma concentração de 1.8 mg.mL^{-1} utilizando abamectina como controle no ensaio de repelência disco de duas escolha, no entanto, o óleo essencial de *V. gardneriana* apresentou atividade acaricida estatisticamente significativa frente ao ácaro-da-necrose-do-coqueiro. Apresentando-se como potencial candidato para o desenvolvimento de um produto acaricida.

Palavras-Chaves: Ácaro-da-necrose, *Vitex gardneriana*, *Vitex capitata*, *Vitex megapotamica*, *Vitex rufescens*, compostos voláteis, ISSR, toxicidade, repelência.

ABSTRACT

Aceria guerreronis keifer is one of the main coconut pests in Brazil, its attack causes a premature fall, reduction of fruit size, water weight and volume, as well as stetic esthetic damages (necrosis) depreciating the product. Currently, there are five pesticides registered for the control of the coconut-necrotic mite. However, there is no specificity to *A. guerreronis*. The Lamiaceae family stands out with some specimens with notable insecticidal activity, among them the *Vitex* genus, known to have ecdysteroids and iridoids as markers of the genus. However, there is a shortage of specific chemotaxonomic studies for volatile compounds. The objective of this work was to identify the volatile compounds present in the essential oils of the species of *Vitex gardneriana* Schauer, *Vitex capitata* Vahl., *Vitex rufescens* A. Juss., *Vitex megapotamica* (Spreng.) Moldenk and to evaluate possible effects of toxicity and repellence against *A. guerreronis*. In addition to analyzing the genetic diversity of species of the genus *Vitex* using ISSR markers, verifying the occurrence of statistical correlations between the genetic diversity and the chemical profiles of the essential oils. Chromatographic and spectroscopic techniques (GC-MS / FID) were used for the detection of volatile compounds, and the molecular markers of ISSR for the genetic characterization of the species, as well as toxicity and repellency tests against necrotic necrosis. The results showed 46, 45, 41 and 37 constituents for *V. capitata*, *V. megapotamica*, *V. gardneriana* and *V. rufences* respectively, among which, α -copaene, (*E*)-caryophyllene, γ -elemene, α -humulene, trans-cadine-1(6)4-diene, viridiflorene and δ -cadinene were the main components of *V. capitata* and *V. megapotamica*. 6,9-guaiadiene, caryophyllene oxide, L-calamenene for *V. gardneriana* and (*E*)-cariophyllene, ledol, germacrene D, α -humulene, allo-aromadendrene, viridiflorene and α -elemene for *V. rufences*. The results of molecular markers of ISSR generated a total of 90 fragments, of which 100% were polymorphic. The genotypes of the four *Vitex* species selected for this study were pooled using the Jaccard coefficient (JC). The mean similarity was 0.21 JC (0.08-0.45 JC). A clear separation of two groups was observed, with *V. gardneriana* being the most isolated of the four species, and *V. capitata* and *V. megapotamica* more closely related to each other. The acaricide activity of the four oils was also evaluated by means of toxicity and repellency tests against *A. guerreronis*. The essential oil of *V. gardneriana* showed acaricidal activity against *A. guerreronis* with a LC50 of 0.85 mg.mL⁻¹, whereas the oils of *V. capitata*, *V. megapotamica* and *V. rufecens* were not toxic to this pest up to 2.3 mg. mL⁻¹ when tested through the toxicity bioassay. In general, essential oils distilled from the *Vitex* species repelled *A. guerreronis* after 24 hours at a concentration of 1.8 mg.mL⁻¹ using abamectin as a control in the two-choice disc repellency assay, however, the essential oil of *V. gardneriana* presented a statistically significant acaricidal activity against the coconut mite necrosis. Introducing himself as a potential candidate for the development of an acaricide product.

Key Words: *Aceria guerreronis* L., *Vitex gardneriana*, *Vitex capitata*, *Vitex megapotamica*, *V. rufescens*, volatile compounds, toxicity/repellency

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C – Grau centígrado

AFLP - Amplified Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados)

ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitaria

CH₂Cl₂ - Diclorometano

CL – Concentração Letal

CTAB - brometo de cetil trimetil amônio

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

FID - Flame ionization detector (Detector de ionização de chama)

GC - Gas Chromatography (Cromatografia gasosa)

ISSR - Inter-Simple Sequence Repeat (Sequências simples repetidas entre dois microssatélites)

kPa – Quilopascal

m – Metro

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

mL – Milímetro

mM - Nanomolar

MS – Mass spectroscopy (Espectroscopia de massa)

PARA - Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

Pb – Pares de base

PCR - Reação em cadeia da polimerase

pH - Potencial de hidrogénio

RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA

Rpm –Rotação por minuto

S_{gij} - Similaridade genéticas

SSR - Simple sequence repeats microsatellites (Sequências simples repetitivas ou microssatélites)

uL - Microlitro

UPGMA - Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages

V – Volts

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** - Imagens do coqueiro e seus frutos (*Cocos nucifera* L.) Fotos: Dr. Adenir Teodoro. Aracaju, 2016. 18
- Figura 2** - Origem da espécie *Cocos nucifera* L. e sua distribuição geográfica. Fonte: Agroforestry Database 4.0 (ORWA et al., 2009) 18
- Figura 3** - Imagem ampliada do *Aceria guerreronis* Keifer. Fotos: Dr. Adenir Teodoro. Aracaju, 2016..... 19
- Figura 4** - Deformações nos frutos causados devido ao ataque do *Aceria guerreronis* Keifer. (A) Inicialmente forma manchas brancas–amareladas de forma triangular (B) Posteriormente tornam–se necrosadas. (C) Aumento da necrose. (D) Deformação do fruto de acordo com seu desenvolvimento. Fotos: Dr. Adenir teodoro. Aracaju, 2016. 20
- Figura 5** – Agrotóxicos utilizados para o controle do *Aceria.guerreronis* Keifer. **(5a)** Abamectina, **(5b)** Espirodiclofeno, **(5c)** Fenporoximato, **(5d)** Azadiractina..... 21
- Figura 6** - Distribuição geográfica do gênero *Vitex*. Fonte: Mobot (acessível em <http://www.tropicos.org/>). 24
- Figura 7** - (A) Ramo, (B) Inflorescência e flor de *Vitex megapotamica* (Spreng.) Moldenke (C) Fotos: Ighor Barreto..... 31
- Figura 8** - Flor da *Vitex gardneriana* Schauer. Foto: Dr. José Guedes de Sena Filho. 33
- Figura 9** - Ramo (A); inflorescência (B); e flor de *Vitex capitata* Vahl. (C). Foto: Ighor Barreto..... 34
- Figura 10** - (A) Ramo com fruto; (B) Árvore da *Vitex rufescens* A. Juss. Foto: Dr. José Guedes de Sena Filho 35
- Figura 11:** Possível rota biossintética e dos principais sesquiterpenos contendo anéis de sete membros viridifloreno (1) e 6,9 guaiadieno (2). 49
- Figura 12-** Padrões ISSR de amplificação do DNA genômico de 4 espécies de *Vitex* obtidos por meio de 14 iniciadores M (direita): marcador de 100kb; 1 – *Vitex megapotamica*; 2 - *Vitex capita*; 3- *Vitex gardneriana* ;4 - *Vitex rufescens*. 50

Figura 13 - Dendrograma de similaridade genética utilizando marcadores ISSR utilizando o coeficiente de Jaccard e método de agrupamento UPGMA e análise de bootstrap (100.000x) para quatro espécies de <i>Vitex</i>	52
Figura 14 - Dendrograma de similaridade utilizando pelo coeficiente de Jaccard e método de agrupamento UPGMA, com base na matriz binária de 14 marcadores ISSR e compostos dos óleos essenciais de quatro espécies do gênero <i>Vitex</i>	53
Figura 15 - Repelência dos óleos essenciais destilados das folhas de <i>Vitex megapotamica</i> (Spreng.) Moldenke, <i>Vitex gardneriana</i> Schauer, <i>Vitex capitata</i> Vahl. frente ao ácaro <i>Aceria guerreronis</i> Keifer depois de 1h (A) e 24h (B) usando disco de duas escolhas.....	54

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies de <i>Vitex</i> e suas respectivas atividades inseticida e repelente.....	28
Tabela 2 - Espécies de <i>Vitex</i> e seus principais compostos encontrados na composição dos óleos essenciais.....	29
Tabela 3 - Iniciadores ISSR utilizados neste estudo, sendo a base Y (C,T) e R (A,G).....	41
Tabela 4 - Esquema para obtenção das variáveis obtidas através da matriz binária para obtenção da similaridade genética utilizando o coeficiente de Jacard.....	43
Tabela 5 - Principais compostos (%) identificados nos óleos essenciais extraídos das folhas de <i>Vitex megapotamica</i> (Spreng.) Moldenke, <i>Vitex gardneriana</i> Schauer, <i>Vitex capitata</i> Vahl e <i>Vitex rufescens</i> A. Juss. do nordeste do Brasil.	46
Tabela 5 (Continuação) - Principais compostos (%) identificados nos óleos essenciais extraídos das folhas de <i>Vitex megapotamica</i> (Spreng.) Moldenke, <i>Vitex gardneriana</i> Schauer, <i>Vitex capitata</i> Vahl e <i>Vitex rufescens</i> A. Juss. do nordeste do Brasil.	47
Tabela 5 (Continuação) - Principais compostos (%) identificados nos óleos essenciais extraídos das folhas de <i>Vitex megapotamica</i> (Spreng.) Moldenke, <i>Vitex gardneriana</i> Schauer, <i>Vitex capitata</i> Vahl e <i>Vitex rufescens</i> A. Juss. do nordeste do Brasil.	48
Tabela 6 - Número e porcentagem de bandas polimórficas obtidas pelo uso de 14 iniciadores ISSR, em 4 espécies do gênero <i>Vitex</i>	50
Tabela 7 - Similaridades genéticas obtidas pelo uso de 14 iniciadores ISSR em 4 espécies do gênero <i>Vitex</i> com base no coeficiente de Jaccard.	51
Tabela 8 - Similaridades pelo coeficiente de Jaccard com base na matriz binária de 14 marcadores ISSR e compostos dos óleos essenciais de quatro espécies do gênero <i>Vitex</i>	52

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1. <i>Cocos nucifera</i> L.....	18
2.2. <i>Aceria guerreronis</i> Keifer	19
2.3. Resíduos de agrotóxicos em alimentos e agravos à saúde	22
2.4. Família Lamiaceae e gênero <i>Vitex</i>	23
2.5. Etnofarmacologia do gênero <i>Vitex</i>	Erro! Indicador não definido.24
2.6. Potenciais compostos de ação inseticida do Gênero <i>Vitex</i>	27
2.7. <i>Vitex megapotamica</i> , <i>Vitex gardneriana</i> , <i>Vitex Capitata</i> e <i>Vitex rufescens</i> .	30
2.7.1. <i>Vitex megapotamica</i> (Spreng.) Moldenke	30
2.7.2. <i>Vitex gardneriana</i> Schauer	32Erro! Indicador não definido.
2.7.3. <i>Vitex capitata</i> Vahl.	33
2.7.4. <i>Vitex rufescens</i> A. Juss.....	34
2.8. Marcadores moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR).....	Erro! Indicador não definido.35
2.9. Marcadores ISSR	37
3. OBJETIVO GERAL	38
3.1. Objetivos específicos	38
4. METODOLOGIA	38
4.1. Coleta do material vegetal.....	38
4.2. Obtenção dos óleos essenciais	39
4.3. Análise por GC/EM dos óleos essenciais.....	39
4.4. Extração de DNA	40
4.5. Quantificação e diluição do DNA	41
4.6. Inter Sequências Simples Repetida (ISSR).....	41
4.7. Eletroforese, visualização e fotodocumentação dos géis.....	42
4.8. Análises estatísticas	42
4.9. Teste de toxicidade para o <i>A. guerreronis</i>	43
4.10. Teste de repelência para o <i>A. guerreronis</i>	44
5. RESULTADO E DISCUSSÃO	45
5.1. Análise química dos óleos.....	45
5.2. Análise de marcadores de ISSR.....	49

5.3. Teste toxicidade e repelência	53
6. CONCLUSÃO	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

O Brasil possui a maior diversidade genética em espécies de plantas no mundo, no entanto, menos de 10% foram avaliadas quanto as suas características biológicas e, menos de 5% foram submetidas a estudos fitoquímicos detalhados (LUNA et al.2005). Estudos recentes apontam as plantas como fonte para descoberta de novas substâncias biologicamente ativas (NEWMAN, 2012). Dentre as recentes estratégias utilizadas para o isolamento e identificação de substâncias com potencial de atividade biológica, a pesquisa por substâncias presentes em extratos e óleos de plantas se destaca como uma das mais importantes. O estudo biomonitorado enfatiza o conhecimento da estrutura dos constituintes químicos de uma espécie vegetal ou de microrganismo, com ênfase nas substâncias com atividade biológica ou farmacológica e não somente com foco central ao isolamento e determinação estrutural, como na fitoquímica clássica (PINTO, et al., 2002).

O ácaro-da-necrose *Aceria guerreronis* Keifer (Acari: Eriophyidae) é considerado a principal praga do coqueiro no Brasil (FERREIRA et al. 1998; MORAES, 2008), sobretudo na região nordeste, onde os danos podem limitar a atividade (FERREIRA, 2009). O ataque do ácaro-da-necrose causa queda prematura de frutos, redução de tamanho, peso e volume de água, bem como danos estéticos (necroses) na casca que depreciam o produto (FERREIRA, 2009). O uso indiscriminado dos agrotóxicos que são utilizados para combater o *A. guerreronis*, embora sendo na maioria das vezes eficiente para o controle do ácaro, possibilita a ocorrência de efeitos colaterais, resultando em impactos indesejados para a saúde humana e do meio ambiente, contaminando os solos e as culturas com resíduos tóxicos e conseqüentemente os alimentos oriundos deles, além do surgimento de populações de ácaros mais resistentes (CARNEIRO et al., 2012). Dessa forma, novas estratégias estão sendo investigados com o objetivo de se obter agentes menos tóxicos ao ambiente, às pessoas e a inimigos naturais de pragas em comparação com agrotóxicos (GEIGER et al., 2011; REGNAULT-ROGER et al., 2012).

Diferentes tipos de espécies vegetais em suas diferentes partes, tanto na sua forma de pó, extratos e óleos essenciais já foram relatados por suas

propriedades biológicas ativas para diferentes espécies de artrópodes (CORRÊA, 2011). Alguns gêneros de famílias distintas são conhecidos por apresentarem constituintes químicos de atividade inseticida tais como; *Nicotiana* (Solonaceae), produzem nicotina e norniticona; *Derris*, *Lonchocarpus*, *Tephrosi* e *Mundulea* (Leguminoseae), produzem rotenóides; *Chrysanthemum* (Astaraceae), produzem piretrinas e *Azadirachta* (Meliaceae), produzem azadiractina. (SIMOES, 2001). Uma família que vem atraindo a atenção é a Lamiaceae, no qual vários gêneros produzem óleos essenciais que repelem insetos, tais como: *Thymus*, *Mentha*, *Origanum*, *Salvia* (KHANI, 2012; DARGAHIA et al., 2014; EL-SHERBINI, 2014; LAMARIA et al, 2014). Além destes, o gênero *Vitex* se destaca por ser uma grande fonte de ecdisteroides (SENA FILHO, 2008; CALLMANDER, 2014), classificado atualmente como hormônios esteroidais amplamente distribuído em invertebrados, que atua em seus diferentes processos bioquímicos e metabólicos. Também são encontrados em plantas, sendo denominados de fitoecdisteroides, no qual desempenham a função de proteção contra insetos (DINAN, 2001; KLEIN, 2004).

A literatura relata que óleos essenciais das espécies do gênero *Vitex* contêm monoterpenos como o 1,8-cineol, sabineno, α -pineno e limoneno e sesquiterpenos como β -cariofileno e germacreno D (DUYMUS et al., 2014; TOPLAN, 2015; ERYIGIT, 2015; KHALILZADEH et al., 2015; DAI et al., 2015). Muitos destes compostos têm apresentado atividade inseticida e acaricida (WANG et al., 2013; IBRAHIM et al., 2014; TRABOULS et al., 2014; MIN-SEOK, 2014; ROSSI, 2015). No entanto, não existem dados na literatura que abordem a identificação dos compostos voláteis das espécies *Vitex gardneriana* Schauer, *Vitex capitata* Vahl e *Vitex rufescens* A. Juss. bem como o modo de ação (acaricida e/ou repelência) contra o ácaro-da-necrose. Além disso, devido a representividade de espécies do gênero *Vitex* utilizada neste trabalho, associado à escassez de estudos quimiotaxionômicos do gênero, tornou-se viável um estudo complementar utilizando marcadores *Inter-Simple Sequence Repeat* (ISSR), além de uma investigação nos constituintes dos óleos essenciais para análise da diversidade química e molecular de quatro espécies de *Vitex*.

A análise de DNA baseada em marcadores moleculares, como ISSR, uma técnica que tem sido usada para resolver diferenças de espécies/subespécies em um gênero ou para diferenciar gêneros em uma família, tornou-se uma importante

ferramenta para estudar a diversidade genética das plantas nos últimos anos. Marcadores ISSR são amplamente utilizados no estudo da diversidade plantas, porque não precisam de nenhuma informação de sequência de DNA anterior, seus custos de desenvolvimento são baixos, e os procedimentos podem ser facilmente aplicados a qualquer espécie (HADIAN et al., 2014; SENA et al., 2012)

Diante desse contexto, outras espécies de *Vitex* que ainda apresenta escassez de dados ou poucos estudos, tais como, *V. capitata*, *V. rufescens*, *V. gardneriana*, *V. megapotamica* e seus respectivos pontenciais compostos voláteis podem apresentar atividade acaricida frente ao *A. guerreronis*. Ademais, uma caracterização molecular utilizando marcadores ISSR pode ser um passo inicial para futuros estudo quimiotaxonômicos do gênero *Vitex*. Portanto, o objetivo deste trabalho foi identificar os compostos voláteis presentes nos óleos essenciais das espécies de *V. gardneriana*, *V. capitata*, *V. rufescens*, *V. megapotamica* e avaliar possíveis efeitos de toxicidade e repelência frente ao ácaro-da-necrose-de-coqueiro. Além de analisar a diversidade genética de espécies do gênero *Vitex* utilizando marcadores ISSR, verificando a ocorrência de correlações estatísticas entre a diversidade genética e os perfis químicos dos óleos essenciais.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. *Cocos nucifera* L.

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) (**Figura 1**) é considerada a palmeira mais importante dentre as cultivadas, possuindo um destaque agrícola mundial, devido ao seu importante papel socioeconômico, no qual gera renda e empregos em diversos países tropicais onde é cultivada (COSTA, 2005; VIETMEYER, 1986).



Figura 1 - Imagens do coqueiro e seus frutos (*Cocos nucifera* L.) Fotos: Dr. Adenir Teodoro. Aracaju, 2016.

Sua origem é do sudoeste asiático, e encontra-se distribuído em mais de 200 países diferentes (**Figura 2**) (MARTINS, 2011). Os maiores produtores mundiais são: Filipinas, Indonésia, Índia e Vietnã (FAO, 2017).

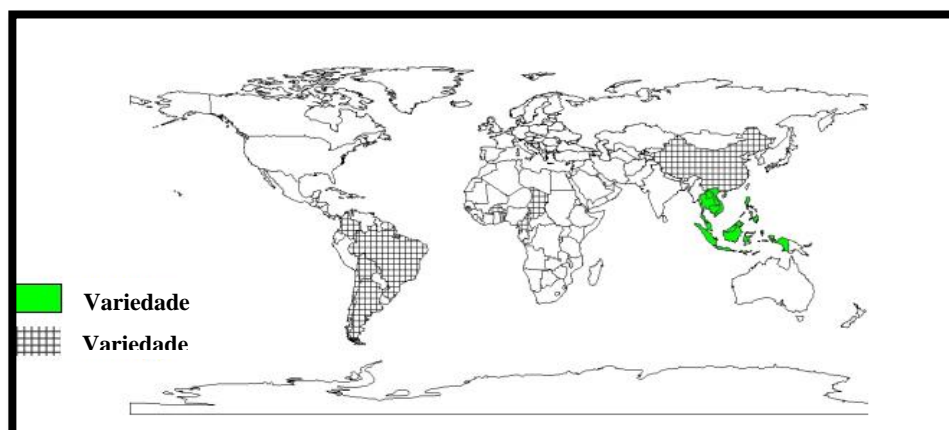


Figura 2 - Origem da espécie *Cocos nucifera* L. e sua distribuição geográfica. Fonte: Agroforestry Database 4.0 (ORWA et al., 2009)

No Brasil, os estados que mais produzem cocos são: Bahia, Ceará, Sergipe, Pará e Espírito Santo (IBGE, 2016). O cultivo do coco está diretamente ligado na elaboração de mais de 100 produtos, dentre eles, leite de coco, copra, óleo de coco (com aplicação farmacêutica e industrial), coco desidratado, fibra e carvão, sendo assim uma grande fonte de renda e alimentação (GUNN, 2012). No Brasil, sua produção é destinada ao uso agroindustrial, do qual se obtém, em sua maioria o coco desidratado, leite, e o consumo in natura da água de coco (MIROSA FILHO, 2002).

2.2. *Aceria guerreronis* Keifer

Dentre os diversos fatores que limitam a produção do coqueiro estão as pragas, e dentre estas o ácaro-da-necrose-do-coqueiro, *Aceria guerreronis* Keifer (Acari: Eriophyidae) (**Figura 3**), que é uma das principais pragas do coqueiro na América, África e Ásia (MOORE, 1996; HAQ et al., 2002), inclusive no Brasil, e sobretudo na região nordeste (FERREIRA et al., 1998; MORAES & FLECHTMANN, 2008).



Figura 3 - Imagem ampliada do *Aceria guerreronis* Keifer. Fotos: Dr. Adenir Teodoro. Aracaju, 2016.

Suas colônias localizam-se e desenvolvem-se no perianto, região meristemática do fruto coberta pelas brácteas (NAIR, 2002), isto dificulta bastante o controle do ácaro, pelo fato deste local ficar protegido da ação direta dos acaricidas por meio das pulverizações (FERREIRA et al., 2002), além dos inimigos naturais, que por serem maiores não conseguem ter acesso a esse local (LIMA et al., 2012).

Os danos provocados nos frutos pelos ácaros são devido ao processo de alimentação, no qual o ácaro perfura as células do tecido do perianto, alimentando-se do seu conteúdo, formando assim manchas branco–amareladas de forma triangular na epiderme dos frutos, que posteriormente torna-se necrosadas (HAQ et al., 2002). Com o desenvolvimento do fruto, vai ocorrendo rachaduras longitudinais, exsudações de resinas e deformação do fruto (**Figura 4**). Pode ainda, acontecer desse eriofídeo atacar as mudas, atingindo as folhas mais novas, provocando a morte da planta (AQUINO et al., 1968). O *A. guerreronis* provoca danos significativos, como redução no tamanho, queda prematura, perda de peso e o valor comercial dos frutos (HAQ et al., 2002; MOORE et al., 1989; PAUL & MATHEW, 2002). Estima-se que as perdas provocadas pelo ácaro podem ser superiores a 60% da produção (MIROSA FILHO, 2002).



Figura 4 - Deformações nos frutos causados devido ao ataque do *Aceria guerreronis* Keifer. (A) Inicialmente forma manchas brancas–amareladas de forma triangular (B) Posteriormente tornam-se necrosadas. (C) Aumento da necrose. (D) Deformação do fruto de acordo com seu desenvolvimento. Fotos: Dr. Adenir teodoro. Aracaju, 2016.

Apesar do conhecimento dos danos causados a cultura do coco, pelo ácaro-da-necrose, poucas são as alternativas para controlá-lo. Dentre as alternativas de manejo utilizadas com maior frequência, para o ácaro-da-necrose-do-coqueiro, destaca-se o uso de agrotóxicos, como por exemplo os acaricidas, que não apresentam especificidade para esta praga. Contudo, o controle químico para esse eriofídeo torna-se difícil devido ao hábito da praga em localizar-se sob as brácteas dos frutos, o que dificulta a penetração dos agentes químicos e conseqüentemente o contato da substância com a praga. No Brasil, existem cinco agrotóxicos: abamectina (**5a**), espirodiclofeno (**5b**), fenperoximato (**5c**), azadiractina (**5d**) e exithiazoxy (**5e**) registrados para o controle do ácaro-da-necrose-de-coqueiro junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (AGROFIT, 2017).

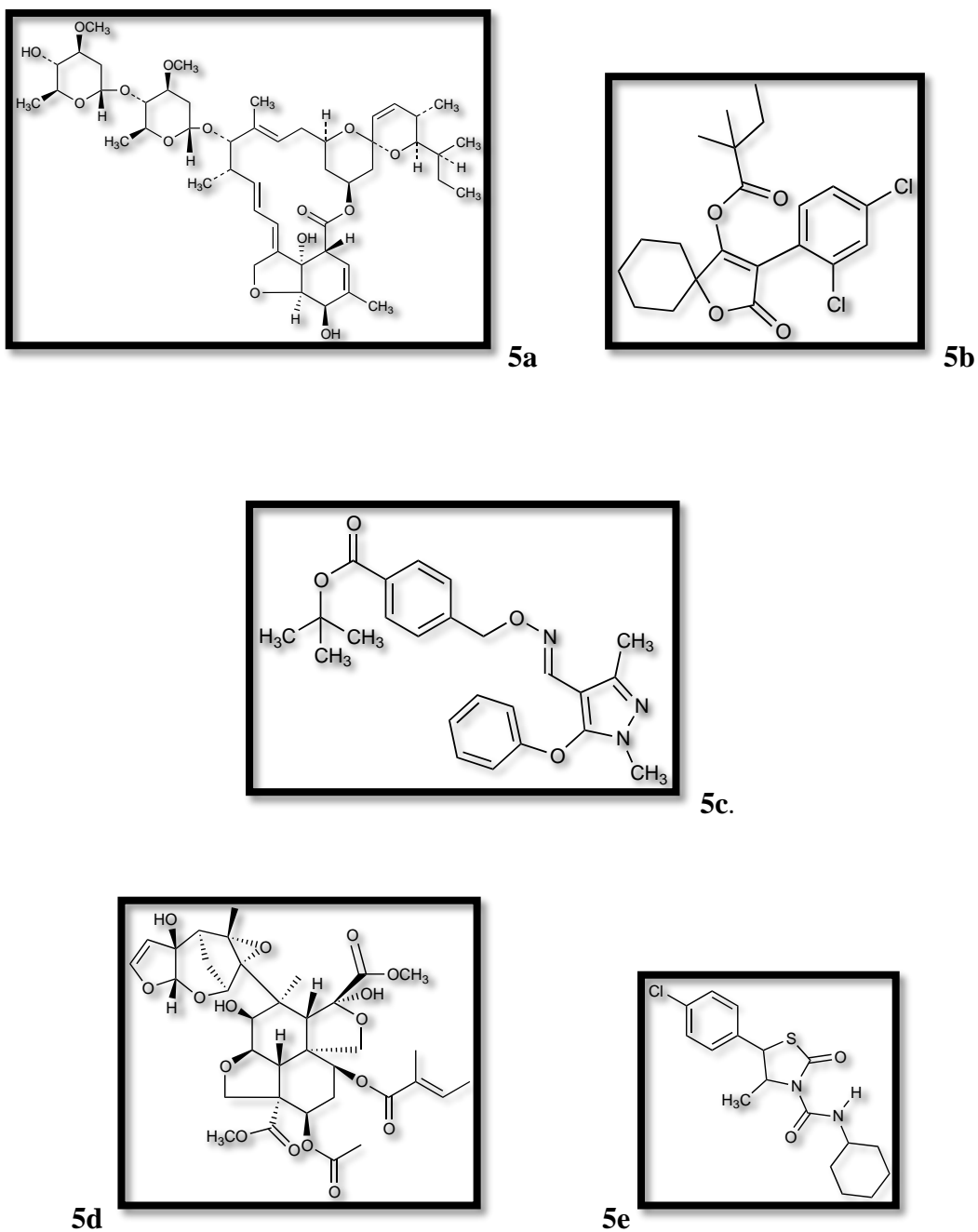


Figura 5 – Agrotóxicos utilizados para o controle do *Aceria guerreronis* Keifer. **(5a)** Abamectina, **(5b)** Espirodiclofeno, **(5c)** Fenperoximato, **(5d)** Azadiractina e exithiazoxy **(5e)**.

Contudo, o uso frequente destes agentes químicos tem contribuído para efeitos colaterais e adversos, como o surgimento de populações mais resistentes, contaminação do solo e homem, além de elevar o custo de produção com a compra de equipamentos e insumos, o que inviabiliza a prática de controle químico por

pequenos agricultores. Estes que produzem cerca de 90% da produção mundial de coco, com áreas de até cinco hectares. No Brasil, esse quadro se repete com aproximadamente 70% da produção de coco, com áreas de até dez hectares (ARAGÃO et al., 2010; SIQUEIRA et al., 2002).

2.3. Resíduos de agrotóxicos em alimentos e agravos à saúde

O processo produtivo agrícola brasileiro está cada vez mais dependente dos agrotóxicos e fertilizantes químicos. Em 2008, o Brasil ultrapassou os Estados Unidos e assumiu o posto de maior mercado mundial de agrotóxicos (ANVISA & UFPR, 2012). O uso indiscriminado dos agrotóxicos, embora sendo na maioria das vezes eficiente para o controle de pragas, possibilita a ocorrência de efeitos colaterais, resultando em impactos indesejados para a saúde humana e do meio ambiente, expondo de forma perigosa e frequente o consumidor, trabalhador, além de contaminar os solos e as culturas com resíduos tóxicos e conseqüentemente os alimentos oriundos deles. Um cenário que já é suficientemente preocupante, do ponto de vista de saúde pública e ambiental, portanto, deve-se levar em conta que as perspectivas são de agravamento para os próximos anos.

Segundo análise de amostras coletadas em todas as 26 Unidades Federadas do Brasil, realizada pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da Anvisa, um terço dos alimentos consumidos cotidianamente pelos brasileiros está contaminado pelos agrotóxicos, (ANVISA, 2012). Dos quais 63% das amostras analisadas apresentaram contaminação, sendo que 28% apresentaram ingredientes ativos não autorizados ou ultrapassaram os limites máximos de resíduos considerados aceitáveis. Mesmo que alguns dos ingredientes ativos dos agrotóxicos, por seus efeitos agudos, possam ser classificados como medianamente ou pouco tóxicos, não se pode perder de vista os efeitos crônicos que podem ocorrer meses, anos ou até décadas após a exposição, manifestando-se em várias doenças como cânceres, malformação congênita, distúrbios endócrinos, neurológicos e mentais (CARNEIRO et al., 2012).

2.4. Família Lamiaceae e gênero *Vitex*

Família Lamiaceae pertence à ordem Tubiflorae Lamiales, abrangendo cerca de 200 gêneros e, aproximadamente, 3.200 espécies, distribuídas em todo o mundo. A maioria das espécies é conhecida pelo seu uso condimentar, e muitas delas possuem atividade biológica já relatada na literatura, por diversos autores (LORENZI, 2002). Dentre algumas espécies brasileiras que mais se destacam está a *Hyptis suaveolens* L. (alfavacão), *H. mutabilis* L. e *H. atrorubens* Poit.; *Lavandula angustifolia* Mill (alfazema); *Leonotis nepetaefolia* L. (cordão-do-frade); *Leonurus sibiricus* L. (macaé) *L. cardiaca* L. e *L. sibiricus* L. *Leucas martinicensis* (Jacq.) R. Br. (catinga-de-mulata) *Marrubim vulgare* L. (hortelã-grande), *Melissa officinalis* L. (cidreira), *Mentha avensis* L. (hortelã-do-Brasil), *M. piperita* L. (hortelã), *M. pulegium* L. (poejo), *Ocimum basilicum* L. (majericão), *O. selloi* Benth., *O. vulgare* L. (orégano), *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim), *Salvia officinalis* L. (sálvia) (DE LA CRUZ, 1997; JOLY, 1983; LORENZI, 2002)

Esta família possui vários gêneros que produz óleos essenciais que repelem insetos, como exemplo, a espécie *Thymus transcaspicus* Klokov apresentou forte atividade contra *Anopheles stephensi* Liston (vetor da malária na Índia), (DARGAHIA et al., 2014). *Mentha longifolia* L. exibiu potente atividade inseticida contra *Tribolium castaneum* H. (besouro da farinha) praga de produtos armazenados (KHANI, 2012). *Origanum majorana* L. revelou ser mais tóxico do que os agentes químicos fenotrina e piretrina, que são utilizados no combate ao *Pediculus capitis* Linnaeus (piolho) (EL-SHERBINI, 2014). *Salvia officinalis* L. apresentou toxicidade contra larvas e adultos de *Culex pipiens* L. (LAMARIA et al, 2014).

Vitex (Lamiaceae) é constituído aproximadamente por 250 espécies, de distribuição pantropical, com poucos exemplares em regiões temperadas (**Figura 6**). Na literatura antiga, o gênero *Vitex* Tour.ex. L pode ser encontrado nas famílias Vitaceae Juss. (1789) e Verbenaceae J.St. -Hil. (1805), ou na subfamília Viticoideae em Verbenaceae, porém, devido a estudos morfológicos, transferiu a subfamília Viticoideae para família Lamiaceae (HARLEY et al, 2004).

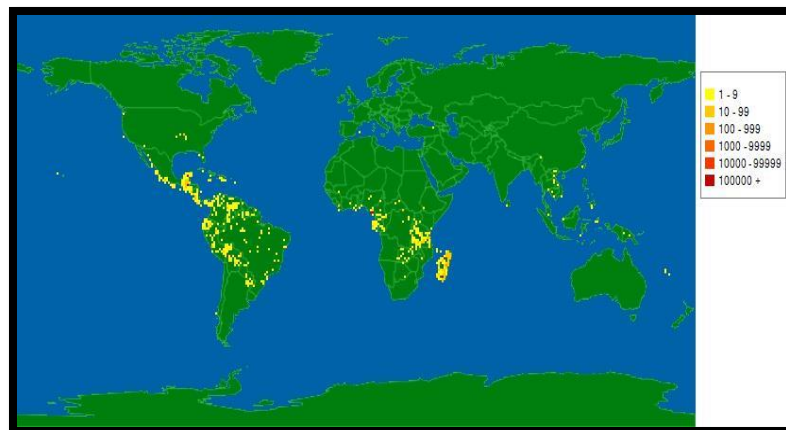


Figura 6 - Distribuição geográfica do gênero *Vitex*. Fonte: Mobot (acessível em <http://www.tropicos.org/>).

O nome *Vitex* foi usado pela primeira vez por Tournefort (1719), quando descreveu cinco espécies. Linnaeus (1753) incluiu quatro espécies neste gênero. Quase cem anos depois, Schauer (1847) publicou uma revisão global do gênero *Vitex*, no qual foi listado 59 espécies. Em sua contribuição para "Flora Brasiliensis", Schauer (1851) incluiu dez espécies de *Vitex*, e posteriormente, Moldenke (1959) reconheceu 36 espécies para o Brasil (FRANÇA, 2010).

Etimologicamente, o nome *Vitex* deriva do latim *vitilium*, ou do grego *vieo*, que significa trançado, entrelaçado, unido, uma alusão aos ramos duros, porém flexíveis, usados na construção de cercas, virgas, e ripas (MAIA et al., 2001; PLOWDEN, 1968).

2.5. Etnofarmacologia do gênero *Vitex*

Trabalhos etnofarmacológicos do gênero *Vitex* foram compilados na literatura, onde permitiu identificar o uso medicinal tradicional e pesquisas realizadas com espécies desse gênero, dentre elas: *Vitex mollis* Kunth, no qual é utilizado como analgésico e anti-inflamatório, além de ser usado para atenuar a dispesia, diarréia e disenteria (ARGUETA, et al., 1994; MEENA et al., 2011). Outras espécies de *Vitex* também são recomendados pelo uso tradicional para atenuar a diarréia e desordens gastrointestinais, tais como, *V. pyramidata* B.L Rob.; *V. pubescens* Vahl.; *V. agnus-castus* Linn.; e *V. gaumeri* Greenm. (AHMAD, 1995; BAJPAI et al., 1995). Extrato hexânico das folhas e do caule de *V. mollis* apresentou

atividade anti-inflamatória com inibição da elastase, enquanto que o extrato metanólico das suas folhas revelou grande quantidade de compostos fenólicos, os quais exibiram atividade antioxidante (MORALES-DEL-RIO et al., 2015). Dentre as espécies de *Vitex* mais estudadas, destacam-se: *V. agnus-castus* Linn., *V. negundo* Linn., *V. rotundifolia* Linn., *V. trifolia* Vahl. e a *V. doniana* Linn. Por exemplo, a espécie *V. agnus-castus* cujo frutos têm sido utilizados em distúrbios menstruais (dismenorreia, amenorreia), transtorno disfórico pré-menstrual (TDPM), insuficiência do corpo lúteo, hiperprolactinemia, infertilidade, menopausa, interrupção da lactação, dor cíclica na mama, condições inflamatórias, mastalgia cíclica, diarreia e flatulência (ONO et al., 2008; DUGOUA et al., 2008; CARMICHAEL, 2008; COSTA et al., 2007; AZARNIA et al., 2007). Estudo conduzido com extrato dos seus frutos e folhas confirmaram o uso tradicional para estimulação da lactação, no qual o estudo concluiu que o aumento da prolactina sérica esta diretamente ligada ao estímulo da lactação. Por outro lado, o extrato etanólico de suas sementes apresentou um aumento no aprendizado e memória de ratos ovariectomizadas, o estudo sugeriu que o efeito positivo do extrato na aprendizagem e memória está possivelmente associada ao aumento da expressão do gene na formação do hipocampo (ALLAHTAVAKOLI et al., 2015; AZADBAKHT et al., 2005).

No que concerna a espécie *V. negundo*, são considerados como tônico, vermífugo e são utilizadas concomitantemente com *Piper longum* L. na febre catarral maligna (FCM) em bovinos, além de ser utilizado para doenças respiratórias, tratamento de condições inflamatórias articulares e reumatismo em seres humanos na região da Asia (ZHENG et al., 2015; KHAN et al., 2015; TANDON ET AL., 2006; JIGNESH ET AL., 2009; BANSOD, 2009; ARGUETA, 1994). Na medicina tradicional chinesa as folhas têm sido utilizadas para tratar resfriado, febre, acidente vascular cerebral (AVC), e hematúria. As suas raízes e ramos são utilizados para a terapia de bronquite, malária e hepatite, enquanto que seus óleos essenciais das sementes e folhas são utilizados para o tratamento de bronquite crônica. (XIE et al, 2006; ZHANG et al, 2015). Duas polimethoxiflavonas isoladas dos frutos de *V. negundo* apresentou uma moderada citotoxicidade a linhagens de células humanas HepG2 e de ratos C6, enquanto que o extrato das suas folhas teve efeito broncodilatador em ratos (FANG et al., 2016; KHAN et al., 2015).

No que diz respeito a espécie *V. rotundifolia* seus frutos são utilizados na medicina popular para o tratamento de cefaleia, resfriado, dor ocular, desordens hormonais femininos, asma, bronquite crônica, infecções gastrointestinais e seus sintomas, tais como a disenteria bacteriana e diarreia (HU et al., 2007; ONO et al., 2001; ONO et al., 2000).

No que se refere a espécie *V. trifolia*, na medicina tradicional chinesa as suas folhas são utilizadas para tratamento de câncer, de modo que em outros países asiáticos são utilizados como analgésico, anti-inflamatório, para reumatismo, constipação e como anti-tripanosoma. Suas partes aéreas são úteis no tratamento de diabetes mellitus, enquanto que suas folhas são utilizadas como antipiréticos, analgésicos, e para promover a aprendizagem, memória e inteligência (PULLAIAH & NAIDU 2003; LI et al., 2005; KIUCHI et al., 2004; ONO et al., 2001; KIRTIKAR & BASU, 1991). Um novo diterpeno lábdano (*9-hydroxy-13(14)-labden-15,16-olide*) e um diterpeno (*isoambreinolide*) já conhecido na literatura, isolados do extrato metanólico de suas folhas mostraram atividade anti-tuberculose contra o *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv em ensaio BACTEC-460. Ao passo que, o extrato aquoso das suas folhas exibiu significativa atividade anti-amnésica em ratos. Assim como, o extrato etanólico das folhas protegeu os microsossomos hepáticos contra o ataque cancerígeno de um agente degranulatório utilizado no bioensaio do estudo, além disso, o seu extrato mostrou uma redução significativa na proliferação das linhas celulares de câncer HCT 116 e A549 (MOHANBABU et al., 2015; MATHANKUMAR et al., 2015; TIWARI et al., 2013).

A *Vitex doniana*, por sua vez, é utilizado na medicina tradicional africana no tratamento da icterícia e doença hepática relacionada, além de ser usado para o tratamento de perturbações neurológicas, incluindo a depressão. Estudo conduzido com extrato metanólico de suas folhas revelou propriedades antioxidantes e cessou o efeito oxidativo mediado por acetaminofeno em proteínas celulares, lipídios e DNA. Enquanto que, seu extrato etanólico bruto apresentou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* Rosenbach e *Bacillus subtilis* Var. assim como, o extrato de suas raízes inibiu a replicação do HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) - 1NL4. Além disso, alguns fitoecdisteroides isolados desta espécie possuem efeitos antidepressivos, interagindo com receptores

adrenérgicos, dopaminérgicos e serotoninérgicos (TIETJEN et al., 2016; ABIODUN et al., 2015; AJIBOYE, 2015; ISHOLA et al., 2014; ISHOLA et al., 2014).

Outras espécies de *Vitex* de menor representatividade em estudos etnofarmacológicos como por exemplo, *Vitex vestita* Wall. ex Schauer, apresentou que alguns diterpenoides (Vitexolide A, Vitexolide C, Vitexolins B, Acuminolide) isolados do extrato diclorometano de suas folhas possuem potente atividade bactericida e citotóxica contra a linha celular de câncer de HCT-116 e linha celular fetal de fibroblastos MRC5 do pulmão humano (CORLAY et al., 2015). Quanto a espécie *Vitex simplicifolia* Oliv. os flavonoides isolados do extrato metanólico das suas folhas apresentaram atividade tripanocida (NGOZI et al., 2015). Enquanto que, um novo flavonol éter metil isolado do extrato metanólico das folhas de *Vitex peduncularis* Wall, exibiu um potente efeito leishmanicida, comparado ao padrão antimonigluconato de sódio, fármaco de referência utilizado no tratamento leishmanicida (RUDRAPAUL et al., 2014). Um fitoecdisteroide (*tetra-acetilajugasterone*) encontrado em *Vitex cienkowskii* Kotschy & Peyr. apresentou efeito vasodilatador em ratos (DONGMO et al., 2014). Estudo utilizando *Vitex honey* L. revelou potente atividade antioxidante devido a grande quantidade de compostos fenólicos presente, além de exibir hepatoproteção contra lesão hepática induzida por paracetamol (WANG et al., 2015).

2.6. Potenciais compostos de ação inseticida do Gênero *Vitex*.

Levantamento na literatura envolvendo atividade biológica inseticida e repelente com o gênero *Vitex* permitiu identificar que muitas espécies desse gênero possuem atividade inseticida e repelente (**Tabela 1**).

Tabela 1- Espécies de *Vitex* e suas respectivas atividades inseticida e repelente.

Espécies	Parte e fração da planta	Atividade inseticida	Referências
<i>V. negundo</i>	Extrato etanólico das folhas;	Contra <i>Hyalomma anatolicum</i> Koch (Resistente a Deltametrina), <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (Resistente a piretroides)	(SINGH et al., 2014a); (SINGH et al., 2014b)
	Flavonoides extraídos da fração éter etílico e acetato de etila (folhas, raízes e flores);	Contra larvas do final do III e início do IV estágio de <i>Aedes aegypti</i> Linn. e larvas de <i>Anopheles stephensi</i> Liston (vetor da malária na Índia)	(GAUTAM, 2013)
	Extrato hexânico das folhas;	Contra larvas de <i>Culex tritaeniorhynchus</i> Giles e contra larvas <i>Anopheles subpictus</i> Grassi (vetor da malária)	(KAMARAJ, et al., 2009)
	Extrato de éter de petróleo;	Contra larvas <i>Culex tritaeniorhynchus</i> Giles (vetor da encefalite japonesa) e repelência por um período de 6 horas ao mosquito adulto	(KARUNAMOORTHY, 2008)
	Frações mais polares do óleo essencial	Repelência no período de 1-3 horas contra <i>Aedes aegypti</i> Linn.	(HEBBALKAR et al., 1992)
<i>V. grandifolia</i> Gürke	Frações hexânicas e clorofórmicas	Contra larvas do III e IV estágio de <i>Anopheles gambiae</i> Giles (vetor da malária na África)	(AZOKOU, 2013)
<i>V. pseudo-negundo</i> Linn.	Óleo essencial das folhas	Contra ovos, larvas e adultos de <i>Callosobruchus maculatus</i> Fabr. (Caruncho-do-feijão)	(SAHAF, 2008)
<i>V. trifolia</i> e <i>V. agnus-castus</i>	Óleo essencial das folhas;	Contra larvas, adultos de <i>Spilosoma obliqua</i> Walker;	(TANDON, 2008);
<i>V. agnus-castus</i>	Extrato das sementes	Repelência por 6 horas contra <i>Ixodes ricinus</i> L. e <i>Rhipicephalus sanguineus</i> Latreille, (carrapatos em animais e seres humanos)	(MEHLHORN, 2005)
<i>V. mollis</i>	Extrato clorofórmico e metanólico das folhas	Contra lagartas <i>Spodoptera frugiperda</i> J.E. Smith. (Praga de milho)	(RODRÍGUEZ-LÓPEZ et al., 2007)

Algumas espécies de *Vitex* também produzem óleos essenciais (**Tabela 2**), com compostos da classe dos monoterpenos: 1,8-cineol, sabineno, α -pineno, α -terpineol, limoneno, e sesquiterpenos como β -cariofileno, óxido de cariofileno, trans- β -farneseno, trans-cariofileno, germacreno D (DUYMUS et al., 2014; MOHAMED, 2014; TOPLAN, 2015; ERYIGIT, 2015; KHALILZADEH et al., 2015). Alguns destes compostos têm revelado atividade inseticida e acaricida (WANG et al., 2013; IBRAHIM et al., 2014; TRABOULS et al., 2014).

Tabela 2 - Espécies de *Vitex* e seus principais compostos encontrados na composição dos óleos essenciais

Espécies de Vitex	Compostos Majoritários	Referências
<i>Vitex agnus-castus</i>	1,8-cineol (22%) <i>trans</i> - β -farneseno (9.4%) α -pineno (9.4%)	(STOJKOVIC, 2011)
	1,8-cineol (22.4%) sabineno (16.9%)	(DUYMUS, 2014)
	<i>trans</i> -cariofileno (15.2%) 1,8-cineol (13.0%)	(MOHAMED, 2014)
	sabineno (19.8%) 1,8-cineol (18.4%)	(NTALLI, 2012)
	1,8-cineol (25.0%) sabineno (13.5%)	(SARIKURKCU, 2009)
	β -cariofileno (11%) α -pineno (10%)	(TOPLAN, 2015)
	<i>trans</i> -cariofileno (19.2%) sabineno (18.1%) 1,8-cineol (16.1%)	(ERYIGIT, 2015)
	α -pineno (14.8%) limoneno (10.3%)	(KHALILZADEH, 2015)
<i>Vitex negundo</i>	Óxido cariofileno (24.9%) n-hexadecano (12.5%) α -terpinil acetato (11.6%)	(GHANNADI, 2012)
	sabineno (19.0%) cariofileno (18.3%) eremofileno (12.8%)	(HUEY-CHUN, 2012)
<i>Vitex pseudo-negundo</i>	β -cariofileno (23.3%) 1,8-cineol (11.9%)	(TANG, 2011)
	1,8-cineol (18.2%) α -pineno (16.2%)	(SAHAF, 2008)
<i>V. diversifolia</i>	α -pineno (35.9%) limoneno (12.2%) bicyclogermacreno (14.5%)	(HADJMOHAMMADI, 2006)
	limoneno (74.2%)	(NEBIE, 2005)
<i>Vitex quinata</i>	β -pineno (30.1%) β -cariofileno (26.9%)	(DAI, 2015)
<i>Vitex doniana</i>	β -felandreno (31.3%) phytol (28.3%) β -caryophyllene (12.6%)	(SONIBARE, 2009)
<i>Vitex megapotâmica</i>	butylated hydroxytoluene (34.2%) phytol (12.7%) α -cariofileno (11.8%)	(DE BRUM, 2013)
<i>Vitex pooara</i>	limoneno (19.4%) β -selineno (14.4%) cryptono (10.1%)	(NYILIGIRA, 2004)

Estudo conduzido com o composto β -cariofileno e alguns de seus análogos apresentou atividade contra os ácaros *Dermatophagoides farinae* Hughes e *D. pteronyssinus* Trouessart, estes ácaros estão presentes na poeira intradomiciliar, sendo considerados os principais agentes etiológicos da alergia respiratória no Brasil (MIN-SEOK, 2014). O composto 1,8-cineol (eucaliptol) encontrado nos óleos essenciais de algumas espécies de *Vitex*, apresentou atividade contra o *Musca domestica* Linn. (ROSSI, 2015). Ácidos graxos, tais como, ácido linoleico e oleico, ácido palmítico, ácido esteárico e ácido láurico encontrados nos extratos de *Vitex altíssima* L.f.; *V. negundo* e *V. trifolia* apresentaram atividade contra larvas de *Culex quiquenfascitus* Say no início do quarto estágio de desenvolvimento (KANNATHASAN et al., 2008).

Além dos terpenoides encontrados nos óleos voláteis de *Vitex*, alguns compostos de média polaridade como os ecdisteroides são amplamente encontrados no gênero *Vitex*, que juntamente com os iridoides foi proposto como marcadores químicos para o gênero (SENA FILHO et al., 2008).

2.7. *Vitex megapotamica*, *Vitex gardneriana*, *Vitex Capitata* e *Vitex rufescens*

2.7.1. *Vitex megapotamica* (Spreng.) Moldenke

Vitex megapotamica (Spreng.) Moldenke (Lamiaceae), espécie com ampla distribuição, ocorrendo também em Goiás, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Paraná, Piauí, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo, além disso, pode ser encontrada no nordeste da Argentina, leste do Paraguai e no Uruguai (LIMA & FRANÇA 2009; CARDOSO, 2004). Conhecida popularmente como tarumã, azeitona do mato, azeitona do chão. Na medicina popular a infusão das folhas desta espécie é utilizada para o tratamento de hipertensão, diuréticos, e anti-inflamatória (ALICE et al., 1995; CORREA, 1984).

Árvore com 3,5m de altura. Ramo glabro (**Figura 7a**). Folíolos 3-5, limbo do folíolo central membranáceo, 5,0-9,0 cm x 2,0-3,5 cm, elíptica ápice atenuado ou acuminado, margem inteira, base cuneada, concolor, face adaxial pubérula ou glabrescente, alva a acinzentada, face abaxial longo lanuginosa, alva a

acinzentada; peciólulo com 3,0-7,0 mm; pecíolo com 38-60 mm. Sinflorescência indeterminada; inflorescências formando dicásios, prófilos inconspícuos, pedúnculo com 50-60 mm. Cálice com 2,5-3,0 mm, bordo curto, corola azul ou lilás (**Figura 7b**), com 9,0-11,0 mm, externamente e internamente hirsutulo (**Figura 7c**). Estames emergindo do terço mediano da corola; filete piloso basalmente e hirsutulo, com 6,0-7,0 mm filete maior e filete menor 4,5-5,0 mm; antera dorsifixa, com 1,1-1,2 mm, cilíndricas. Ovário glabro, pubescente no ápice; estilete glabro, com 4,5-5,5 mm. Fruto com 10 mm de comprimento. (LIMA & FRANÇA, 2009).

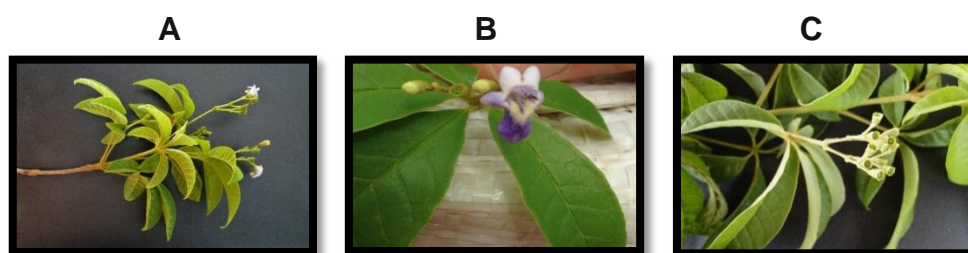


Figura 7 - (A) Ramo, (B) Inflorescência e flor de *Vitex megapotamica* (Spreng.) Moldenke (C) Fotos: Ighor Barreto

Estudos anteriores tem mostrado que esta espécie possui compostos de interesse farmacológico, como o relato do isolamento de pterosteron, polipodin B, fitoecdisonas e *ecdysonatiges* e iridóides (Rimpler, 1972; 1969), além da presença de antocianinas, taninos, as catequinas, flavonoides, xantonas, triterpenos esteroidais, glicosídeos cardiotônicos, cumarinas, ácidos orgânicos, polifenóis e alcaloides (BRUM et al., 2011; BRANDT et al, 2009; HORN, 2008) Recentemente, a composição química do óleo essencial das folhas foi identificado, e demonstraram a sua atividade antioxidante (DE BRUM, 2013). Poucos estudos farmacológicos e toxicológicos foram realizados com esta espécie. A fração acetato de etila e n-butanol de *V. megapotamica* produziu um efeito hipoglicêmico em ratos (ZANATTA et al, 2007).

O extrato etanólico e decocção obtido a partir de suas folhas demonstraram efeito hipolipidêmico pela diminuição dos níveis de colesterol sérico e triacilglicéridos em ratos (BRANDT et al, 2009). Além disso, dois ensaios preliminares toxicológicos não mostraram nenhuma atividade mutagênica ou danos em tecidos hepáticos e cardíaco, bem como na fisiologia renal (HORN, 2008). Estudo mais recente relatou que o extrato metanólico foi capaz de impedir aumento

na pressão arterial sanguínea, colesterol total, triglicérides, índice de soro aterogênico, níveis de uréia e creatinina em camundongos C57BL/6LDLr, submetidos a dieta rica em gordura por três semanas. Além disso, todos esses efeitos foram acompanhados por uma redução significativa no estresse oxidativo e lesão renal (ARAÚJO et al., 2015).

2.7.2. *Vitex gardneriana* Schauer

Vitex gardneriana Schauer espécie aparentemente restrita ao bioma da caatinga, encontrada as margens ou leitos dos rios, como na ribanceira do rio Espinharas, na Paraíba, as margens do rio Moxoto em Pernambuco, rio curaçá na Bahia, Taperuaba no Ceará, e no estado de Sergipe e Alagoas (LIMA & FRANÇA, 2009; DE SÁ BARRETO et al., 2005). Conhecido popularmente como jaramataia, jerematia, girimato, tamanca ou tamanqueira, na medicina popular, o preparo de chá é feito com caule para ser usado como calmante e abortivo (DE SÁ BARRETO et al., 2005).

Árvore com 4m de altura. Caule e ramo subcilíndrico. Ramo curto setoso-viloso, denso setoso. Folhas unifolioladas. Folíolo limbo do folíolo central membranáceo, 1,7-12,7 cm x 0,8-3,5 cm, espatulado, oblongo ou oboval coriáceo não reflexo, ápice arredondado, obtuso, acuminado ou agudo, às vezes com pequeno denticulo, acúmen curto margem inteira, às vezes com alguns dentes na região distal, base arredondada, aguda ou obtusa. Face adaxial esparso a presso setosoviloso na lâmina e viloso na nervura principal ou glabrescente: indumento viloso na nervura principal e tricomas crespos esparsos na lâmina. Face abaxial vilosa, com nervuras muito proeminente formando células profundas. Pecíolo (Peciólulo + Pecíolo): 5,0-18,0mm. Sinflorescência indeterminada sem formação de tirsóide secundário Inflorescências paucifloras congestas, prófilos inconspícuos, pedúnculo da cima com 10mm (**Figura 8**). Cálice 4,0-7,0mm, bordos lobados. Corola vermelho-azuladas ou violáceas vilosa cupuliforme, com 15,0mm. Estames emergindo do terço mediano da corola; filete seríceo basalmente, com 9,0-13,0 mm e filete menor 7,0-9,0mm; antera basifixa, com 0,9-1,1 mm, cilíndricas. Ovário pubescente no ápice, estilete glabro, com 10,0 -12,0 mm. Fruto com 15,0mm X 9,0mm, glabro. Semente não vista (FRANÇA, 2009).



Figura 8 - Flor da *Vitex gardneriana* Schauer. Foto: Dr. José Guedes de Sena Filho

Há pouquíssimos estudos fitoquímicos e farmacológicos com a espécie *V. gardneriana*. Um estudo antigo evidenciou que o extrato etanólico da casca do caule possui uma ação estimulante na musculatura uterina de ratos, abdominal de sapos e íleos de cobaias, sem mostrar atividade depressora na respiração e pressão sanguínea de gatos, além de não apresentar toxicidade para ratos e peixes (BARROS, 1970). Há relato da presença de iridóides (aucubina) e ecdisteroides (20-hidroxiecdisona) nas cascas do caule de *V. gardneriana* (DE SÁ BARRETO et al., 2005). Pesquisa utilizando solução aquosa do extrato bruto não apresentou toxicidade aguda em camundongos nem por administração oral, nem intraperitoneal, no entanto, houve um potente efeito anti-edematogênico, antinociceptivo e hipnótico (DE SÁ BARRETO et al., 2008). Pesquisa mais recente exibiu atividade antioxidante com os extratos aquoso e etanólico, porém, somente o extrato etanólico apresentou atividade larvicida contra o *Aedes aegypti* (MONTEIRO et al., 2015).

2.7.3. *Vitex capitata* Vahl.

Vitex capitata Vahl ocorre nos estados da Bahia, do Amazonas, Maranhão, Minas Gerais, Roraima e Tocantins. Não há informações sobre o uso popular desta espécie, bem como dados na literatura a respeito de estudo fitoquímico e farmacológicos.

Árvore com 4m de altura. Caule e ramo subcilíndrico. Ramo pubérulo acinzentado-ferrugíneo (**Figura 9a**). Folíolos 5, limbo do folíolo central lanceolado cartáceo a coriáceo, não reflexo, 8,0-10,0cm X 2,0-2,5cm, ápice acuminado, acúmen arredondado e longa margem inteira base decurrente, levemente discolor face adaxial glabra, face abaxial glabra. Pecíolulo 4mm compr., pecíolo 4,0-4,5mm.

Sinflorescência indeterminada; inflorescência multifloras congestas, prófilos inconspícuos, pedúnculo da inflorescência 90-100 mm de comprimento (**Figura 9b e 9c**). Cálice 3-4mm comprimento, subtruncado. Corola azul, c. 8,0-15,0mm de comprimento. tomentosa externamente. Estames exsertos, emergindo do terço mediano da corola; filete piloso basalmente, ca. 7,0- 10,0mm filete maior e filete menor 6,0-8,0 mm; antera dorsifixa, com 0,9-1,0 mm, cilíndricas. Ovário glabro, estilete glabro, com 8,0-9,5 mm. Fruto e sementes não vistos (LIMA & FRANÇA, 2009).



Figura 9 - Ramo (A); inflorescência (B); e flor de *Vitex capitata* Vahl. (C). Foto: Ighor Barreto

2.7.4. *Vitex rufescens* A. Juss.

Vitex rufescens A. Juss. ocorre em Alagoas, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Pará, Pernambuco, São Paulo e Sergipe. Não há informações sobre o uso popular desta espécie, bem como dados na literatura a respeito de estudo fitoquímico e farmacológicos.

Árvore possui 10m de altura (**Figura 10b**). Caule e ramo quadrangular (**Figura 10a**). Ramo piloso, ferrugíneo. 3 Folíolos, limbo do folíolo central cartáceo, 7,0-11 cm x 2,5-6,0 cm, oboval, ápice atenuado ou acuminado, margem inteira, base cuneada, fortemente discolor, face adaxial pilosulosa fortemente ferrugínea, face abaxial pilosa ferrugínea a castanha; peciólulo com 1,5-2,0 mm; pecíolo com 43-70 mm. Sinflorescência indeterminada, inflorescências formando dicásios, prófilos conspícuos, pedúnculo da cima ca. 1,5-3,0 mm. Cálice com 9,0-13,0 mm, bordo lobado, Corolaroxa, com 20-24 mm, pubescente externamente e internamente. Estames emergindo no terço distal da corola; filete piloso basalmente e hirsutulo, 12,0-16,0 mm filete maior e filete menor ca. 8,0-13,0 mm; antera dorsifixa, com 1,0-1,2 mm, cilíndrico. Ovário pubescente, piloso no ápice, estilete

pubescente, com 19 mm. Fruto com 10 mm comprimento. Semente não vista (LIMA & FRANÇA, 2009).



Figura 10 - (A) Ramo com fruto; (B) Árvore da *Vitex rufescens* A. Juss. Foto: Dr. José Guedes de Sena Filho

2.8. Marcadores moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os marcadores moleculares são marcas que estão presentes ao longo do DNA mitocondrial e nuclear, que revelam as variações genéticas existentes entre os indivíduos, podendo indicar o nível de distanciamento genético dos mesmos (HILSDORF, 2011). O termo marcador molecular é definido como todo e qualquer fenótipo molecular proveniente da expressão de um gene, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA correspondente a regiões expressas ou não do genoma. Os marcadores de DNA se baseiam fundamentalmente nas análises das diferenças em pequenas sequências do DNA entre indivíduos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Os recentes avanços na biologia molecular introduziram uma nova geração de marcadores para facilitar a investigação a nível genômico de espécies vegetais com mais facilidade, eficiência e rapidez. Os marcadores baseados em DNA são ferramentas versáteis que têm um número de vantagens sobre os marcadores fenotípicos convencionais, como por exemplo, os marcadores morfológicos e bioquímicos. (TOPPA & JADOSKI, 2013). São menos influenciados por fatores ambientais, são fenotipicamente neutros, geram um número praticamente ilimitado de polimorfismo genético, são aplicáveis em qualquer estágio de desenvolvimento, possibilitam a identificação correta de variedade sem necessitar de muitos caracteres, além de serem desprovidos dos efeitos epistáticos (FALEIRO, 2007).

A depender do método que for utilizado para identificação, os marcadores podem ser classificados em dois grupos: marcadores baseados em hibridização e marcadores baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) (MILACH, 1998). Os marcadores baseados em PCR, vem sendo a mais utilizada, no qual se baseia na síntese de varias cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA-polimerase. Na reação de PCR ocorre a desnaturação da fita dupla com a elevação da temperatura (92° a 95°C); o anelamento dos iniciadores (primers) a uma temperatura reduzida (35° a 65°C); a partir de cada terminação 3' ocorre a extensão da fita de DNA. A temperatura se eleva até 72°C para que a enzima DNA polimerase atue. Esta extensão utiliza como molde a sequência alvo. Este ciclo é repetido dezenas de vezes, assim, a amplificação segue uma progressão exponencial e após 20 ciclos tem-se até um milhão de vezes a quantidade inicial da sequência alvo. Os fragmentos amplificados são separados electroforicamente em géis de poliacrilamida ou géis de agarose e os padrões de bandas são detectados por coloração ou por autorradiografia. (PEPINELI et al., 2014; MARCELINO et al., 2007; CORTES et al., 2004; SAMBROOK et al. 1989).

Dentre os marcadores baseados em PCR, podemos citar: o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) que significa polimorfismo do DNA amplificado ao acaso, o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), ou seja, polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados, o SSR (*simple sequence repeats microsatellites*) que se baseia em sequências simples repetitivas ou microssatélites e o ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) que são sequências simples repetidas entre dois microssatélites (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; RODRIGUES et al., 2007; BARAKAT et al., 2010). Todos estes, representam a principal classe de marcadores em estudos genéticos de plantas, devido à sua grande utilidade e exploração (MALIK et al., 2014).

Cada um destes marcadores tem suas vantagens e desvantagens. Os marcadores moleculares de natureza codominante apresentam certa vantagem em relação aos marcadores de natureza dominante. Marcadores microssatélites como SSR são co-dominantes na natureza, sendo mais informativos, assim, podem detectar variabilidade genética a nível alélico, diferenciando genotipo homocigoto de heterocigotos. Contudo, o desenvolvimento e a utilização destes sistemas são caros, laborioso e gasta muito tempo. (VIJAYAN, 2005). Por outro lado, RAPD,

ISSR e AFLP são sistemas marcadores dominantes, sendo que os dois primeiros tornaram-se populares em estudos genéticos nos últimos anos, devido ao vasto número de locos que podem ser examinados, devido a sua natureza hipervariável, o baixo custo, menos dispendioso, precisa de pequena quantidade de material usado (KREMER et al., 2005).

Assim, ao seleccionar um sistema de marcadores adequado, uma série de fatores como a disponibilidade de equipamentos, o tempo, os conhecimentos necessários, bem como a natureza da cultura, devem ser levado em conta (FALEIRO, 2007).

2.9. Marcadores ISSR

A técnica de ISSR baseada em PCR foi relatada por Zietkiewicz et al. (1994), que envolve a amplificação de segmentos de DNA entre duas regiões idênticas de repetição de microssatélites orientadas em sentido oposto utilizando iniciadores concebidos a partir de regiões nucleares de microssatélites (VIJAYAN, 2005). A técnica utiliza iniciadores (primers) microssatélites, normalmente 16-25 pares de bases (pb), de repetições di, tri, tetra ou penta-nucleotide para alvejar múltiplos loci genômicos (REDDY et al., 2002). Assim, os microssatélites amplificam segmentos do genoma que estão amplamente distribuídos ao longo do DNA (GE et al., 2005).

Os iniciadores ISSR geram polimorfismo sempre que um genoma perde a repetição da sequência ou tem uma deleção ou inserção ou translocação que modifica a distância entre as repetições. Normalmente, as repetições de dinucleótidos ancoradas em 3' ou 5' revelam alto polimorfismo (BRITO, 2016; JOSHI et al., 2000). Os iniciadores ancorados na extremidade 3' fornecem um padrão de faixas mais claro quando comparado aos ancorados na extremidade 5' (BLAIR et al., 1999; NAGAOKA & OGIHARA, 1997). Em geral, iniciador com repetições de (AG), (GA), (CT), (TC), (AC), (CA) mostram maior polimorfismo do que aqueles com repetições (AT), já que os iniciadores com repetições (AT) tendem a ser autoanelamento (VIJAYAN, 2005).

Os marcadores ISSR têm muitas vantagens sobre outros sistemas de marcadores, além de ser uma técnica simples, rápida e menos dispendiosa, o

desenvolvimento de marcadores ISSR não necessita de conhecimento prévio do genoma a ser analisado (BORGES, 2015).

3. OBJETIVO GERAL

Realizar uma caracterização química e molecular de quatro espécies de *Vitex* (Lamiaceae) e avaliar a bioatividade contra o ácaro-da-necrose-do-coqueiro *Aceria guerreronis* Keifer (Acari: Eriophyidae)

3.1. Objetivos específicos

- Extrair os óleos essenciais utilizando técnica de hidrodestilação (Clevenger).
- Identificar a composição dos óleos essenciais das espécies *V. gardenriana*, *V. capitata*, *V. megapotamica* e *V. rufescens*.
- Averiguar a similaridade genética e variabilidade químicas das quatro espécies de *Vitex*.
- Agrupar as espécies por *Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages (UPGMA)*.
- Determinar a atividade acaricida e de repelência dos óleos essenciais.
- Determinar as concentrações letais (CL₅₀) dos óleos essenciais ao ácaro-da-necrose.

4. METODOLOGIA

4.1. Coleta do material vegetal

Amostras de *V. capitata*, *V. megapotamica* foram coletadas no município de Vitória da Conquista–BA, onde possui um clima tropical de altitude, vegetação do tipo carrasco, solo arenoso. Ao passo que as espécies de *V. gardenriana* e *V. rufescens* foram coletadas no município de Patos-PB e Santana de São Francisco-SE, respectivamente. Sendo que a primeira possui um clima semi-árido, vegetação do tipo caatinga e solo raso e pedregoso, enquanto que a outra possui um clima megatérmico seco a sub-úmido, vegetação de cerrado e solo do tipo podzólico vermelho amarelo. As amostras foram identificadas pelo Professor Dr. Avaldo

Soares Filho e depositadas no Herbário da Universidade do Sudoeste da Bahia de Vitória da Conquista–HUESBVC sob registro 8194 (*V. capitata*), 8195 (*V. megapotamica*) and 8126 (*V. gardneriana*), enquanto que a espécie *V. rufescens* foi depositada no herbário da Universidade Federal de Sergipe–ASE sob registro 38352.

4.2. Obtenção dos óleos essenciais

Partes aéreas coletadas na época de floração de *V. capitata*, *V. megapotamica*, *V. gardenriana* e *V. rufescens* foram pulverizadas para diminuição da área superficial de contato e submetidas a extração por hidrodestilação, utilizando aparelhagem do tipo Clevenger modificado, pelo período de três horas e armazenado em freezer para análises posteriores em CG/EM.

4.3. Análise por GC/EM dos óleos essenciais

A análise qualitativa dos constituintes químicos dos óleos essenciais foram realizadas em equipamento de cromatografia em fase gasosa/espectrômetro de massas da marca Shimadzu modelo QP2010ultra, contendo uma coluna capilar de sílica fundida Agilent J&W Scientific DB-5MS (30m x 0,25mm d.i. x 0,25µm espessura da fase) composta por 5%-fenil-95%-dimetilpolissiloxano; gás de arraste hélio (99.999%) com fluxo constante de 1,0 mL.min⁻¹; e a temperatura foi programada para manter o forno a 60°C por 4 min, seguido de um aumento de 3°C.min⁻¹ até atingir a temperatura de 220°C. O volume de injeção foi de 1,5µL da amostra solubilizada em diclorometano (CH₂Cl₂). A temperatura do injetor e detector foram de 250°C e 280°C, respectivamente. A obtenção dos espectros de massas foram feita no modo ionização por elétrons a 70 eV com um intervalo de 0,5s e fragmentos de 40 a 550Da.

Os índices de retenção foram obtidos injetando-se uma mistura de hidrocarbonetos lineares (C₉-C₃₀) e a identificação dos compostos foram feita com base nos índices de retenção (VAN DEN DOOL e KRATZ, 1963) e na comparação computadorizada dos espectros de massas adquiridos com aqueles armazenados no banco de dados de espectros de massas do sistema CG/EM (NIST107 e NIST21; WILEY), juntamente com espectros de massas da literatura (ADAMS,

2007). O percentual de cada componente no óleo foi determinado dividindo-se a área de cada componente pela área total de todos os picos que foram detectados sob as mesmas condições sem correção do fator de resposta.

4.4. Extração de DNA

Para a extração do DNA genômico foi utilizado o método CTAB 2% (DOYLE E DOYLE, 1987) com modificações, no qual cerca de 300 mg de folha de cada amostra de espécie de *Vitex*, foi macerada em almofariz, e acrescentou-se nitrogênio líquido, macerando com o pistilo até obter-se um pó fino; adicionou-se ao pó obtido 1000 µl de tampão de extração (2% de CTAB - brometo de cetil trimetil amônio, EDTA – 0,5 M pH 8,0; Tris-Cl - 1 M pH 8,0; NaCl 5 M; e 2% de PVP) pré-aquecida, homogeneizando ainda no almofariz com auxílio do pistilo e transferindo-se a mistura para o microtubo de 2ml que continha a solução de extração CTAB; colocam-se os tubos numa caixa térmica com gelo até completar todas as extrações das amostras, em seguida transferiram-se todas as amostras ao mesmo tempo para o banho-maria a 65°C, deixando por 60 minutos; adicionou-se 800 µL de solução 24:1 de clorofórmio:álcool isoamílico em cada microtubo de 2 ml, homogeneizando as amostras com leves inversões por 2 minutos.

As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 13500 rpm; a fase superior foi transferida para um novo microtubo e adicionou-se 500 mL de isopropanol gelado (-20°C), homogeneizando as amostras com leves inversões até mistura de fases. Posteriormente, as amostras foram incubadas de um dia para o outro no freezer a temperatura de -20°C. Centrifugaram-se as amostras por 5 minutos a 13500 rpm; descartou-se o isopropanol de cada amostra; lavou-se o *pellet* com adição de 450 µL de solução de etanol 70% e centrifugou-se por 5 minutos a 13000 rpm. Descartou-se o isopropanol de cada amostra; lavou-se o *pellet* com adição de 450 µl de solução de etanol 70% e centrifugou-se por 5 minutos a 13000 rpm. Eliminou-se o sobrenadante de cada amostra, etanol 70%, e repetiu-se o procedimento anterior; o *pellet* foi seco em temperatura ambiente (23°C) por volta de 5 horas e posteriormente, foi suspenso com 60 µl de solução de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0:EDTA 1 mM); agitou-se a mistura para dissolução

do DNA da solução. As amostras foram condicionadas na geladeira (4° a 10°C) por 1 hora.

4.5. Quantificação e diluição do DNA

Para a quantificação do DNA foi utilizado um espectrofotômetro (Thermo Scientific NANODROP 2000c) nas faixas de 260 e 280 nm. Sua pureza foi calculada através da relação OD260/OD280. A avaliação da qualidade do DNA foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose (0,8%, m/v) e visualizado em equipamento de fotodocumentação Gel doc L-pix HE (Loccus Biotecnologia, Brasil).

As amostras quantificadas foram diluídas em TE [(Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM)], quando necessário, para a concentração de 25 ng.µL⁻¹ e armazenadas a -20°C para subsequente uso nas reações de ISSR.

4.6. Inter Sequências Simples Repetida (ISSR)

Foram utilizados 14 iniciadores ISSR da marca UBC (*University of British Columbia*) (**Tabela 3**) para amplificação em PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em termociclador (Veriti 96 Well Thermal Cycler Applied Biosystems®).

Tabela 3 - Iniciadores ISSR utilizados neste estudo, sendo a base Y (C,T) e R (A,G).

Iniciadores	Sequência (5' > 3')	Temperatura de anealamento (Ta)
UBC 809	AGA GAG AGA GAG AGA GG	57,2°C
UBC 818	CAC ACA CAC ACA CAC AG	57,2°C
UBC 823	TCT CTC TCT CTC TCT CC	57,2°C
UBC 826	ACA CAC ACA CAC ACA CC	57,2°C
UBC 842	GAG AGA GAG AGA GAG AYG	58,8°C
UBC 843	CTC TCT CTC TCT CTC TRA	56,5°C
UBC 845	CTC TCT CTC TCT CTC TRG	58,8°C
UBC 848	CAC ACA CAC ACA CAC CRG	58,8°C
UBC 855	ACA CAC ACA CAC ACA CYT	56,5°C
UBC 856	ACA CAC ACA CAC ACA CYA	56,5°C
UBC 857	ACA CAC ACA CAC ACY G	58,8°C
UBC 858	TGT GTG TGT GTG TGT GRT	56,5°C
UBC 888	BDB CAC ACA CAC ACA CA	56,5°C
UBC 890	VHV GTG TGT GTG TGT GT	56,5°C

O volume total para cada reação de PCR foi de 20 µL contendo: 1 µL da solução de DNA genômico, 1 µL de cada iniciador, juntamente com um mix composto de 2 µL de tampão PCR 10X; 0,4 µL de dNTP (10mM); 2 µL de Buffer (50mM); 0,2 µL de Taq DNApolimerase (5U/µL) da marca Neotaq e 14,4 µL de água ultra-pura. Em seguida, o material foi levado ao termociclador, e as amostras foram submetidas à desnaturação a 95°C por cinco minutos, seguidas por 45 ciclos de amplificação. A cada ciclo, as amostras sofreram em cadeia a desnaturação a 94°C por um minuto, anelamento a diferentes temperaturas por 45s e, finalmente, extensão a 72°C por dois minutos.

4.7. Eletroforese, visualização e fotodocumentação dos géis

Em cada microtubo contendo 20µL de DNA amplificado, foram adicionados 2µL de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,01%; glicerol 40%). Desta mistura, 17µL foram dispostos nas canaletas do gel de agarose 2% (dissolvido em TBE 1X – Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,3) e submetidos a eletroforese horizontal, em tensão de 200 V, 200 mA, potência de 100 W por aproximadamente duas horas e trinta e cinco minutos.

Após a eletroforese, os géis foram corados em solução contendo brometo de etídio (0,02 µL/mL de água) por aproximadamente 60 minutos para visualização sob luz ultravioleta. Para a mensuração do padrão de bandeamento foi utilizado o marcador de peso molecular de 1 Kb, (Promega, Madison, South Dakota, EUA). A visualização dos resultados foi realizada em equipamento de fotodocumentação dos géis foi feita no equipamento Loccus L-pix HE (Loccus Biotecnologia, Brasil).

4.8. Análises estatísticas

O perfil eletroforético de cada gel de ISSR foi transformado em uma matriz binária, sendo a presença do fragmento representada por 1 e ausência representada por 0. A matriz binária foi usada para a obtenção das estimativas de similaridade genéticas (S_{gij}), empregando-se o coeficiente de Jaccard (Jaccard, 1908), para os genótipos, por meio da expressão: $S_{gij} = a/a+b+c$ que formou variáveis que foram obtidas conforme o seguinte esquema (**Tabela 4**):

Tabela 4 - Esquema para obtenção das variáveis obtidas através da matriz binária para obtenção da similaridade genética utilizando o coeficiente de Jacard.

		Genótipo <i>i</i>	
		1	0
Genótipo <i>j</i>	1	a (1,1)	b (1,0)
	0	c (0,1)	d (0,0)

Onde:

a= presença de bandas em ambos os genótipos;

b= presença de banda no primeiro genótipo e ausência no segundo;

c= presença no segundo e ausência no primeiro;

d= ausência em ambos os genótipos.

Com base na matriz genética de Jacard, foi empregado o algoritmo de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*) (SOKAL & MICHENER, 1958). Para avaliar a coesibilidade dos agrupamentos, foi utilizado o método bootstrap com 100.000 repetições. A análise de similaridade genética foi realizada utilizando o *software* FreeTree e TreeView (PAVLICEK et al., 1999; PAGE, 1996) para gerar o dendrograma.

A mesma análise estatística foi realizada para atribuir a análise de cluster à compreensão da diversidade de quatro espécies de *Vitex* com base em componentes de óleo essencial e os resultados genéticos. Para realizar a análise foi realizada a seleção dos compostos com porcentagem maior que 0,1%, e formado uma única matriz binária com base na presença ou ausência de constituintes no óleo e fragmentos amplificados.

4.9. Teste de toxicidade para o *Aceria guerreronis*.

Bioensaios de concentração-mortalidade (toxicidade) foram realizados para estimar as concentrações letais (CLs) dos óleos das quatro espécies de *Vitex* utilizando adultos de *A. guerreronis*. Um teste preliminar foi realizado para determinar qual a maior e menor concentração capaz de matar 100% e 0%, respectivamente, do ácaro. Em seguida, quatro concentrações dentro desta faixa

foram utilizadas para estimar os valores da concentração letal. Os óleos foram pulverizados sobre os discos (1 cm de diâmetro) de frutos jovens colocados em placas de Petri contendo ágar. Pulverização dos óleos foram realizadas a uma pressão de 34 kPa (0,34 bar) com uma taxa de pulverização de 9,3 ml usando um dispositivo Torre de Potter (Burkard, Reino Unido). Discos controle foram pulverizados com acetona. Antes da pulverização 20 adultos de *A. guerreronis* foram colocadas sobre cada disco. Foram utilizadas oito repetições (discos) para cada concentração. A mortalidade do ácaro foi avaliada após 24 horas de exposição e curvas de concentração-mortalidade foram estimados por análise Probit usando procedimento PROC PROBIT (SAS, 2002). A razão de verossimilhança foi aplicada qui-quadrado do *goodness-of-fit* para avaliar se os dados foram adequadamente conformados com modelo PROBIT (ROBERTSON, 2007).

4.10. Teste de repelência para o *Aceria guerreronis*.

As CL₅₀ e CL₉₉ dos óleos essenciais das quatro espécies de *Vitex*, previamente determinadas nos teste de toxicidade, foram utilizadas como parâmetro para a realização do ensaio de repelência. As CLs foram pulverizadas através de uma torre de Potter, de acordo com a descrição citada no teste de toxicidade. Apenas metade dos discos (conforme descrito anteriormente) foram pulverizadas, no qual foi coberto metade do disco com uma fita. Os discos foram deixados para secar durante 20 minutos. Logo após um adulto de *A. guerreronis* foi colocado sobre o centro de cada disco e a sua posição foi registrada após 1 e 24 horas. As repetições foram conduzidos para cada CL e cada repetição foi constituída de 20 ácaros que foram testados individualmente. Dois testes binominais lados (PALLINI, 1997) foram utilizados para analisar as diferenças na fração de ácaros escolhendo, quer uma das duas metades do disco após a exposição durante 1 e 24 horas.

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1. Análise química dos óleos

Análise de GC-MS/FID de *V. capitata*, *V. megapotamica*, *V. gardneriana* e *V. rufences* resultou em 46, 45, 41 e 37 componentes, respectivamente. Composições químicas muito semelhantes foram encontradas nos óleos essenciais de *V. capitata* e *V. megapotamica*: α -copaeno, (*E*)-cariofileno, γ -elemeno, α -humuleno, trans-cadina-1(6),4-dieno, e viridiflorene δ -cadineno foram os principais componentes. A composição química do óleo essencial destilado a partir das folhas de *V. megapotamica* foi descrito anteriormente, onde butil-hidroxitolueno, fitol e cariofileno foram os principais compostos identificados nas amostras coletadas no sul do Brasil (DE BRUM et al., 2013). Pterosteron, polypodin B, fitoecdisonas e iridóides foram também reportados na referida espécie (RIMPLER, 1969; 1972). O perfil químico descrito aqui difere desses estudos. As possíveis razões deve ser a diferente localização geográfica da espécie, bem como a diferente sazonalidade da mesma, além da variação do bioma, a condição do solo, época de colheita e estágio de desenvolvimento da planta. Óleos essenciais a partir das folhas de *V. gardneriana* revelou a presença de 41 compostos, os mais abundantes, foram 6,9-guaiadiene (19.3%), óxido de cariofileno (18,6%), *L*-calameneno (13,9%), α -cadinol (3,8%), α -copaeno (3,2%), trans-cadina-1,4-dieno (3.1%), (*E*)-cariofileno (2,7%), germacreno D (2,5%), cubenol (2,2%), β -elemene (1,9%), α -muurolene (1,9%), cis-muurola-3,5-dieno (1,8%), α -muurolol (1,8%), α -calacorene (1,2%) e 1-epi-cubenol (1,2 %). Resultados anteriores do nosso grupo de pesquisa reportou a presença de iridóides (aucubina) e ecdisteroides (20-hidroxiecdisona) nas cascas do caule de *V. gardneriana* (DE SÁ BARRETO et al., 2005). (*E*)-cariofileno (21%), ledol (15.7%), germacreno D (9.3%), α -humuleno (7.3%), allo-aromadendreno (6.9%), viridifloreno (6,6%), α -elemene (5,8%), foram os principais compostos encontrados para *V. rufecens*. (**Tabela 5**).

Tabela 5 - Principais compostos (%) identificados nos óleos essenciais extraídos das folhas de *Vitex megapotamica* (Spreng.) Moldenke, *Vitex gardneriana* Schauer, *Vitex capitata* Vahl e *Vitex rufescens* A. Juss. do nordeste do Brasil.

RI lit. ^b	RI exp. ^c	Compostos	V. capitata	V. megapotamica	V. gardneriana	V. rufescens
846	865	(2E)-Hexenal	-	-	-	tr ^d
850	866	(3Z)-Hexen-1-ol	-	-	-	0.4
863	876	Hexan-1-ol	-	-	-	tr
932	934	α -Pinene	-	0.3	-	tr
974	965	α -Pinene	-	0.4	-	-
974	981	Oct-1-en-3-ol	-	-	-	tr
1024	1020	Limonene	-	0.1	-	0.1
1067	1066	cis-Linalool oxide (furanoid)	-	0.1	-	-
1084	1083	trans-Linalool oxide (furanoid)	-	0.1	-	-
1095	1094	Linalool	0.2	1.1	tr	tr
1122	1132	α -Campholenal	-	-	tr	-
1135	1146	Nopinone	-	-	tr	-
1160	1171	Pinocarvone	-	-	0.1	-
1174	1185	Terpinen-4-ol	-	-	0.2	-
1184	1182	Neoisomentol	tr	-	-	-
1186	1196	α -Terpineol	0.1	0.2	0.1	-
1195	1205	Myrtenal	-	-	0.2	-
1284 ^e	1292	Dihydroedulan IIA	-	-	-	tr
1292 ^e	1297	Dihydroedulan IA	tr	-	-	tr
1298 ^e	1302	Theaspirane	-	-	-	tr
1315 ^e	1319	Theaspirane B	-	-	-	tr
1335	1341	α -Elemene	0.7	1.0	0.5	1.8
1345	1353	α -Cubebene	1.8	1.9	1.0	tr
1369	1380	Cyclosativene	tr	-	-	-
1373	1376	α -Ylangene	0.1	0.1	-	tr
1374	1380	α -Copaene	11.7	10.8	3.2	0.3
1379	1384	α -Patchoulene	-	-	-	tr
1383	1393	(E)- β -Damascenone	tr	0.3	0.3	-
1387	1389	α -Bourbonene	tr	1.3	0.6	0.6
1389	1398	α -Elemene	2.2	2.7	1.9	5.8
1409	1416	α -Gurjunene	0.1	0.1	-	1.6
1417	1430	(E)-Caryophyllene	19.7	16.2	2.7	21.0
1430	1435	α -Copaene	-	-	0.5	0.8
1434	1445	α -Elemene	6.7	5.6	-	-
1437	1451	α -Guaiene	0.2	0.3	0.1	-
1439	1445	Aromadendrene	0.3	0.2	-	0.3
1442	1450	(Z)- α -farnesene	*	*	-	-
1442	1450	6,9-Guaiadiene	0.3*	0.8*	19.3	0.3
1451	1466	trans-Muurolo-3,5-diene	tr	0.3	1.8	-
1452	1462	α -Humulene	15.7	8.5	0.9	7.3
1458	1470	allo-Aromadendrene	1.9	2.3	0.5	6.9

Os compostos que estão em negrito representam os principais compostos encontrados. ^bRI lit., índices de retenção de acordo com Adams (2007). ^cRI exp., Índices de retenção na coluna RTX-5MS calculada de acordo com van den DOOL & KRATZ (1963). ^dtr = vestígios de composto foram detectados. ^eÍndice de retenção de acordo com LINSTROM & MALLARD (2005). * Compostos co-eluentes.

Tabela 6 (Continuação) - Principais compostos (%) identificados nos óleos essenciais extraídos das folhas de *Vitex megapotamica* (Spreng.) Moldenke, *Vitex gardneriana* Schauer, *Vitex capitata* Vahl e *Vitex rufescens* A. Juss. do nordeste do Brasil.

1465	1487	<i>cis</i> -Muurolo-4(14),5-diene	0.1	0.2	-	-
1475	1491	<i>trans</i> -Cadina-1(6),4-diene	1.3	2.1	-	-
1464	1478	9- <i>epi</i> -(<i>E</i>)-Caryophyllene	-	-	-	0.1
1475	1481	α -Gurjunene	-	-	-	0.6*
1476	1481	α -Chamigrene	-	-	-	*
1478	1483	α-Muurole	9.5	13.5	0.4	0.7
1484	1490	Germacrene D	-	-	2.5	9.3
1489	1494	α -Selinene	0.5	0.9	0.7	2.2
1492	1496	<i>cis</i> - α -Guaiene	-	-	-	tr
1493	1499	<i>trans</i> -Muurolo-4(14),5-diene	tr	tr	1.0	tr
1496	1502	Viridiflore	5.2	5.8	-	6.6*
1500	1505	Bicyclogermacrene	-	-	-	*
1500	1515	α -Muurole	-	-	1.9	-
1502	1521	<i>trans</i> - α -Guaiene	0.1	0.1	-	-
1505	1519	α -Bisabolene	-	-	0.4	-
1513	1520	α -Cadinene	0.7	1.1	1.0	1.4
1514	1522	Cubebol	-	-	0.8	-
1520	1525	7- <i>epi</i> - α -Selinene	-	-	-	0.1
1522	1529	α-Cadinene	7.1	7.3	-	2.0
1528	1542	L-Calamenene	-	-	13.9	-
1528	1542	Zonarene	tr	tr	-	-
1533	1538	<i>trans</i> -Cadina-1,4-diene	0.3	0.5	3.1	0.1
1537	1543	α -Cadinene	0.3	0.4	-	0.3
1544 ^e	1555	4,5,9,10-Dehydroisolongifolene	-	-	0.7	-
1544	1550	α -Calacorene	0.4	0.5	1.2	tr
1559	1577	Germacrene B	0.9	0.6	-	-
1564	1581	α -Calacorene	-	-	0.5	-
1567	1578	Palustrol	-	-	-	3.0
1571	1583	(<i>Z</i>)-Dihydro-apofarnesol	0.6	0.3	-	-
1577	1588	Spathulenol	0.1	0.8	-	1.0
1582	1590	Caryophyllene oxide	1.2	2.4	18.6	1.3
1592	1604	Viridiflorol	-	-	-	1.5
1600	1609	Guaiol	-	-	-	0.3
1602	1619	Ledol	0.1	0.2	-	15.7
1618	1624	1,10-di- <i>epi</i> -cubenol	-	-	-	tr
1627	1636	1- <i>epi</i> -Cubenol	0.6	0.8	1.2	tr
1638	1650	<i>epi</i> - α -Cadinol	tr	tr	-	1.4*
1640	1650	<i>epi</i> - α -Muurolol	1.4	1.8	-	*
1644	1654	α -Muurolol	tr	-	1.8	0.2
1645	1663	Cubenol	-	-	2.2	-
1652	1660	α -Eudesmol	-	-	-	tr
1652	1664	α -Cadinol	1.1	1.6	3.8	2.0
1658	1665	Selin-11-en-4 \square -ol	0.1	tr	-	tr
1658	1670	<i>neo</i> -Intermedeol	-	-	-	tr

Os compostos que estão em negrito representam os principais compostos encontrados. ^bR_I lit., índices de retenção de acordo com Adams (2007). ^cR_I exp., Índices de retenção na coluna RTX-5MS calculada de acordo com van den DOOL & KRATZ (1963). ^dtr = vestígios de composto foram detectados. ^eÍndice de retenção de acordo com LINSTROM & MALLARD (2005). * Compostos co-eluentes.

Tabela 7 (Continuação) - Principais compostos (%) identificados nos óleos essenciais extraídos das folhas de *Vitex megapotamica* (Spreng.) Moldenke, *Vitex gardneriana* Schauer, *Vitex capitata* Vahl e *Vitex rufescens* A. Juss. do nordeste do Brasil.

1665	1675	Intermedeol	-	-	-	0.2
1675	1694	Cadalene	tr	0.2	0.8	-
1676	1699	Mustakone	-	0.1	-	-
1668	1680	14-hydroxy-9- <i>epi</i> -(<i>E</i>)-Caryophyllene	-	-	-	0.1
1685	1699	Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1 α -ol	-	0.5	-	0.4
1687	1698	Eudesma-4(15),7-dien-1 α -ol	0.1	-	-	-
1700	1710	Amorpha-4,9-dien-2-ol	0.1	-	-	-
1700	1719	Eudesm-7(11)-en-4-ol	0.1	0.1	-	-
1740	1767	Mint sulfide	0.2	0.1	-	0.1
1843	1847	Hexahydrofarnesyl acetone	0.1	-	-	-
2119	2124	Phytol	1.3	0.2	-	-
Total			95.2	95.9	90.4	97.8

Os compostos que estão em negrito representam os principais compostos encontrados. ^bRI lit., índices de retenção de acordo com Adams (2007). ^cRI exp., Índices de retenção na coluna RTX-5MS calculada de acordo com van den DOOL & KRATZ (1963). ^dtr = vestígios de composto foram detectados. e Índice de retenção de acordo com LINSTROM & MALLARD (2005). * Compostos co-eluentes.

Dos constituintes químicos, 88,7%, 94,5 %, 80,5% e 90,2% foram sesquiterpenos e 2,3%, 0,3%, 17,1% e 8,6% foram monoterpenos para *V. capitata*, *V. megapotamica*, *V. gardneriana* e *V. rufescens*, respectivamente.

É notável uma alta concentração na distribuição de sesquiterpenos encontrados nos óleos essenciais das espécies de *Vitex*. O'Maill e colaboradores (2006) identificaram nas folhas de *Nicotiana tabacum* L. um tipo de sesquiterpeno sintase (5-*epi*-aristoloueno sintase), o qual participa na síntese do aristoloueno. O aristoloueno sintase serve até os dias atuais como modelo para compreender os mecanismos enzimáticos da biossíntese de outras sesquiterpenos, isto poderia nos levar a uma compreensão de quais tipos de sesquiterpenos sintase estão envolvidos na síntese dos compostos das espécies de *Vitex*, principalmente nos compostos viridifloreno **(1)** e 6,9-guiadieno **(2)** (**Figura 11**), os quais possuem um anel de sete membros, sendo um tipo de ciclização rara encontrado em espécies vegetais. Esses dados relacionados com estudos adicionais de quimiossistemática poderia sugerir sesquiterpeno sintase como possível biomarcador do gênero *Vitex*, fornecendo assim dados quimiotaxonômicos para reforçar ainda mais a transição do gênero *Vitex* da família Verbenaceae para a família Lamiaceae.

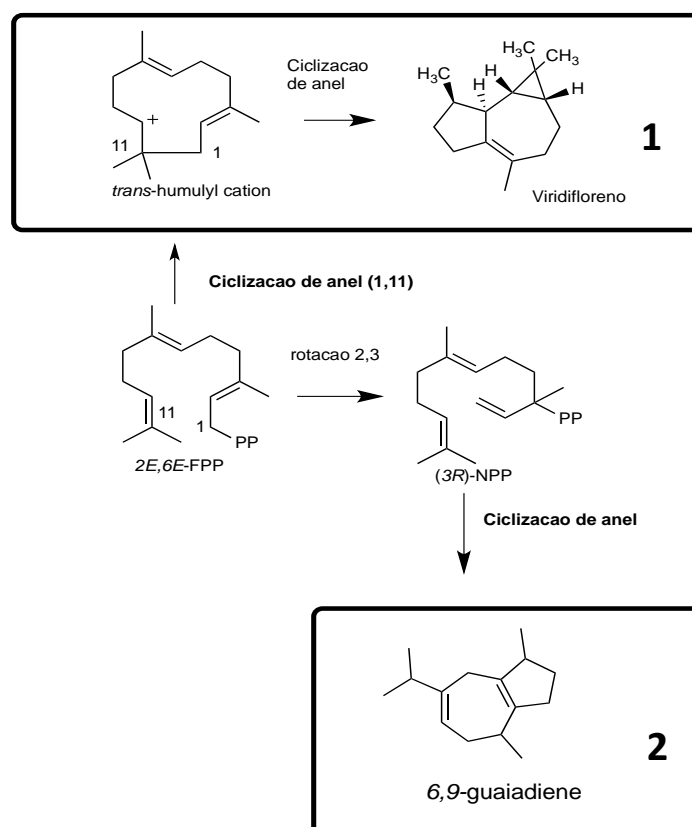


Figura 11: Possível rota biossintética e dos principais sesquiterpenos contendo anéis de sete membros viridiflorene (1) e 6,9 guaiadiene (2).

Após uma vasta investigação na literatura, podemos informar por melhor conhecimento do nosso grupo, que se trata do primeiro relato da composição química dos óleos essenciais destilados a partir de folhas de *V. capitata*, *V. gardneriana* e *V. rufences*.

5.2. Análise de marcadores de ISSR

Na análise ISSR de quatro espécies de *Vitex*, foram utilizados 14 iniciadores, com base nos padrões de bandagem repetitivos obtidos, e sucessivamente utilizados para análise genética.

Os genótipos das quatro espécies de *Vitex* selecionados para este estudo foram agrupados por UPGMA utilizando o coeficiente de Jaccard (JC), estimado a partir dos dados binários (**Tabela 7**). A média de similaridade foi de 0,21 JC (0,08-0,45 JC).

No nível interespecífico o maior valor de similaridade foi de 0,45 entre *V. megapotamica* x *V. capitata*, enquanto que o menor valor foi de 0,07 entre *V. gardneriana* x *V. megapotamica*. A similaridade de maior valor se assemelha muito com o encontrado dentre as espécies *Sonneratia gulngai* x *Sonneratia alba* no estudo conduzido com o gênero *Sonneratia* (LI, 2008).

Tabela 9 - Similaridades genéticas obtidas pelo uso de 14 iniciadores ISSR em 4 espécies do gênero *Vitex* com base no coeficiente de Jaccard.

	<i>V. capitata</i>	<i>V. megapotamica</i>	<i>V. gardneriana</i>
<i>V. capitata</i>			
<i>V. megapotamica</i>	0,45		
<i>V. gardneriana</i>	0,09	0,07	
<i>V. rufescens</i>	0,27	0,28	0,08

Os marcadores ISSR distinguiram as quatro espécies testadas de *Vitex*, houve a separação de dois grupos, sendo *V. gardneriana* a mais isolada geneticamente dentre as quatro espécies estudada (**Figura 13**). Vale ressaltar que, a *V. gardneriana* diferentemente das outras espécies, foi coletada na região do semi-árido, no interior da Paraíba, isso pode justificar o distanciamento genético dessas espécies em relação as outras. Devido às características peculiares que o bioma da catinga possui, os genótipos dessa região possuem adaptações evolutivas específicas para sobreviverem nesse tipo de ambiente (LEAL et al., 2003).

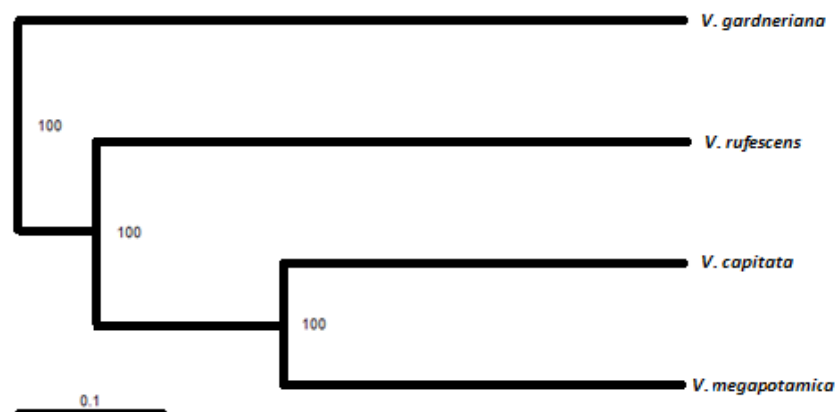


Figura 13 - Dendrograma de similaridade genética utilizando marcadores ISSR utilizando o coeficiente de Jaccard e método de agrupamento UPGMA e análise de bootstrap (100.000x) para quatro espécies de *Vitex*.

Com base nos dados obtidos por meio dos marcadores ISSR e os compostos dos óleos das quatro espécies de *Vitex* foi possível estimar a similaridade entre os genótipos com base no cruzamento de dados (**Tabela 8**). Novamente a espécie *V. gardneriana* esteve distante das demais.

Tabela 10 - Similaridades pelo coeficiente de Jaccard com base na matriz binária de 14 marcadores ISSR e compostos dos óleos essenciais de quatro espécies do gênero *Vitex*.

	<i>V. capitata</i>	<i>V. megapotamica</i>	<i>V. gardneriana</i>
<i>V. capitata</i>			
<i>V. megapotamica</i>	0,47		
<i>V. gardneriana</i>	0,06	0,09	
<i>V. rufescens</i>	0,20	0,24	0,06

As espécies *V. megapotamica* e *V. capita* apresentaram uma composição química bastante semelhante, corroborando assim com os resultados da análise de ISSR e análise de cluster realizada com componentes dos óleos essenciais das duas espécies (**Figura 14**). Essa semelhança na composição química entre as duas espécies pode estar associado a localização geográfica, na qual elas pertencem. Sendo que suas folhas foram coletadas na mesma localização, no município de Vitória da Conquista –BA, onde está localizado á uma altitude de 930 metros, em uma área de vegetação de Mata-Larga. Devido essa proximidade geográfica entre as espécies, elas consequentemente desenvolveram suas adaptações evolutivas

em semelhança, conferindo assim uma similaridade inter-específica entre os genótipos. Estudo conduzido com as espécies *Passiflora galbana* Mast. e *P. mucronata* Lam. baseando-se em caracteres moleculares ISSR e RAPD mostrou que esses marcadores agruparam as populações geograficamente próximas (PASSOS, 2007).

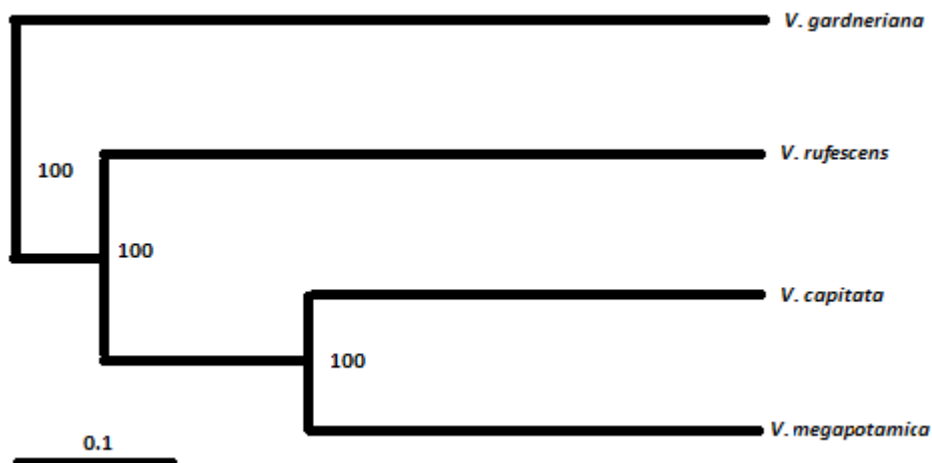


Figura 14 - Dendrograma de similaridade utilizando pelo coeficiente de Jaccard e método de agrupamento UPGMA, com base na matriz binária de 14 marcadores ISSR e compostos dos óleos essenciais de quatro espécies do gênero *Vitex*.

Como já mencionado anteriormente, é notável uma expressão acentuada de sesquiterpeno sintases, onde poderíamos propor como uma alternativa para agrupamento taxonômico das espécies desse gênero. A combinação dos resultados químicos com estes do ISSR fornece informações adicionais sobre a similaridade das espécies de *Vitex* avaliadas neste estudo. Sugerimos que as espécies do mesmo grupo possam ter raízes semelhantes de compostos secundários biosintetizados, que resultam na ativação de genes semelhante.

5.3. Teste toxicidade e repelência

A concentração do óleo essencial de *V. gardneriana* que matou 50% (CL₅₀) do *A. guerreronis* foi estimada como sendo 0,8577 mg.mL⁻¹ (CI 0,6706-1,1509) (x₂ = 3,1747, df = 2, P = 0,2045). Embora CLs não foram estimados para *V. capitata* e *V. megapotamica*, concentrações de até 2,3 mg/mL não matou adultos do ácaro-da-necrose-do-coqueiro ao longo de um período de 24 horas em um bioensaio de

toxicidade. Bioensaios de repelência indicou que os adultos de *A. guerreronis* não preferiram metades de discos não tratados sobre aqueles pulverizadas com os óleos essenciais de *V. gardneriana*, *V. capitata*, e *V. megapotamica* após 1 hora para as duas concentrações (0,85 ou 1,88 mg / ml, $P > 0,05$) (**Figura 15A**). Isto está em contraste com a repelência exibida pelo controle positivo acaricida (abamectina - 18 g a.i./ G). Um padrão de repelência oposto foi encontrado após 24 horas de exposição (**Figura 15B**). Em geral, os adultos de *A. guerreronis* mostrou preferência por metades de discos não tratados sobre aqueles tratados com óleos essenciais a partir das três espécies *Vitex*, exceto para *V. megapotamica* a 0,85 mg/ml⁻¹ ($P < 0,05$), ao passo que não foi observada nenhuma repelência para abamectina. Estes resultados sugerem que a repelência dos óleos essenciais a partir de espécies de *Vitex* aumenta com o tempo. Pesquisas futuras devem avaliar a repelência de óleos essenciais de espécies de *Vitex* por períodos de exposição mais longos, dependendo do modelo usado.

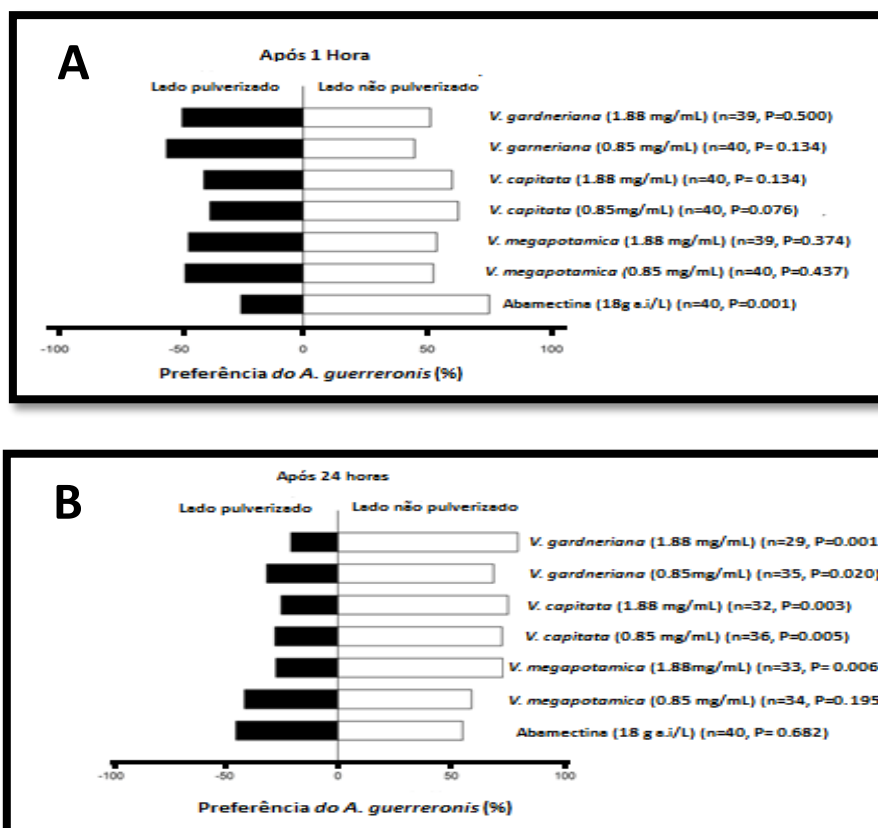


Figura 15 - Repelência dos óleos essenciais destilados das folhas de *Vitex megapotamica* (Spreng.) Moldenke, *Vitex gardneriana* Schauer, *Vitex capitata* Vahl e *Vitex rufescens* A. Juss. frente ao ácaro *Aceria guerreronis* Keifer depois de 1h (**A**) e 24h (**B**) usando disco de duas escolhas.

No que concerne ao composto majoritário dentre as quatro espécies de *Vitex*, o da *V. gardneriana* foi o que apresentou distinção, sendo o 6,9-guaiadieno o majoritário, enquanto que o (*E*)-cariofileno foi o majoritário nas outras três espécies de *Vitex*. Podemos sugerir que o 6,9- guaiadieno seja o responsável pela atividade acaricida, o qual também foi encontrado em óleos essenciais extraídos de *Ruilopezia bracteosa* Standl; e *Baccharis salicifolia* Ruiz Lopez & Pavon, ambos os óleos demonstraram atividade antibacteriana (CARRIZO et al, 2009; MOMEN et al, 2014). Além disso, outros compostos que aparecem em uma concentração representativa no óleo essencial de *V. gardneriana* tem apresentado atividade acaricida e inseticida, como por exemplo, o óxido de cariofileno, cujo foi responsável pela toxicidade ao ácaro predador *Neoseiulus californicus* McGregor (MOMEM et al., 2014). Adicionalmente, o α -cadinol e óxido de cariofileno, os principais compostos encontrados no óleo essencial das folhas e flores de *Teucrium polium* L., apresentaram atividade fumigante e de repelência contra o caruncho *Callosobruchus maculatus* Fabricius (Coleoptera: Bruchidae) (KHANI & ASGHARI, 2012; KHANI & HEYDARIAN, 2014). Ao passo que, α -cadinol também mostrou ação inibitória excelente contra os *Coptotermes formosanus* cupim (Isoptera: Rhinotermitidae) (CHENG et al., 2014). No entanto, estudos adicionais precisam ser feitos para identificar quais compostos estão causando atividade de repelência/toxicidade ou se há um sinergismo entre esses compostos.

6. CONCLUSÃO

Diante do exposto, os óleos essenciais das quatro espécies de *Vitex* foram extraídos corretamente conforme a técnica empregada e a identificação da composição química de suas respectivas espécies foram realizadas.

A averiguação da similaridade genética e variabilidade química das quatro espécies de *Vitex* utilizando marcadores ISSR foi alcançado com êxito, onde os marcadores do tipo ISSR foram eficientes para detecção do polimorfismo intraespecífico, revelando 100% de polimorfismo.

Foi possível agrupar as espécies pelo método de agrupamento aritmético utilizando o coeficiente de Jaccard, sendo *V. capitata* e *V. megapotamica* muito próximas geneticamente pela matriz UPGMA, corroborando assim com a semelhança que há na composição química entre essas duas espécies.

Foi possível concluir também que as espécies *V. megapotamica*, *V. capitata* e *V. gardneriana* apresentaram atividade repelente significativa quando comparado ao controle abamectina. No entanto, a *V. gardneriana* foi a que mostrou melhor atividade repelente entre todas as espécies estudadas, além de ser a única que foi tóxica em baixas concentrações frente ao *A. guerenonis*.

Sendo assim, o óleo essencial de *V. gardneriana* apresenta-se como potencial candidato para o desenvolvimento de um novo bioproduto acaricida, embora, estudos adicionais precisam ser feitos para identificar quais compostos estão causando atividade de repelência/toxicidade ou se há um sinergismo entre esses compostos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIODUN, O.O.; SOOD, S.; OSIYEMI, O.A.; AGNIHOTRI, V.K.; GULATI, A.; AJAIYEGBA, E.O.; SINGH, B. In vitro antimicrobial activity of crude ethanol extracts and fractions of *Terminalia catappa* and *Vitex doniana*. **Afr. J. Med. Med. Sci.**, v. 44(1), p. 21-6, 2015.

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**, 4th ed. Allured Publ Corp, 2007, p. 135.

AGROFIT 2017. **Sistema de agrotóxicos Fitossanitários do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acessado em 15 de fevereiro de 2017.

AHMAD, F.B.; HOLDSWORTH, DK. Traditional medicinal plants of Sabah State Malaysia. Part III. **Int. J. Pharmacognosy**, v. 33(3), p. 262- 264, 1995.

AJIBOYE, T.O. Standardized extract of *Vitex doniana* Sweet stalls protein oxidation, lipid peroxidation and DNA fragmentation in acetaminophen-induced hepatotoxicity. **J. Ethnopharmacol.** v. 22:164, p. 273-82, 2015.

AZADBAKHT, M.; BAHEDDINI, A.; SHORIDEH, S.M.; NASERZADEH, A. Effect of *Vitex agnus-castus* L. leaf and fruit flavonoidal extracts on serum prolactin concentration. **J. Med. Plants**. v. 4, p. 56–61. 2005

AZHAR-UL-HAQ, M.A.; ANIS, I.; KHAN, S.B.; AHMED, E.; AHMED, Z.; Enzyme inhibiting lignans from *Vitex negundo*. **Chem. Pharm. Bull.** v. 52, p. 1269–72, 2004.

ALICE, C.B.; MENTZ, L.; SIQUEIRA, N.C.S.; SILVA, G.A.A.B.; JOSE, K. F. **Plantas medicinais de uso popular: atlas farmacognóstico**. Ed. da Ulbra, Canoas, Brazil, 1995.

ALLAHTAVAKOLI, M.; HONARI, N.; POURABOLLI, I.; ARABABADI, M. K.; GHAFARIAN, H.; ROOHBAKHSH, A.; NADIMI, A. E.; SHAMSIZADEH, A. *Vitex Agnus Castus* Extract Improves Learning and Memory and Increases the Transcription of Estrogen Receptor α in Hippocampus of Ovariectomized Rats. **Basic and Clinical neuroscience.**, v. 6, p. 3. 2015

ANVISA. **Programa de Análise de Resíduo de Agrotóxico em Alimentos (PARA), dados da coleta e análise de alimentos**. Brasília: ANVISA, 2012. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 20 de janeiro de 2016.

ANVISA; UFPR. **Seminário de mercado de agrotóxico e regulação**. Brasília: ANVISA 2012. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 20 de janeiro de 2016.

ARAÚJO, V.O.; GASPAROTTO, F.M.; PIRES, V. A.; MACIEL, A. A.; ORTMANN, C.F.; JUNIOR, E. L. C.; LOURENÇO, E. L. B.; JUNIOR, A. G. Renoprotective Effects of *Vitex megapotamica* (Spreng.) Moldenke in C57BL/6 LDLr-Null Mice Undergoing High Fat Diet. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 3, p. 10. 2015.

ARGUETA, A.; CANO, L.M.; RODARTE, M.E. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional I y III. Instituto Nacional Indigenista, p. 537-538. 1994.

AZARNIA, M.; EJTEMAEI-MEHR, S.; SHAKOOR, A.; ANSARI, A. Effects of *Vitex agnus-castus* on mice fetus Development. **Acta Med Iran**, v. 45, p. 264–70. 2007. MINISTERIOS DA AGRICULTURA PECUARIA E ABASTECIMENTO. **Anuário da agricultura Brasileira - AGRIANUAL**. São Paulo: FNP, 2014. p. 285-290.

AQUINO, M.L.N., C.H.W. FLECHTMANN & G.P. ARRUDA, 1968. **Contribuição ao estudo do ácaro causador da necrose do olho do coqueiro em Pernambuco e seu controle**. Recife, IPA, 17p. (Boletim Técnico, 34).

ARAGÃO, W. M.; RIBEIRO, M.F.V. Cultivares de coqueiro para a produção de coco seco: coqueiro Gigante vs híbridos. In: CINTRA, F.L.D. (ed.). FONTES, H.R.; PASSOS, E.E.M.; FERREIRA, J.M.S. **Fundamentos tecnológicos para a revitalização das áreas cultivadas com coqueiro gigante no nordeste do Brasil**. Aracaju: Embrapa - CPTAC, 2010. p. 37-60.

_____; RESENDE, E.M.O.; CRUZ, C.S.; REIS, O.J.; SAGGIN JUNIOR, J.A.; ALENCAR, W.A.; MOREIRA, F.R.; LIMA FILHO, J.M.P. Fruto do coqueiro para consumo natural. In: ARAGÃO, W.M. (ed.). **Coco: Pós-colheita**. Aracaju: Embrapa - CPTAC, 2002. p. 19-25.

AZOKOU, A.; KONÉ, M.E.; KOUDOU, B.G.; TRA BI, H.F. Larvicidal potential of some plants from West Africa against *Culex quinquefasciatus* (Say) and *Anopheles gambiae* Giles (Diptera: Culicidae). **J Vector Borne Dis**, v. 50, p. 103–110, 2013.

BAJPAI, A.; OJHA, J.K.; SANT, H.R. Medicobotany of the Varanasi District Uttar Pradesh, India. **Int. J. Pharmacognosy**, v. 33 (2), p. 172–176, 1995.

BARAKAT, M. N.; EL-SHAFEI, A. M.; AL-DOSS, A. Molecular mapping of QTLs for resistance to northern corn leaf blight in maize. **International journal of food, agriculture and environment**, v. 08, n. 2, p. 547-552, 2010.

BARROS, G.S.C.; MATOS, F.J.A.; VIERA, J.E.V.; SOUZA, M.P.; MEDEIROS, M.C. Pharmacological screening of some Brazilian plants. **Journal of pharmacy and pharmacology**. v. 22, p. 116—122, 1970.

BANSOD, M.S.; HARLE, U.N. *Vitex negundo* L.: Phytochemical constituents, traditional uses and pharmacological properties: Comprehensive review. **Pharmacologyonline**. v. 5 p. 286–02, 2009.

BLAIR, M.W.; PANAUD, O.; McCouch, S.R. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L). **Theor. Appl. Genet.** v. 98, p. 780-792. 1999

BORGES, Artemisia Nazare Costa. **Caracterização genética em germoplasma de cajuí (*Anacardium spp.*) por meio de marcadores morfoagronômicos e moleculares ISSR.** 2015. 99 f. (Mestrado em Genética e Melhoramento), Universidade federal do Piauí, Piauí.

BRANDT, A.P.; OLIVEIRA, L.F.S.; FERNANDES, F.B.; ALBA, J. “Avaliação in vivo do efeito hipocolesterolêmico e toxicológico preliminar do extrato bruto hidroalcoólico e decoção da *Vitex megapotamica* (Spreng) Moldenke (*V. montevidensis* Cham.) in vivo, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19(2), p. 388–393, 2009.

BRITO, Fabiana de Andrade. **Análise da diversidade genética em erva baleeira (*Varronia curassavica* Jacq.) baseada no marcador issr.** 2016. 37f. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Biodiversidade). Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão.

BRUM, T.F.; ZADRA, M.; FROEDER, A.L.F.; BOLIGON, A.A.; FROHLICH, J.K.; ATHAYDE, M.L. Análise fitoquímica preliminar das folhas de *Vitex megapotamica* (Sprengel) Moldenke. **Rev. Saúde (Santa Maria)** v. 37, p. 101–106, 2011.

CARDOSO, F. **Arvores de Curitiba.** Editora do Autor, Curitiba, Brazil, 2004.

CARNEIRO, F. F.; PIGNATI, W.; RIGOTTO, R, M.; AUGUSTO, L. G. S.; RIZZOLO, A.; FARIA, N. M. X.; ALEXANDRE, V. P.; FRIEDRICH, K.; MELLO, M. S. C. **Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Parte 1 - Agrotóxicos, Segurança Alimentar e Nutricional e Saúde.** Rio de Janeiro: ABRASCO, 2012. P. 55-57.

CALLMANDER M.W.; PHILLIPSON, P.B.; SCHATZ, G.E. Towards a revision of the genus *Vitex* L. (Lamiaceae) in Madagascar I: a distinctive new species from Northeastern Madagascar, **Candollea**, v. 69:(2), p. 141-147, 2014.

CARRIZO, F.R.; PONZI, M.; ARDANAZ, C. Chemical composition of essential oil of *Baccharis salicifolia* (Ruiz & Pavon) Pers. and antibacterial activity, **J. Chil. Chem. Soc.** v. 54, p. 475-476. 2009.

c

CARMICHAEL, A.R. Can *Vitex agnus castus* be used for the treatment of mastalgia? What is the current evidence? **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 5, p. 247–50. 2008.

CHENG, S.S.; LIN, C.Y.; CHEN, Y.J. Insecticidal activities of *Cunninghamia konishii* Hayata against Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus* (Isoptera: *Rhinotermitidae*), **Pest Manag. Sci.** v. 70, p. 1215-1219. **2014**.

CORLAY, N.; LECSÖ-BORNET, M.; LEBORGNE, E.; BLANCHARD, F.; CACHET, X.; BIGNON, J.; ROUSSI, F.; BUTEL, M.; AWANG, K.; LITAUDON, M. Antibacterial Labdane Diterpenoids from *Vitex vestita*. **J. Nat. Prod.**, v. 26;78(6), p. 1348-56, 2015.

CORREA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**, IBDF, Rio de Janeiro, Brazil, 1984.

CORRÊA, J.C.R.; SALGADO, H.R.N. Insecticidal activities of plants and applications: a review, **Rev. bras. plantas med.** V, 13 no.4, 2011.

CORTES, S.; ROLAO, N.; RAMADA, J.; CAMPINO, L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 98(1), p.12-7, 2004.

COSTA, R.S.C.; NASCENTE, A.S.; RIBEIRO, G.D.; FERREIRA, M.G.R. **Cultivo do Coqueiro em Rondônia**. Ed. Téc. NASCENTE, A.S. EMBRAPA Rondônia, 2005 Versão Eletrônica: ISSN 1807-1805. Porto Velho, Rondônia.

COSTA, M.R.; RIBEIRO, C.G.; SANTOS-FILHO, S.D.; NEVES, R.F.; FONSECA, A.S.; BERNARDO-FILHO, M. An aqueous extract of *Vitex agnus-castus* alters the labeling of blood constituents with Technetium-99m. **Braz Arch Biol Technol**, v. 50, p. 183–8, 2007.

DAI, D.N.; THANG, T.D.; OGUNWANDE, I.A.; LAWAL, O.A. Study on essential oils from the leaves of two Vietnamese plants: *Jasminum subtriplinerve* C.L. Blume and *Vitex quinata* (Lour) F.N. Williams, **Natural product research**, v. 27, p. 1-5, 2015.

DARGAHIA, L.; RAZAVI-AZARKHIAVIB, K.; RAMEZANIC, M.; ABAEED, M.R.; BEHRAVANE, J. Insecticidal activity of the essential oil of *Thymus transcaspicus* against *Anopheles stephensi*, **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.4, p. S589–S59, 2014.

DE BRUM, T.F.; ZADRA, M.; FROEDER, A.L.F.; BOLIGON, A.A.; FROHLICH, J.K.; ATHAYDE, M.L. Análise fitoquímica preliminar das folhas de *Vitex megapotamica* (Sprengel) Moldenke. **Rev. Saúde (Santa Maria)** v. 37, p. 101–106, 2011.

DE BRUM, T.F.; BOLIGON, A.A.; FROHLICH, J.K. Composition and antioxidant capacity of the essential oil of leaves of *Vitex megapotâmica* (Sprengel) Moldenke, **Natural product research**, v. 27, p. 767-770, 2013.

DE LA CRUZ, M. G. F. **Plantas medicinais utilizadas por raizeiros: uma abordagem etnobotânica no contexto da saúde e doença**, 1997. 50 f.

Dissertação (Mestrado Saúde e Ambiente). Universidade federal do Mato Grosso, Mato Grosso. Cuiabá.

DE LIMA, C.T.; FRANÇA, F. Flora da bahia: *Vitex* tour. ex. I. Lamiaceae, **Sitientibus**, v. 9(4): p. 225-244. 2009.

DE SÁ BARRETO, L.C.L.; XAVIER, H.S.; BARBOSA-FILHO, J.M.; BRAZ-FILHO, R. Ecdisteróide e iridóide glicosilado de *Vitex gardneriana* Schauer (Verbenaceae). **Rev. bras. farmacogn.** v. 15, p. 1, 2005.

DE SÁ BARRETO, L.C.L.; CUNHA-FILHO, M.S.S.; SOUZA, I.A.; FRAGA, M.C.; Xavier, H.S. Avaliação Preliminar da Atividade Biológica e Toxicidade Aguda de *Vitex gardneriana* Schauer (Verbenaceae). **Lat. Am. J. Pharm.** v. 27(6), p. 909-13, 2008.

DINAN, L. Phytoecdysteroids: biological aspects. **Phytochemistry**, v. 57, p.325-339, 2001.

DOYLE, J. DNA protocols for plants d CTAB total DNA isolation. In: Hewitt, G.M., Johnston, A. (Eds.), **Molecular Techniques in Taxonomy**. Springer, Berlin, pp. 283–293. 1991.

DONGMO, A.B.; NKENG-EFOUET, P.A.; DEVKOTA, K.P.; WEGENER, J.W.; SEWALD, N.; WAGNER, H.; VIERTLING, W. Tetra-acetylajugasterone a new constituent of *Vitex cienkowskii* with vasorelaxant activity. **Phytomedicine**. v. 15;21(6), p. 787-92, 2014.

DUGOUA, J.J.; SEELY, D.; PERRI, D.; KOREN, G.; MILLS, E. Safety and efficacy of chastetree (*Vitex agnus-castus*) during pregnancy and lactation. **Can. J. Clin. Pharmacol.** v.15, p. 74–9. 2008.

DUYMUS, H.G.; AKALIN, C.G.; ULUSOYLAR, Y.S.; DEMIRCI, B.; KIRIME, N. The cytotoxic activity of *Vitex agnus castus* L. essential oils and their biochemical mechanisms, **Industrial Crops and Products**, v.55, p. 33–42, 2014.

EL-SHERBINI, G.T.; EL-SHERBINI, E.T.; HANYKAMEL, N.O. Insecticidal activities of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.) against *Pediculus humanuscapitis* (Anoplura: Pediculidae). **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.3, p. 695-707, 2014.

ERYIGIT, T.; CIG, A.; OKUT, N. Evaluation of chemical composition and antimicrobial activity of *Vitex agnus castus* L. fruits' essential oils from west natolia, Turkey. **Journal of essential oil bearing plants**, v.18, p. 208-214, 2015.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of active substance. Abamectin. EFSA. **Sci. Rep.** v. 147, p. 1-106, 2008.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. 1.ed. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. 99 p.

FANG, S.T.; KONG, N.N.; YAN, B.F.; YANG, C.Y. WANG, J.H.; LIU, S.J.; JIN, H.Z.; XIA, C.H. Chemical constituents and their bioactivities from the fruits of *Vitex negundo* var. *cannabifolia*. **Nat Prod Res**. v. 19, p. 1-5, 2016.

FAO 2017. **World Production**. Disponível em: <www.faostat.org.br>. Acesso em: 15 fevereiro. 2017.

FERREIRA, J.M.S.; LIMA, M.F.; SANTANA, D.L.Q.; MOURA, J.I.L.; SOUZA, L.A. Pragas do coqueiro. In: _____. (ed.); WARWICK D.R.N.; SIQUEIRA L.A. **A cultura do coqueiro no Brasil**. 2 ed. Brasília: Embrapa - SPI; Aracaju: Embrapa – CPATC, 1998. p. 189-267.

_____; MICHEREFF FILHO M. **Produção Integrada do Coco: Práticas Fitossanitárias**. Aracaju: Embrapa - CPTAC, 2002. 107 p.

_____. Pragas e métodos de controle ajustados à baixa capacidade de investimentos dos pequenos produtores rurais. In: CINTRA, FLD. (ed.). FONTES, H.R.; PASSOS, E.E.M.; FERREIRA, J.M.S. **Fundamentos tecnológicos para a revitalização das áreas cultivadas com coqueiro gigante no Nordeste do Brasil**. Aracaju: Embrapa - CPTAC, 2009. p. 191-218.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220 p.

FRANÇA, F. Lectotypification of Brazilian species of *Vitex* Tour. ex L. (Lamiaceae) **Bol. Mus. Para. Emilio Goeldi Cienc. Nat.** v.5 n.3. 2010.

GAUTAM, K.; KUMAR, P.; POONIA, S. Larvicidal activity and GC-MS analysis of flavonoids of *Vitex negundo* and *Andrographis paniculata* against two vector mosquitoes *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. **J. Vector. Borne. Dis**, v. 50, p. 171–178, 2013.

GEIGER, F. et al. Persistent negative effects of pesticides on biodiversity and biological control potential on European farmland. **Basic and Applied Ecology**, v. 11, p. 97-105, 2011.

GHANNADI, A.; BAGHERINEJAD, M.R.; ABEDI, D.; JALALI, M.; ABSALAN, B.; SADEGHI, N. (2012) Antibacterial activity and composition of essential oils from *Pelargonium graveolens* L'Her and *Vitex agnus-castus* L, **Iranian Journal of Microbiology**, v. 4, p. 171–176, 2012.

GUNN, B.F.; BAUDOUIIN, L.; OLSEN, K.M. Independent Origins of Cultivated Coconut (*Cocos nucifera* L.) in The Old World Tropics. **Plos one**, v. 6(6), p. 1–8, 2012.

HADIAN, J.; EBRAHIMIB, S.N.; MIRJALILIA, M.H.; AZIZI, A.; RANJBARD, H.; FRIEDT, W. Chemical and genetic diversity of *Zataria multiflora* Boiss. **Chem Biodiv.** v. 8, p. 176–188. 2011

HADJMOHAMMADI, M.R.; AFIF, A.A.; REZAEI, M.B. Chemical composition of leaf, flower and fruit oils of *Vitex pseudo-negundo* (Hauskn.) Hand.-Mzt. from Iran, **Journal of essential oil research**, v. 18, p. 308-309, 2006.

HARLEY, R.M.; ATKINS, S.; BUDANTSEV, A.L.; CANTINO, P.D.; CONN, B.J.; GRAYER, R.; HARLEY, M.M.; KOK, R.; KRESTOVSKAJA, T.; MORALES, R.; PATON, A.J.; RYDING, O.; UPSON, T. Lamiaceae. Kadereit JW. In: **dicotyledons: The families and genera of vascular plants lamiales (except Acanthaceae including Avicenniaceae)**. (Ed). Springer Verlag, Berlin, 2004, v. 7, p. 167-275.

HAQ, M.A.; SUMANGALA K.; RAMANI N. Coconutmite invasion, injury and distribution. In: FERNANDO, L.C.P. (ed.). MORAES, G.J.; WICKRAMANANDA, I.R. **Proceedings of the International Workshop on Coconut Mite (*Aceria guerreronis*)**. Sri Lanka: Coconut Research Institute, 2002. p. 41-49.

HEBBALKAR, D.S.; HEBBALKAR, G.D.; SHARMA, R.N.; JOSHI, V.S.; BHAT, V.S. Mosquito repellent activity of oils from *Vitex negundo* Linn. leaves. **Indian J Med Res**, v. 95, p. 200-3, 1992.

HILSDORF, A.W.S.; ORFÃO, L.H. Aspectos gerais do melhoramento genético em peixes no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 317-324. 2011.

HORN, R.C.; VARGAS, V.M.F. Mutagenicity and antimutagenicity of teas used in popular medicine in the salmonella/ microsome assay. **Toxicology in Vitro**, vol. 22, p. 1043– 1049, 2008.

HUEY-CHUN, H.; TZU-YUN, C.; LONG-ZEN, C.; HSIAO-FEN, W.; KUANG-HWAY, Y.; WAN-YU, H.; TSONG-MIN, C. Inhibition of Melanogenesis Versus Antioxidant Properties of Essential Oil Extracted from Leaves of *Vitex negundo* Linn and Chemical Composition Analysis by GC-MS, **Molecules**, v. 17, p. 3902-3916, 2012.

HU, Y.; HOU, T.T.; XIN, H.L.; ZHANG, Q.Y.; ZHENG, H.C.; RAHMAN, K.. Estrogen-like activity of volatile components from *Vitex rotundifolia* L. **Indian J Med Res.** v. 126, p. 68–72. 2007.

HU, Y.; ZHANG, Q.; XIN, H.; QIN, L.P.; LU, B.; RAHMAN, K. Association between chemical and genetic variation of *Vitex rotundifolia* populations from different locations in China: Its implication for quality control of medicinal plants. **Biomed Chromatogr.** v.21, p. 967–75. 2007.

IBGE, 2016. **Produção Agrícola Municipal**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pesquisa>>. Acesso em: 18 Janeiro. 2016

IBRAHIM, M.A.; PIRJO, K.; AFLATUNI, A.; TILLIKALA, K.; HOLOPAINEN, J.K. Insectidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: with special reference to limonene and its suitability for control of insect pest. **Agricultural and Food Science in Finland**, v.10, p.243-259, 2014.

ISHOLA, I.O.; OCHIENG, C.O.; OLAYEMI, S.O.; JIMOH, M.O.; LAWAL, S.M. Potential of novel phytoecdysteroids isolated from *Vitex doniana* in the treatment depression: involvement of monoaminergic systems. **Pharmacol Biochem Behav.** v. 127, p. 90-100, 2014.

JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. **Soc. Vaud. Sci. Nat.** v. 44, p. 223–270. 1908

JIGNESH, P.; SAMIR, S.; SHRIKALP, D.; GAURANG, S. Evaluation of the antiasthmatic activity of leaves of *Vitex negundo*. **Asian J Pharm Clin Res.** v. 2, p. 81–6. 2009.

JOLY, A.B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal.** Ed. Nacional, São Paulo, 1983. p.583-586.

JOSHI, S.P.; GUPTA, Y.S.; AGGARWAL, R.K.; RANJEKAR, P.K.; BRAR, D.S. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. **Theor. Appl. Genet.** v. 100, p. 1311-1320. 2000

LAMARIA, A.; TEYEBB, H.; CHEIKHA, H.B.; DOUKIB, W.; NEFFATIC, M. Chemical composition and insecticidal activity of essential oil of *salvia officinalis* L. cultivated in Tunisia. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v.7, p. 506-512, 2014.

LEAL, I.R.; TABARELLI M.; DA SILVA J.M.C. **Ecologia e conservação da caatinga** –: Ed. Universitária da UFPE, Recife 2003. p. 822.

LI, W.X.; CUI, C.B.; CAI, B.; YAO, X.S. Labdane-type diterpenes as new cell cycle inhibitors and apoptosis inducers from *Vitex trifolia* L. **J Asian Nat Prod Res.**v. 7, p. 95–105. 2005

LI, H.; CHENA G. Genetic relationship among species in the genus *Sonneratia* in China as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers, **Biochemical Systematics and Ecology.** v. 36:(5–6), p. 392–398. 2008.

DE LIMA, C.T.; FRANÇA, F. Flora da bahia: *Vitex* tour. ex. I. Lamiaceae, **Sitientibus**, v. 9(4): p. 225-244. 2009.

LIMA, D. B.; MELO, J. W. S.; GONDIM JR, M.G. C.; MORAES, G. J. Limitations of *Neoseiulus baraki* and *Proctolaelaps bickleyias* control agents of *Aceria guerreronis*. **Experimental and Applied Acarology**, Heidelberg, v. 56, n. 12, p. 233-246, 2012.

LINNAEUS, C. *Vitex*. In: C. LINNAEUS (Ed.): **Species Plantarum**: . Laurentii Salvii, Holmiae. 1753. p. 638 (938).

LINSTROM, P.J., MALLARD, W.G. (Eds.), NIST Chemistry Webbook, NIST Standard Reference Database Number 69. National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD. <http://webbook.nist.gov/chemistry/>(accessed August 2015).

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda.** Nova Odessa, SP, 2002, 512 p.

LUNA, J.S.; SANTOS, A.F.; LIMA, M.R.F.; OMENA, M.C.; MENDONÇA, F.AC.; BIEBER, L.W.; SANT'ANA, A.E.G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from Northeast Brazil. **J. Ethnopharmacol**, v. 97, p. 199-206, 2005.

KHALILZADEH, E.; VAF AEI SAIAH, G.; HASANNEJAD, H.; GHADERI, A.; GHADERI, S.; HAMIDIAN, G.; MAHMOUDI, R.; ESHGI, D.; ZANGISHEH, M. Antinociceptive effects, acute toxicity and chemical composition of *Vitex agnus-castus* essential oil, **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 5, p. 218-30, 2015.

KAMARAJ, C.; BAGAVAN, A.; ABDUL RAHUMAN, A.; ABDUZ ZAHIR, A.; ELANGO G.; PANDIYAN G. Larvicidal potential of medicinal plant extracts against *Anopheles subpictus* Grassi and *Culex tritaeniorhynchus* Giles (Diptera: Culicidae). **Parasitol Res**, v. 104, p.1163–1171, 2009.

KANNATHASAN, K.; SENTHILKUMAR, A.; VENKATESALU, V.; CHANDRASEKARAN, M. Larvicidal activity of fatty acid methyl esters of *Vitex* species against *Culex quinquefasciatus*. **Parasitol Res**, v.103(4), p. 999-1001, 2008.

KARUNAMOORTHY, K.; RAMANUJAM, S.; RATHINASAMY, R. Evaluation of leaf extracts of *Vitex negundo* L. (Family: Verbenaceae) against larvae of *Culex tritaeniorhynchus* and repellent activity on adult vector mosquitoes. **Parasitol Res**, v. 103(3), p. 545-50, 2008.

KLEIN, R. Phytoecdysteroids. **J. Am. Herb. Guild** 2004, Fall/Winter, 2004, p. 18.

KHALILZADEH, E.; VAF AEI, S.G.; HASANNEJAD, H.; GHADERI, A.; GHADERI, S.; HAMIDIAN, G.; MAHMOUDI, R.; ESHGI, D.; ZANGISHEH, M. Antinociceptive effects, acute toxicity and chemical composition of *Vitex agnus-castus* essential oil. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 5:(3), p. 218-30, 2015.

KHAN, M.; SHAH, A.J.; GILANI, A.H. Insight into the bronchodilator activity of *Vitex negundo*. **Pharm Biol**. v. 53(3), p. 340-4, 2015.

KHANI, A.; ASGHARI, J. Insecticide activity of essential oils of *Mentha longifolia*, *Pulicaria gnaphalodes* and *Achillea wilhelmsii* against two stored product pests, the

flour beetle, *Tribolium castaneum*, and the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Insect Science**, v.1, p. 12-73, 2012.

KHANI, A.; HEYDARIAN, M. Fumigant and repellent properties of sesquiterpene-rich essential oil from *Teucrium polium* subsp. *capitatum* (L.), **Asian Pac. J. Trop. Med.**, v. 7, p. 956-961. **2014**.

KIRTIKAR, K.R.; BASU, B.D. **Indian Medicinal Plants** Basu, L.M, Allahabad, India, p. 1935-1944. 1991.

KIUCHI, F.; MATSUO, K.; ITO, M.; QUI, T.K.; HONDA, G. New norditerpenoids with trypanocidal activity from *Vitex trifolia*. *Chem Pharm Bull*, v. 52, p. 1492–4, 2004.

KREMER, A. A. U.; CARON, H. A. U.; CAVERS, S. A. U; COLPAERT, N. A. U; GHEYSEN, G. A. U.; GRIBEL, R. A. U; LEMES, M. A. U.; LOWE, A. J. A. U.; MARGIS, R. A. U.; NAVARRO, C. A. U.; SALGUEIRO, F. T. I.; Monitoring genetic diversity in tropical trees with multilocus dominant markers. **Heredity**, v. 95, p. 274–280, 2005.

MAIA, A.C.C.M.; SOARES, F.C.C.; MARTINS JR, H.B.; BAPTISTA, E.R. *Vitex agnus castus*: Etnobotanical end etnopharmacological study. **Revista Virtual da Iniciação Acadêmica da UFPA**, v. 1, p. 15. 2001. <http://www.ufpa.br/revistaic>, acessada em 10 de fevereiro de 2017.

MALIK, W.; ASHRAF, J.; IQBAL, M. Z.; KHAN, A. A.; QAYYUM, A.; ABID, M. A.; NOOR, E.; AHMAD, M. Q.; ABBASI, G. H. Molecular Markers and Cotton Genetic Improvement: Current Status and Future Prospects. **Scientific World Journal**, 2014.

MARCELINO, F. C.; GUIMARAES, M. F. M.; BARROS, E. G. Detecção e quantificação de alimentos geneticamente modificados: o panorama brasileiro. **Revista Ceres**, v. 54, n. 313, p. 240-250, 2007.

MARTÍN, J.P.; SÁNCHEZ-YÉLAMO, M.D. Genetic relationships among species of the genus *Diplotaxis* (Brassicaceae) using inter-simple sequence repeat markers **Theor Appl Genet**. v. 101, p. 1234–1241. 2000.

MARTINS, C.R.; JESUS JUNIOR, L.A. **Evolução da produção de coco no Brasil e o comércio internacional - Panorama 2010**. Aracaju: Embrapa – CPTAC, 2011. 27 p. Disponível em: < www.cpatc.embrapa.br > Acesso em: 12 maio 2015.

MATHANKUMAR, M.; TAMIZHSELVI, R.; MANICKAM, V.; PUROHIT, G. Assessment of Anticarcinogenic Potential of *Vitex trifolia* and *Triticum aestivum* Linn by In Vitro Rat Liver Microsomal Degranulation. **Toxicol Int**. v. 22(1), p. 114-8, 2015.

MEENA, A.K.; NIRANJAN, U.S.; RAO, M.M.; PADHI, M.M.; BABU, R..A review of the important chemical constituents and medicinal uses of *Vitex* genus. **Asian J. Tradit. Med**, v. 6(2): p. 54-60. 2011.

MEHLHORN, H.; SCHMAHL, G.; SCHMIDT, J. Extract of the seeds of the plant *Vitex agnus castus* proven to be highly efficacious as a repellent against ticks, fleas, mosquitoes and biting flies. **Parasitol Res**, v. 95(5), p. 363-5, 2005.

MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: Editora UFRGS. 1998. p. 141.

MIN-SEOK, O.; JI-YEON, Y.; MIN-GI, K. (2014) Acaricidal activities of beta-caryophyllene oxide and structural analogues derived from *Psidium cattleianum* oil against house dust mites. **Pest Management Science**, v.70, p.757-762, 2014.

MIRISOLA FILHO, L. A. **Cultivo de coco Anão**. Viçosa, MG: Aprenda Fácil. 2002. 344 p.

MOHANBABU, A.V.; KISHORE, M.K.; CHANDRASHEKAR, B.R.; PRADEEPA, H.D.; CHRISTOPHER, R.; NANDIT, P.B. Evaluation of potential anti-amnesic activities of aqueous extract of *Vitex trifolia* leaves against scopolamine induced amnesia and in normal rats. **J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol.** v. 26(2), p. 201-9, 2015.

MOHAMED, E.I.B., SAMIR, A.M.A. Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi, **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 776–782, 2014.

MOLDENKE, H.N..**A Résumé of the Verbenaceae, Avicenniaceae, Stilbaceae, Symphoremaceae and Eriocaulaceae of the world as to valid taxa, geographic distribution and synonymy**. H. N. Moldenke, New Jersey 1959. p. 1-495

MOORE, D.; ALEXANDER, L.; HALL, R.A. The coconut mite, *Eriophyes guerreronis* Keifer in St Lucia yield losses and attempts to control it with acaricide, polybutene e *Hirsutella* fungus. **Trop. Pest Manag**, v. 35, p. 83-89, 1989.

MOMEN, F.M.; RAHMAN, H.A.A.; SAMOUR, E.A. Acaricidal activity of *Melissa officinalis* oil and its formulation on *Tetranychus urticae* and the predatory mite *Neoseiulus californicus* (Acari: *Tetranychidae* and *Phytoseiidae*), **Acta Phytopathol. Entomol. Hung.** v. 49, p. 95-115. 2014.

MONTEIRO, L.C.C.F.; Araujo, E.I.M.; De Oliveira, A.M.S.; Alves, L.A.; Bertini, L.M. Atividade antioxidante, teor de fenóis e atividade larvicida frente ao *Aedes aegypti* de *Vitex gardneriana* Schauer. **Blucher Chemistry Proceedings**, v. 3, p.292 – 300, 2015.

MORAES, G.J.; ZACARIAS, M.S. Use of predatory mites for control of eriophyid mites. In: FERNANDO, L.C.P.; MORAES, G.J.; WICKRAMANANDA, I.R. (eds.),

Proceedings of the International Workshop on Coconut Mite (*Aceria guerreronis*). Sri Lanka: Coconut Research Institute, 2002. p. 78-88.

____; FLECHTMANN C.H.W. **Manual de acarologia**: Acarologia básica e ácaros de plantas cultivadas no Brasil. Ribeirão Preto: Holos, 2008. 308 p.

MORALES-DEL-RIO, J.A.; GUTIÉRREZ-LOMELÍ, M.; ROBLES-GARCÍA, M.A.; AGUILAR, J.A.; LUGO-CERVANTES, E.; GUERRERO-MEDINA, P.J.; RUIZ-CRUZ, S.; CINCO-MOROYOQUI, F.J.; WONG-CORRAL, F.J.; DEL-TORO-SÁNCHEZ, C.L. Anti-Inflammatory activity and changes in antioxidant properties of leaf and stem extracts from *Vitex mollis* Kunth during In vitro digestion. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. p. 8, 2015.

NAGAOKA, T.; OGIHARA, Y. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. **Theor.Appl. Genet**. v. 94, p.597-602. 1997.

NAIR, C.P.R. Status of eriophyid mite *Aceria guerreronis* Keifer. In: FERNANDO, L.C.P.; MORAES, G.J.; WICKRAMANANDA, I.R. (eds.). **Proceedings of the International Workshop on Coconut Mite (*Aceria guerreronis*)**. Sri Lanka: Coconut Research Institute, 2002. p. 9-12.

NEWMAN, D.J.; CRAGG G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **J. Nat. Prod**, v. 75, p. 311–335, 2012.

NEBIE, R.H.C.; YAMEOGO, R.T.; BELANGER, A. Chemical composition of essential oils of *Vitex diversifolia* Bak. from Burkina Faso, **Journal of essential oil research**, v. 17, p. 276-277, 2005.

NGOZI N.; OKOYE, F.; LAI, D.; DEBBAB, A.; KAISER, M.; BRUN, R.; PROKSCH, P. Evaluation of the in vitro trypanocidal activity of methylated flavonoid constituents of *Vitex simplicifolia* leaves **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v. 15, p.82, 2015.

NYILIGIRA, E.; VILJOEN, A.M.; BAÕER, K.H.C.; ÅZEK, T.; VAN VUUREN, S.F. Essential oil composition and in vitro antimicrobial and anti-inflammatory activity of South African *Vitex* species, **South African Journal of Botany**, v. 70, p. 611–617, 2004.

NTALLI, N.G.; FERRARI, F.; GIANNAKOU, I.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U. Phytochemistry and Nematicidal Activity of the Essential Oils from 8 Greek Lamiaceae Aromatic Plants and 13 Terpene Components, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 7856–7863, 2010.

NWODO, N.; OKOYE, F.; LAI, D.; EBBAB, A.D.; KAISER, M.; BRUN, R.; PROKSCH, P. Evaluation of the in vitro trypanocidal activity of methylated constituents of *Vitex simplicifolia* leaves. **BMC Complement Altern Med**. v. 26, p. 15:82, 2015.

O'MAILLE, P.E.; CHAPPELL, J.; NOEL, J.P. Biosynthetic potential of sesquiterpene synthases: Alternative products of tobacco 5-epi-aristolochene synthase, **Arch. Biochem. Biophys.** v. 15; 448(1-2), p. 73–82. 2006.

ONO, M.; YAMAMOTO, M.; YANAKA, T.; ITO, Y.; NOHARA, T. Ten new labdane-type diterpenes from the fruit of *Vitex rotundifolia*. **Chem Pharm Bull**, v. 49, p. 82–6. 2001.

ONO, M.; MASUOKA, C.; ITO, Y.; YOSHIMITSU, H.; NOHARA, T. Studies on the constituents from the fruits of *Vitex rotundifolia*. **Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen** Yoshishu. v. 42, p. 445–50. 2000.

ONO, M.; YAMASAKI, T.; KONOSHITA, M.; IKEDA, T.; OKAWA, M.; KINJO, J.. Five new diterpenoids, viteagnusins A-E, from the fruit of *Vitex agnus-castus*. **Chem. Pharm. Bull.** v. 56, p. 1621–4, 2008.

ONO, M.; ITO, Y.; NOHARA, T. Four new halimane-type diterpenes, vitetrifolins D-G, from the fruit of *Vitex trifolia*. **Chem Pharm Bull.** v.49, p. 1220–2, 2001.

ORWA, C.; MUTUA, A.; KINDT, R.; JAMNADASS, R.; ANTHONY, S. **Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0.** World Agroforestry Centre, Kenya, 2009.

PAGE, R.D.M.). TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. **Comput. Appl. Biosci.** v. 12, p. 357-358. 1996.

PALLINI, A.; JANSSEN, A.; SABELIS, M.W. Odour-mediated responses of phytophagous mites to conspecific and heterospecific competitors, **Oecologia**, v. 110, p. 179-185, 1997.

PAUL, A.; MATHEW, T.B. Loss of husk, quality of fibre and coir due to the infestation of coconut eriophyid mite (*Aceria guerreronis* Keifer). **J. Plant Crops**, v. 30, p. 58-60, 2002.

PAVLICEK A.; HRDA, S.; FLEGR, J. FreeTree – freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree 32 robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. **Folia Biol.** v. 45, p. 97-99. 1999.

PINTO A.C., SILVA D.H.S., BOLZANI V.S., LOPES N.P., EPIFANIA R.A. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. **Química nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

PEPINELI, A.C., STRIOTO D.K, MARINELLI, G.C.; MANGOLIN, C.A.; Silva M.F.P. Seleção de primers para análise de inter simple sequence repeats na cultivar 'itália' de *Vitis vinífera* L. **Ciência Téc. Vitiv.** v. 29(2), p. 81-87. 2014.

Plowden, C.C. **A Manual of plant names.** London: GeorgeAllen and Unwin Ltd. 1968

PULLAIAH, T.; NAIDU, K.C. **Antidiabetic plants in India and herbal based antibiotic research Recency**, New Delhi . 2003. p. 314-315.

REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**. v. 128, p. 9–17, 2002.

REGNAULT-ROGER C.; VINCENT C.; ARNASON J.T. Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. **Annual Review of Entomology**, Cidade, v. 57, p. 405-424, 2012.

RIMPLER, H. Pterosteron, polypodin B and neues ecdysonartiges steroids (viticosteron E) aus *Vitex megapotamica*. **Tetrahedron Lett.** v. 5, p. 329–333, 1969.

RIMPLER, H. Phytoecdysones and iridoids from *Vitex megapotamica*, **Archiv. der Pharmazie**, v. 10, p. 746–751, 1972.

ROBERTSON, J.L.; RUSSELL, R.M.; PREISLER, H.K.; SAVIN, N.E. **Pesticide bioassays with Arthropods**. CRC Boca Raton, Florida, USA, 2007, p. 1-199.

RODRIGUES, T.B. QTLs identification in common bean through SSR markers affected by natural selection. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 5, p. 1351-1357, 2007.

RODRÍGUEZ-LÓPEZ, V.; FIGUEROA-SUÁREZ, M.Z.; RODRÍGUEZ, T.; ARANDA, E. Insecticidal activity of *Vitex mollis*, v. 78(1), p. 37-9, 2007.

ROSSI, Y.E.; PALACIOS, S.M. Insecticidal toxicity of *Eucalyptus cinerea* essential oil and 1,8-cineole against *Musca domestica* and possible uses according to the metabolic response of flies. **Industrial Crops and Products**, v.63, p.133–137, 2015.

RUDRAPAUL, P.; SARMA, I.S.; DAS, N.; DE, U.C.; BHATTACHARJEE, S.; DINDA, B. New flavonol methyl ether from the leaves of *Vitex peduncularis* exhibits potential inhibitory activity against *Leishmania donovani* through activation of iNOS expression. **Eur. J. Med. Chem.** v. 24;87, p. 328-35, 2014.

SAHAF, B.Z.; MOHARRAMIPOUR, S. Fumigant toxicity of *Carum copticum* and *Vitex pseudo-negundo* essential oils against eggs, larvae and adults of *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Pest Science**, v 81, p. 213 -220, 2008.

SAHAF, B.Z.; MOHARRAMIPOUR, S.; MESHKATALSADAT, M.A. Fumigant toxicity of essential oil from *Vitex pseudo-negundo* against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus oryzae* (L.), **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 11, p. 175–179, 2008.

SAMBROOK, J.; FRITCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a Laboratory Manual**. 2 ed. Cold Spring harbor Laboratory Press, USA. 1989.

SARIKURKCU, C.; ARISOY, K.; TEPE, B.; ÇAKIR, A.; ABALI, G.; METE, E. Studies on the antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of *Vitex agnus castus* L. fruits from Turkey, **Food and Chemical Toxicology**, v. **47**, p. 2479–2483, 2009.

SAS INSTITUTE. SAS/STAT User's guide, version 8.02, TS level 2 MO. **SAS Institute Inc.**, Cary, North Carolina, 2002.

SCHAUER, J.C. Verbenaceae,. In: D.C. **Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis, pars 11**. p. 522-700. 1847.

SCHAUER, J.C. Verbenaceae. In: C. F. P. VON MARTIUS & A. G. EICHLER (Eds.): **Flora Brasiliensis** . Typographia Regia, Munchen, Wien, Leipzig. v.9: p. 169-308. 1851.

SENN FILHO, J.G.; DURINGER, J.M.; MAIA, G.L.A.; TAVARES, J.F.; XAVIER, H.S.; CUNHA, E.V.L.; SILVA, M.S.; BARBOSA FILHO, J.M. Ecdysteroids from *Vitex* Species: Distribution and compilation of their ¹³C-NMR spectral data. **Chemistry & Biodiversity**, v.5, p. 707-713, 2008.

SENA FILHO, J.G.; RABBANI, A.R.C.; SILVA, T.R.S.; SILVA, A.V.C.; SOUZA, I.A.; SANTOS, M.J.B.A.; JESUS, J.R.; NOGUEIRA, P.C.L.; DURINGER, J.M. Chemical and molecular characterization of fifteen species from the *Lantana* (Verbenaceae) genus. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 45, p. 130–137. 2012.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, PR. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 6.ed. Porto Alegre/Florianópolis, 2001, p. 1-1102.

SINGH, N.K.; VEMU, J.B.; NANDI, A.; SINGH, H.; KUMAR, R.; DUMKA, V.K. Acaricidal activity of *Cymbopogon winterianus*, *Vitex negundo* and *Withania somnifera* against synthetic pyrethroid resistant *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Parasitol Res**, v. 113, p. 341–350, 2014a.

____; JYOTI.; VEMU, B.; NANDI, A.; SINGH, H.; KUMAR, R.; DUMKA, V.K. Laboratory assessment of acaricidal activity of *Cymbopogon winterianus*, *Vitex negundo* and *Withania somnifera* extracts against deltamethrin resistant *Hyalomma anatolicum*. **Exp Appl Acarol**. v. 63(3), p. 423-30, 2014b.

SIQUEIRA, L.A.; ARAGÃO, W.M.; TUPINAMBÁ, E.A. 2002. **A introdução do coqueiro no Brasil**: importância histórica e agronômica. Aracaju: Embrapa – CPTAC, 2002. 24 p. Disponível em: <<http://www.cpatc.embrapa.br/download/Documentos47.doc>> Acesso em 13 maio 2015.

SONIBARE, O.O.; EFFIONG, I.; OLADOSU, I.A. Chemical Constituents and Antimicrobial activity of the Essential Oil of *Vitex doniana* Sweet (Verbernaceae), **Journal of essential oil bearing plants**, v. 12, p. 185-188, 2009.

SOKAL, R.R.; MICHENER, C.D. A statistical method for evaluating systematic relationships, **Univ. of Kans. Sci. Bull.**, v. 38, p. 1409–1438. 1958.

STOJKOVIC, D.; SOKOVIC, M.; GLAMOC'LIIJA, J.; DZAMIC, A.; C'IRIC, A.; RISTIC, M.; GRUBIŠIC, D. Chemical composition and antimicrobial activity of *Vitex agnus-castus* L. fruits and leaves essential oils, **Food Chemistry**, v. 128, p. 1017–1022, 2011.

TANDON, V.R.; GUPTA, R.K. *Vitex negundo* Linn. (VN) leaf extract as an adjuvant therapy to standard anti-inflammatory drugs. *Indian J Med Res.* v. 124, p. 447–50. 2006.

TANDON, S.; MITTAL, A.K.; PANT, A.K. Insect growth regulatory activity of *Vitex trifolia* and *Vitex agnus-castus* essential oils against *Spilosoma obliqua*. **Fitoterapia**, v.79(4), p. 283-6, 2008.

TANG, Y.; CHEN, G.; ZHANG, J. Chemical Composition and the Regional Effect of *Vitex negundo* Linn. var. *cannabifolia* (Sieb.et Zucc.) Hand.-Mazz. Essential oils and the Regional Effect on it, **Journal of the chemical society of Pakistan**, v. 33, p. 744-746, 2011.

TIETJEN, I.; GATONYE, T.; NGWENYA, B.N.; NAMUSHE, A.; SIMONAMBANGA, S.; MUZILA, M.; MWIMANZI, P.; XIAO, J.; FEDIDA, D.; BRUMME, Z.L.; BROCKMAN, M.A.; ANDRAE-MAROBELA, K. *Croton megalobotrys* Müll Arg. and *Vitex doniana* (Sweet): Traditional medicinal plants in a three-step treatment regimen that inhibit in vitro replication of HIV-1. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 191, p. 331–340, 2016.

TIWARI, N.; THAKUR, J.; SAIKIA, D.; GUPTA, M.M. Antitubercular diterpenoids from *Vitex trifolia*. **Phytomedicine**, v. 20, p. 605–10, 2013.

TOPPA, E.V.B.; JADOSKI, C. J. O uso dos marcadores moleculares no melhoramento Genético de plantas. **Scientia Agraria Paranaensis – SAP Mal. Cdo. Rondon**, v. 12, n. 1, p.1-5, 2013.

TOPLAN, G.G.; KURKCUOGLU, M.; BASER, K.H.C. Composition of the essential oils from samples of *Vitex agnus-castus* L. growing in Turkey. **Journal of essential oil research**, v.27, p.337-342, 2015.

TOURNEFORT, J. P. **Institutiones Rei Herbariae**: Editio Tertia, Paris. 1719. v.1, p. 603.

TRABOULSI, A.F.; TAOUBI, K.; EL-HAJ, S.; BESSIERE, J.M.; RAMMAL, S. Insecticidal properties of essential plant oils against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae). **Pest Management Science**, v. 58 (5), p.491-5, 2014.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P.D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography, **Journal of Chromatography**, v. 11, p. 463-471, 1963

VIETMEYER, N.D. Lesser-known plants of potential use in agriculture and forestry. **Science**, Washington, v. 232, p. 1379-1384, 1986.

VIJAYAN, K. [Review] Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Polymorphism and Its Application in Mulberry Genome Analysis, **Int. J. Indust. Entomol.** v. 10, No. 2, p. 79-86. 2005.

WANG, C.F.; YANG, K.; ZHANG, H.M.; CAO, J.; FANG, R.; LIU, Z.L.; DU, S.S.; WANG, Y.Y.; DENG, Z.W.; ZHOU, L. Components and insecticidal activity against the Maize Weevils of *Zanthoxylum schinifolium* fruits and leaves, **Molecules**, v. 16, p. 3077-3088, 2013.

WANG, Y.; LI, D.; CHENG, N.; GAO, H.; XUE, X.; CAO, W.; SUN, L. Antioxidant and hepatoprotective activity of *Vitex honey* against paracetamol induced liver damage in mice. **Food Funct.** v. 6, p. 2339, 2015.

XIE, J.C.; SHUN, B.G.; WANG, X.B. Preparation, analysis and flavoring of essential oil of *Vitex negundo* L. var. *heterophylla* (Franch.) Rehd, **Food Res.** v. 27, p. 89–93, 2006.

ZANATTA, L.; SOUSA, E.; CAZAROLLI, L.; JUNIOR, A.C.; PIZZOLATTI, M.G.; SZPOGANICZ, B.; SILVA, F.R.M.B. Effect of crude extract and fractions from *Vitex megapotamica* leaves on hyperglycemia in alloxan-diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 151–155, 2007.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA D. Genome by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**. v. 20, p. 176-183. 1994.

ZHANG, S.F.; DONG, Q.F.; HU, C.; HAO, Y.; QU, L.; LIAN, J.F. Chemical composition of flower volatile oil of wild *Vitex negundo* var. *heterophylla* from Shijiazhuang, **Chin. J. Exp. Tradit. Med. Form.** v. 19, p. 151–153, 2013.

ZHENG, C.J.; LI, H.Q.; REN, S.C.; XU, C.L.; RAHMAN, K.; QIN, L.P.; SUN, Y.H. Phytochemical and pharmacological profile of *Vitex negundo*. **Phytother Res.** v.29(5), p. 633-47, 2015.