

**ISABELLA OLIVEIRA BRITTO**

**FITOTOXICIDADE, POTENCIAL INSETICIDA E SELETIVIDADE A ORGANISMOS  
NÃO ALVOS DE *Ficus carica* Linn (MORACEAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: João Paulo Viana Leite

**VIÇOSA – MINAS GERAIS  
2020**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa – Câmpus Viçosa**

T

Britto, Isabella Oliveira, 1995-  
B862f Fitotoxicidade, potencial inseticida e seletividade a  
2020 organismos não alvos de *Ficus carica* Linn (Moraceae) / Isabella  
Oliveira Britto. – Viçosa, MG, 2020.  
116 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: João Paulo Viana Leite.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Produtos químicos agrícolas. 2. Extratos vegetais. 3.  
*Ficus carica*. 4. *Euschistus heros*. 5. Inseticidas.  
6. Mortalidade. 7. Segurança. 8. Seletividade. I. Universidade  
Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia  
Molecular. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica  
Aplicada. II. Título.

CDD 22. ed. 632.95

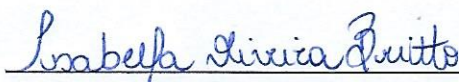
ISABELLA OLIVEIRA BRITTO


FITOTOXICIDADE, POTENCIAL INSETICIDA E SELETIVIDADE A ORGANISMOS  
NÃO ALVOS DE *Ficus carica* Linn (MORACEAE)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 19 de fevereiro de 2020.

Assentimento:

  
\_\_\_\_\_  
Isabella Oliveira Britto  
Autora

  
\_\_\_\_\_  
João Paulo Viana Leite  
Orientador

*A Deus;*  
*Aos meus pais Humberto e Assunção;*  
*Á minha Vó Dora e meu primo Denis;*  
*Aos meus familiares e namorado;*  
*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço...

A Deus, minha fonte inesgotável de fé, de força, de pedidos e agradecimentos ao longo de toda minha vida.

Aos meus pais Humberto e Assunção pelo amor incondicional e por me mostrarem que a maior herança que eles podem me deixar é minha educação.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular por me acolherem desde 2013, oferecendo recursos e infraestrutura para a realização de meus trabalhos.

Ao prof. João Paulo Viana Leite pela valorosa orientação ao longo de todos estes anos em que estive no Laboratório de Biodiversidade, pelos ensinamentos transmitidos e pela oportunidade de ser integrante do GRUPO BIOPROS.

Ao prof. Eugênio Eduardo de Oliveira pelo grande aprendizado em Fisiologia de Insetos, pela atenciosa coorientação e pelas importantes sugestões feitas ao longo dos ensaios biológicos.

A Graziela Domingues por toda dedicação em me ensinar como trabalhar com os insetos e por me ajudar ao longo da pesquisa sempre de maneira muito solícita.

A Sabrina Helena por ter sido pós-doutoranda do Laboratório, sendo minha parceira de pesquisa em um momento vital do mestrado. Sua ajuda foi providencial nesse período.

A Iorrana Vieira Salustiano pelas incontáveis análises no HPLC, sempre muito carinhosa e paciente.

Ao Markus Kohlhoff do Laboratório de Química de Produtos Naturais Bioativos, Centro de Pesquisas René Rachou, pela realização das análises por LC-HRMS.

Ao Huarlen Balbino pela grande ajuda nos experimentos de fitotoxicidade.

A Janaína e Jéssica por terem iniciado o estudo com a *Ficus carica* no Laboratório de Biodiversidade, proporcionando a oportunidade de continuidade em outras pesquisas com essa espécie.

Aos amigos do Laboratório de Biodiversidade pelo companheirismo e ajuda diária.

Ao time do Laboratório de Fisiologia e Neurobiologia de Invertebrados da UFV por ter me acolhido ao longo dos ensaios biológicos, em especial ao Pedro Toledo, quem me auxiliou de maneira incansável e dedicada no longo trabalho com as joaninhas e abelhas e ao Luis Viteri pelo experimento com os crisopídeos.

Ao meu namorado Walberto pelo apoio, compreensão e por ser fonte inesgotável de incentivo e carinho.

Ao meu irmão Arthur por toda segurança transmitida.

A minha Vó Dora e ao meu primo Denis por serem minha força de pensamento e luz em meu caminho.

Aos meus familiares, de sangue e de coração, por torcerem por mim e pelas sinceras orações. Em especial minhas tias Gláucia, Claudia e Clelma.

As minhas amigas Ana Paula, Camila, Fernanda, Gislaine, Iorrana e Laís por não serem apenas parceiras de bancada, mas também da vida. O mestrado foi muito mais leve por ter a presença e a amizade de vocês.

Aos meus amores da República por compartilharem comigo os melhores anos da minha vida e por me apoiarem incansavelmente em minha caminhada.

Aos amigos que a Bioquímica me deu ao longo da minha jornada na UFV, os velhos e os novos petianos, e aos Vacilões por toda amizade. Vocês são presentes de Deus para mim e a distância já nos mostrou que é incapaz de nos separar.

Aos meus amigos de infância Isabella, Viviane e Leonardo por serem sempre presentes e nunca desistirem de mim.

Aos que se afastaram ao longo do caminho, mas foram importantes e forneceram forte aprendizado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

*“As mais belas figuras geométricas começam num ponto simples.” (Emmanuel)*

## RESUMO

BRITTO, Isabella Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2020. **Fitotoxicidade, potencial inseticida e seletividade a organismos não alvos de *Ficus carica* Linn (Moraceae)**. Orientador: João Paulo Viana Leite.

O uso incorreto de defensivos agrícolas convencionais tem impactado de forma negativa o meio ambiente, produtores rurais, consumidores e tem levado a busca de novas fontes de agroquímicos que sejam menos danosas, como defensivos oriundos de extratos vegetais. No presente trabalho, foi avaliada a potencial atividade inseticida da espécie vegetal *Ficus carica* e alguns de seus compostos isolados, investigando os componentes bioativos. Foram produzidos extratos a partir de folha (FCF) e galho (FCG) de *F. carica* por percolação exaustiva empregando etanol como solvente. Os extratos foram testados frente ao percevejo-marrom-da-soja no estágio adulto e no terceiro instar do desenvolvimento. Foi conduzida uma curva de mortalidade dose-resposta em ninfas no terceiro instar de *E. heros* e calculada a CL<sub>50</sub> dos extratos. FCG foi selecionado para a etapa de cromatografia em coluna de sílica-gel, isolamento e purificação. Os grupos resultantes, juntamente com FCG, foram analisados por HPLC-DAD. FCG e FCF foram estudados quimicamente por UHPLC-ESI-MS/MS. Os grupos mais promissores obtidos da cromatografia em coluna foram testados em ninfas de percevejo no valor da CL<sub>50</sub> do extrato de galho. A seletividade de FCG também foi estudada em relação ao alvo agrícola *Drosophila suzukii* e a segurança foi analisada nos insetos benéficos *Apis mellifera*, *Parthamona helleri*, *Eriopsis connexa*, *Coleomegilla maculata* e *Chrysoperla externa*. FCG e FCF não foram tóxicos para o percevejo-marrom adulto, mas apresentou elevada mortalidade contra as ninfas, de forma que a CL<sub>50</sub> fornecida pela curva de mortalidade foi 5,9 mg/mL. Os compostos majoritários dos grupos analisados por HPLC-DAD (G5, G6, G7, G8, G9, G18 e G20) foram duas furanocumarinas: psoraleno e bergapteno. Os grupos destinados a atividade biológica (G5, G7, G8, G18 e G20), com exceção de G20, mostraram mortalidade a cima de 50% e G7, grupo que detinha mistura das duas furanocumarinas, foi quem apresentou maior mortalidade mostrando que a ação inseticida do extrato de galho possivelmente está associada a presença das duas furanocumarinas. Os extratos FCG e FCF não foram tóxicos para *D. suzukii* e mostraram-se seguros para os insetos benéficos estudados. Logo, o extrato etanólico de galho de *F. carica* é seletivo para o

percevejo-marrom-da-soja *E. heros* e, ao mesmo tempo, seguro para os organismos não alvo estudados, podendo ser um potencial defensivo agrícola botânico utilizado como ferramenta para o controle de pragas.

**Palavras-chave:** Defensivo agrícola. Extrato de planta. *Ficus carica*. *Euschistus heros*. Percevejo. Inseticida. Mortalidade. Segurança. Seletividade.

## ABSTRACT

BRITTO, Isabella Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2020. **Phytotoxicity, insecticidal potential and selectivity to non-target organisms of *Ficus carica* Linn (Moraceae)**. Adviser: João Paulo Viana Leite.

The incorrect application of conventional agriculture pesticides has negatively impacted the environment, rural producers and consumers. In addition, it has led the research of new sources of agrochemicals that could be less harmful, as natural pesticides from plant extract. In this work, the insecticidal potential of *Ficus carica* and some of its isolated compounds were analyzed and its bioactive components were investigated. The extracts were produced from leaf (FCF) and branch (FCG) from *F. carica* by exhaustive percolation using ethanol as solvent. The extracts were tested against soybean stink bug, adult and at the third nymph. Moreover, the LC<sub>50</sub> was determined to third stage stink bug. The chromatography in silica gel solid phase column, isolation and purification were done in the FCG. Then, the resulting groups and FCG were analyzed by HPLC-DAD. FCF and FCG were studied by UHPLC-ESI-MS/MS. The most promising groups were tested on stink bug nymphs at crude extract correspondent LC<sub>50</sub> value. The selectivity of FCG was also studied at the agriculture target *Drosophila suzukii* and its security was analyzed in the beneficial insects *Apis mellifera*, *Parthamona helleri*, *Eriopis connexa*, *Coleomegilla maculata* and *Chrysoperla externa*. The extracts weren't toxic to adult stink bug, however showed high potential of mortality against nymphs, so that the LC<sub>50</sub> of FCG was 5,9 mg/mL. The major compounds of groups analyzed by HPLC-DAD (G5, G6, G7, G8, G18 and G20) were two furanocoumarins: psoralen and bergapten. The groups destined to biological activity (G5, G7, G8, G18 and G20), exception for G20, showed mortality above 50%. In addition, the G7, the one with two furanocoumarins, had the highest mortality. Therefore, it was a signal that the crude extract's insecticidal potential is possibly associated by the presence of the two furanocoumarins. FCG and FCF weren't toxic to *D. suzukii* and proved to be safe for the studied beneficial insects. In conclusion, the ethanolic extract of branch of *F. carica* is selective for *E. heros*, safe for the non-target organisms studied and can be a potential botanical agricultural defensive used as a tool for pest control.

**Keywords:** Pesticide. Plant extract. *Ficus carica*. *Euschistus heros*. Stink bug. Mortality. Safety. Selectivity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de desenvolvimento do percevejo-marrom <i>Euschistus heros</i> .....	28
Figura 2 – Estrutura dos principais compostos identificados a partir de <i>F. carica</i> .....	36
Figura 3 – Estrutura química do psoraleno e bergapteno .....	38
Figura 4 – Fotos de exemplares de <i>Ficus carica</i> , provenientes de cultivar na UFV ..	40
Figura 5 - Produção de extratos vegetais.....	41
Figura 6 - PLL e monitoramento de metabólitos secundários por CCD .....	42
Figura 7 - Coluna de sílica gel e armazenamento de frações .....	44
Figura 8 - Grupos de frações selecionados para teste biológico.....	45
Figura 9 - Ensaio de exposição por contato em percevejos adultos .....	47
Figura 10 - Ensaio de exposição por ingestão e contato simultâneos em percevejos adultos.....	48
Figura 11 - Ensaio de toxicidade que gerou a curva de mortalidade.....	49
Figura 12 - Teste de segurança dos extratos em joaninhas.....	51
Figura 13 - Teste de segurança dos extratos em abelhas .....	53
Figura 14 - Teste de Semente.....	54
Figura 15 – Mortalidade de <i>E. heros</i> adulto tratado com extratos de <i>F. carica</i> .....	56
Figura 16 – Mortalidade de ninfas de <i>E. heros</i> tratadas com extratos de <i>F. carica</i> ...	58
Figura 17 – Curva de mortalidade dose-resposta de ninfas de percevejo-marrom tratadas com extrato de <i>F. carica</i> .....	59
Figura 18 – Cromatogramas de íons extraídos obtido por UHPLC-ESI-MS/MS (modo positivo) para $m/z$ 187,0398 (psoraleno) e $m/z$ 217,0504 (bergapteno) das amostras A: FCG $t_R$ 19,9 minutos e B: FCF $t_R$ 22,2 minutos .....	62
Figura 19 – Perfil cromatográfico do extrato de galho de <i>F. carica</i> por HPLC/DAD com detalhes em UV 254 nm .....	64
Figura 20 – Perfil cromatográfico dos grupos G18 e G20 por CCD .....	67
Figura 21 – Cromatogramas referentes aos grupos de frações selecionados para análise em HPLC/DAD – G5, G6, G7, G8, G9, G18 e G20.....	69
Figura 22 – Mortalidade das ninfas em terceiro instar tratadas com os grupos .....	71
Figura 23 - Mortalidade de <i>Drosophila suzukii</i> tratadas com extratos de <i>Ficus carica</i> .....	74

Figura 24 – Sobrevivência de <i>Parthamona helleri</i> e <i>Apis mellifera</i> tratadas com extratos de <i>F. carica</i> .....	77
Figura 25 – Fitotoxicidade do extrato de galho de <i>F. carica</i> sobre mudas de tomateiro .....	85
Figura 26 – Fitotoxicidade dos extratos de galho de <i>F. carica</i> aplicados uma semana após o transplântio em mudas de tomateiro .....	86
Figura 27 - Plantas de tomateiro tratadas com extrato de galho de <i>F. carica</i> aplicados uma semana após o transplântio .....	87
Figura 28 – Teste de semente de soja tratada com extrato etanólico de galho de <i>F. carica</i> .....	88
Figura 29 – Mortalidade de <i>E. heros</i> adulto tratado com os extratos de <i>Anadenanthera peregrina</i> .....	113
Figura 30 – Mortalidade de <i>E. heros</i> adulto tratado com extratos de <i>Maclura tinctoria</i> .....	114
Figura 31 – Mortalidade de <i>E. heros</i> adulto tratado com extratos de <i>Maclura tinctoria</i> .....	115

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Nova classificação de agrotóxicos no Brasil .....	26
Tabela 2 - Rendimento da produção dos extratos vegetais de <i>F. carica</i> (L.) por meio de percolação exaustiva.....	55
Tabela 3 - Compostos identificados em FCG e FCF por UHPLC-ESI-MS/MS.....	63
Tabela 4 - Rendimento dos grupos de frações obtidos da coluna cromatográfica de sílica gel .....	66
Tabela 5 - Consumo de alimento pelas abelhas em gramas .....	78
Tabela 6 - Mortalidade de joaninhas tratadas com extratos de <i>F. carica</i> .....	80
Tabela 7 - Mortalidade de crisopídeo tratados com extratos de <i>Ficus carica</i> .....	81

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SÍMBOLOS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
B.O.D	Estufa Incubadora
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CL <sub>50</sub>	Concentração do extrato que mata 50% dos insetos
CL <sub>90</sub>	Concentração do extrato que mata 90% dos insetos
EIC	Cromatograma de íon extraído
FCF	Extrato Etanólico de Folha de <i>Ficus carica</i>
FCG	Extrato Etanólico de Galho de <i>Ficus carica</i>
H <sub>2</sub> O	Água
HPLC-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Detector com
Arranjo Diodo	
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais
Renováveis	
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
UHPLC-HRMS	Cromatografia Líquida de Ultra-Performance acoplada à
	Espectrometria de Massas de Alta Resolução
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
PIB	Produto Interno Bruto
PLL	Partição Líquido-Líquido
t <sub>r</sub>	Tempo de retenção
UFV	Universidade Federal de Viçosa

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	18
2.	REVISÃO DE LITERATURA .....	20
2.1.	Biodiversidade e Bioeconomia brasileira .....	20
2.2.	Bioprospecção de produtos naturais .....	22
2.3.	Cenários do agronegócio e agropecuária nacional .....	23
2.4.	Uso de agrotóxicos .....	24
2.5.	Fontes alternativas de produção de defensivos agrícolas .....	28
2.6.	Legislação - Biodefensivos .....	33
2.7.	<i>Ficus carica</i> Linn.....	34
2.8.	Psoraleno e bergapteno .....	37
3.	OBJETIVOS .....	39
3.1.	Objetivo geral .....	39
3.2.	Objetivos específicos.....	39
4.	METODOLOGIA.....	40
4.1.	Espécie vegetal avaliada.....	40
4.2.	Acesso e produção de extratos de <i>Ficus carica</i> .....	40
4.3.	Estudo fitoquímico do extrato de galhos de <i>F. carica</i> .....	41
4.3.1.	Fracionamento por partição líquido-líquido (PLL).....	41
4.3.2.	Análise dos extratos de <i>F. carica</i> por UHPLC-ESI-MS/MS .....	42
4.3.3.	Isolamento, purificação e identificação de metabólitos secundários do extrato ativo de galho de <i>F. carica</i> .....	43
4.3.4.	Análise do perfil fitoquímico por HPLC-DAD .....	44
4.4.	Obtenção dos insetos .....	46
4.5.	Avaliação da ação inseticida .....	46

4.5.1. Toxicidade dos extratos vegetais de <i>F. carica</i> em percevejos adultos por exposição por contato .....	46
4.5.2. Toxicidade dos extratos vegetais de <i>F. carica</i> em percevejos adultos por exposição por ingestão e contato simultâneos.....	47
4.5.3. Toxicidade dos extratos etanólicos de galho e folha de <i>F. carica</i> (FCG e FCF) em <i>E. heros</i> no terceiro instar .....	48
4.5.4. Toxicidade dos grupos de frações contendo cumarinas em <i>E. heros</i> terceiro instar	49
4.6. Toxicidade dos extratos vegetais FCG e FCF em relação ao alvo <i>Drosophila suzukii</i> .....	50
4.7. Estudo ecotoxicológico do efeito dos extratos vegetais FCG e FCF em organismos não alvos .....	50
4.7.1. Toxicidade dos extratos vegetais sobre <i>Coleomegilla maculata</i> e <i>Eriopsis connexa</i> .....	50
4.7.2. Toxicidade dos extratos vegetais sobre <i>Chrysoperla externa</i> .....	51
4.7.3. Teste de toxicidade oral aguda nos extratos vegetais sobre <i>Apis mellifera</i> e <i>Parthamona helleri</i> .....	52
4.8. Avaliação da fitotoxicidade do extrato de galho de <i>F. carica</i> em mudas de tomateiro <i>Solanum lycopersicum</i> L. cultivar Santa Cruz .....	53
4.9. Avaliação da fitotoxicidade do extrato de galho de <i>F. carica</i> na germinação e no desenvolvimento das plântulas de soja: teste de semente .....	53
4.10. Análise estatística.....	54
4.11. Aprovação ética.....	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
5.1. Coleta do material vegetal e produção dos extratos.....	55
5.2. Atividade inseticida dos extratos vegetais de <i>F. carica</i> frente a percevejo-marrom adulto .....	55
5.3. Avaliação da toxicidade dos extratos vegetais de <i>F. carica</i> em <i>E. heros</i> no terceiro instar.....	57

5.3.1. Curva de mortalidade .....	58
5.4. Estudo fitoquímico de <i>Ficus carica</i> .....	61
5.4.1. Análise dos extratos vegetais de <i>F. carica</i> por UHPLC-ESI-MS/MS .....	62
5.4.2. Monitoramento por HPLC/DAD do extrato ativo FCG .....	63
5.4.3. Isolamento e identificação de compostos da fração ativa .....	64
5.5. Avaliação da toxicidade de grupos de frações contendo cumarinas de <i>F. carica</i> em ninfas de percevejo .....	71
5.6. Avaliação da toxicidade dos extratos vegetais frente à mosca <i>Drosophila suzukii</i> .....	73
5.7. Avaliação da segurança dos extratos em insetos benéficos .....	75
5.7.1. Avaliação da segurança dos extratos em relação às abelhas .....	75
5.7.2. Avaliação da segurança dos extratos em relação às joaninhas .....	80
5.7.3. Avaliação da segurança dos extratos em relação aos crisopídeos .....	80
5.8. Efeito fitotóxico do extrato de galho de <i>F. carica</i> .....	83
5.8.1. Avaliação de Fitotoxicidade de FCG em tomateiro .....	83
5.8.2. Avaliação da fitotoxidez de FCG em germinação e desenvolvimento de plântulas de soja – teste de semente .....	87
6. CONCLUSÃO .....	91
7. BIBLIOGRAFIA .....	92
Apêndice A: Perspectiva em Bioprospecção .....	109
1. Acesso e produção dos extratos vegetais de <i>Maclura tinctoria</i> e <i>Anadenanthera peregrina</i> .....	109
2. Avaliação da ação inseticida .....	110
2.1. Triagem dos extratos vegetais por avaliação da toxicidade em <i>E. heros</i> (F.) adultos .....	110
2.1.1. Toxicidade dos extratos vegetais em percevejos adultos por exposição por contato .....	110
2.1.2. Toxicidade dos extratos vegetais em percevejos adultos por exposição por ingestão e contato simultâneos .....	111

3. Resultado da triagem da atividade inseticida dos extratos vegetais frente ao percevejo-marrom adulto .....	112
---	-----

## 1. INTRODUÇÃO

Em função da diferença climática brasileira e a primordial localização do Brasil entre os trópicos, as plantações agrícolas nacionais estão sujeitas à ação de diversos agentes patogênicos. De modo a evitar o ataque desses organismos que geram grandes prejuízos econômicos ao setor do agronegócio, são aplicados defensivos agrícolas (PINTO et al, 2016). Dentre as diversas classes de agroquímicos existentes, os produtos botânicos enquadram-se na classe dos orgânicos e tem recebido bastante visibilidade do mercado em função de sua baixa toxicidade em relação aos produtos convencionais, cujo uso indiscriminado tem implicado em forte desequilíbrio do ecossistema (BOHMONT, 2000; DAYAN, CANTRELL e DUKE, 2009; PINTO et al, 2016; ISMAN, 2017).

A Ecotoxicologia é a área da ciência destinada ao estudo dos efeitos tóxicos provocados por xenobióticos sobre organismos e ecossistemas aquáticos e terrestres, sendo de vital importância que seja seguida por pesquisadores que estejam conduzindo estudos na área de produtos agrícolas (BIOTOX AMBIENTAL, 2019). Fontes alternativas de produção de defensivos agrícolas, como os extratos botânicos, já foram bastante populares e o interesse em sua pesquisa e desenvolvimento de novos bioprodutos tem retornado. Extratos botânicos representam maneiras de controle menos danosas ao meio ambiente e, por conseguinte, acumulam-se em menor quantidade nos vegetais e solos (MENEZES, 2005, ISMAN e GRIENEISEN, 2014, BENELLI, 2017, CAMPOS et al, 2019).

O cenário de aproveitamento sustentável da biodiversidade coloca o Brasil em posição privilegiada, uma vez que é considerado um país megabiodiverso e detentor da maior biodiversidade do planeta, o que em números representa 20% das espécies pertencentes à fauna e flora (BRASIL, 2018). Desse modo, as florestas são fontes estratégicas para investir na descoberta de novos “defensivos agrícolas” para agricultura, uma vez que elas possuem um imenso patrimônio genético que precisa ser estudado e com potenciais moléculas químicas com atividade biológica para este setor (CASANOVA e COSTA, 2017; CAMPOS et al, 2019). Importante ressaltar, que este estudo precisa ser conduzido à luz da legislação brasileira e com respeito à Biodiversidade (BRASIL, 2014).

O metabolismo secundário vegetal é fonte de uma grande diversidade de substâncias químicas bioativas (NEWMAN e CRAGG, 2016; CASANOVA e COSTA, 2017) e as classes conhecidas de compostos advindos deste metabolismo são alcaloides, flavonoides, taninos, cumarinas, quinonas, saponinas, cardiotônicos, triterpenos e esteroides (SIMÕES et al, 2017). As estratégias de Bioprospecção têm como objetivo explorar de forma sustentável a biodiversidade em busca de novos produtos naturais com valor econômico, social e ambiental agregado (CASANOVA e COSTA, 2017; SIMÕES et al, 2017).

Na investigação de plantas medicinais com potencial biológico, normalmente são utilizados processos de extração, fracionamento e purificação que promovem o isolamento e identificação de uma ou mais substância ativas (JUNIO et al, 2011; NIEMEYER, BELL e KOITHAN, 2013; CASANOVA e COSTA, 2017). Dentro da Bioprospecção, o estudo fitoquímico biomonitorado é uma estratégia de se investigar os compostos secundários responsáveis pelas atividades pesticidas. Deve-se tomar bastante cuidado visto que alguns compostos químicos de origem natural podem ser tóxicos para organismos não alvos como agentes polinizadores, predadores naturais e até mesmo os seres humanos, de maneira que se torna necessário avaliar a toxicidade dos extratos vegetais e de seus compostos isolados por meio de estudos de segurança e seletividade (NDAKIDEMI, MTEI e NDAKIDEMI, 2016, TSCHOEKE et al, 2019).

A espécie *Ficus carica* Linn (Moraceae) é popularmente conhecida como figueira e gameleira (MAWA, HUSSAIN e JATAN, 2013). Estudos fitoquímicos e farmacológicos revelaram uma enormidade de atividade biológica desempenhada pela planta em função da riqueza de compostos bioativos que ela detém (BOROLO, MOSTACERO e LÓPEZ, 2014; WANG et al, 2017). Já existem estudos que relatam forte atividade nematicida, larvicida e anti-helmíntica desempenhada por extratos de folha dessa planta e as associa com a presença, em especial, de furanocumarinas com grande foco em psoraleno e bergapteno, além desses extratos também serem utilizados como agente de biocontrole contra *Pseudomonas* spp. (LIU et al, 2011; BADGUJAR et al, 2014; GUO et al, 2015). Visto isso, fazem-se necessárias mais pesquisas em busca de defensivos agrícolas naturais a partir dessa espécie vegetal, investigando também sua ecotoxicidade, visando o desenvolvimento de pesticidas seguros e eficazes.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Biodiversidade e Bioeconomia brasileira**

O Brasil é um país de longa extensão territorial e abriga uma variedade geomorfológica e climática que implicam em grande biodiversidade. Estes dois fatores são responsáveis pela existência de importantes biomas e ecossistemas e fazem com que o país ocupe o posto de principal nação entre os países megabiodiversos (BRASIL, 2018).

A sociobiodiversidade brasileira também é muito valorosa de forma que o conhecimento tradicional dos povos indígenas e demais comunidades representam ponto de partida para muitos estudos realizados em institutos de pesquisa, além de ser uma forma de continuidade e conservação da biodiversidade (ICMBIO 2019, BRASIL, 2019 a).

Ao se falar de diversidade em espécies vegetais brasileiras, o bioma Mata Atlântica recebe grande destaque por abrigar diversidade de espécies de plantas por área superior à Floresta Amazônica (JOLY, METZGER e TABARELLI, 2014). No entanto, o bioma atualmente encontra-se bastante reduzido e corresponde a 29% de sua cobertura vegetal original em função de ocupação e atividades antrópicas. A Mata Atlântica tornou-se prioritária para a conservação da biodiversidade mundial, uma vez que a riqueza que ela detém é maior que a de alguns continentes como América do Norte e Europa (BRASIL, 2019 d).

O reconhecimento da importância dos recursos naturais utilizados para conservação da diversidade genética brasileira tem sido bastante discutido nos últimos anos, de maneira que o assunto tornou-se estratégico para os países ricos em biodiversidade, trazendo este tema para o centro do desenvolvimento (PIMENTEL et al, 2015).

Em um país megabiodiverso como o Brasil, tem sido necessário investir em modelos econômicos associados ao uso sustentável dos recursos naturais de forma que, quando explorados de maneira controlada e racional, podem contribuir para alavancar a bioeconomia nacional (EMBRAPA, 2019).

Nesse sentido, a Bioeconomia baseia-se em um modelo de produção industrial que utiliza recursos biológicos para fornecer soluções sustentáveis aos sistemas de produção. Ela tem como ferramenta os conhecimentos provenientes de

diversas áreas como bioinformática, biotecnologia industrial, genômica, química de renováveis, robótica, nanotecnologia entre outros e envolve a produção de plásticos biodegradáveis, biopesticidas, alimentos funcionais e biopolímeros sendo que mais produtos tendem em chegar ao mercado como bioinsumos, bioprodutos e biofármacos (EMBRAPA, 2019).

Dentre os projetos da EMBRAPA associados à Bioeconomia, encontra-se a substituição de insumos sintéticos por ativos biológicos para superar as limitações produtivas para as principais culturas de rentabilidade agropecuárias, dentre elas a soja, além de substituir ou diminuir o uso de fertilizantes de origem não renovável por insumos de base biológica (EMBRAPA, 2019).

O projeto Amazônia 4.0, liderado pelo pesquisador Carlos Nobre, aborda bastante o potencial da região Amazônia em contribuir para a Bioeconomia nacional. O pesquisador parte da ideia de uma revolução baseada no aproveitamento da biodiversidade de um país tropical e cita como grande exemplo a cadeia produtiva do açaí. Diversos produtos são derivados de sua polpa e destinados para as indústrias alimentícias, nutracêutica e cosmética e contribuem anualmente com a economia da região, já tendo impactado positivamente a vida de milhares de produtores. O pesquisador afirma que se o mesmo caminho fosse seguido por outros produtos, aliando ciência e tecnologia à produção, esta bioeconomia seria muito maior do que a advinda da agropecuária, grãos e exploração madeireira além de fazer do Brasil em potencia mundial em Bioeconomia (FACHIN, 2018; FACHIN e MACHADO, 2019).

Seguindo a linha de respeito à Biodiversidade, a Lei da Biodiversidade Nº 13.123, de 20 de maio de 2015 dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético brasileiro. O SisGen, Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado, é um sistema eletrônico criado pelo Decreto nº 8.772, de 11 de maio de 2016. Ele regulamenta a Lei da Biodiversidade de forma que para se ter acesso ao patrimônio genético, é necessário fazer o cadastro no sistema e seguir todas solicitações necessárias. A Lei da Biodiversidade refletiu em maior proteção e segurança ao conhecimento tradicional associado, além da repartição honesta dos benefícios gerados (BRASIL, 2015).

## 2.2. Bioprospecção de produtos naturais

A bioprospecção de produtos naturais é uma área do conhecimento promissora destinada à exploração de forma sustentável da biodiversidade com objetivo de identificar componentes do patrimônio genético e obter informação sobre conhecimento tradicional associado com potencial de uso comercial (SACCARO JÚNIOR, 2011).

As plantas contêm compostos químicos com propriedades bioativas e farmacológicas relevantes para a saúde humana e para a agricultura (CASANOVA e COSTA, 2017; ISMAN, 2017; CAMPOS et al, 2019). Esses compostos fazem parte do metabolismo secundário e garantem vantagem adaptativa aos organismos que os detêm. A produção e o armazenamento dos metabólitos secundários, diferentemente dos metabólitos primários, estão restritos a um número mais limitado de organismos e podem ser classificados em grupos como alcaloides, flavonoides, taninos, cumarinas, quinonas, saponinas, cardiotônicos, triterpenos e esteroides (SIMÕES et al, 2017).

Uma abordagem comum para o estudo de extratos vegetais, os quais são matrizes complexas de compostos químicos, é o fracionamento químico monitorado. Dessa maneira, os extratos são selecionados e segue-se a busca dos compostos biologicamente ativos por meio de etapas de partições líquidas e purificação com o intuito de isolar e identificar os compostos ativos. No fim do processo, além dos compostos biologicamente ativos, é possível identificar o potencial sinérgico das substâncias encontradas (caso exista esse potencial) (JUNIO et al, 2011; CASANOVA e COSTA, 2017).

Alguns compostos advindos do metabolismo secundário já foram base de biopesticidas e cujo uso no controle de pragas era bastante comum no início do século passado (PINTO et al, 2016; BENELLI, 2017). O piretroide (das piretrinas naturais), nicotina, sabadilha, rotenona e azadiractina já foram fortemente empregados como inseticidas botânicos. Atualmente, os pesquisadores e indústrias têm direcionado o interesse para descoberta de defensivos agrícolas oriundos de produtos naturais sendo os extratos botânicos e óleos essenciais potenciais fontes de promissora atividade biológica contra insetos, ácaros, nematoides, fungos e plantas daninhas (PINTO et al, 2016, ISMAN et al, 2017, CAMPOS et al, 2019).

As cumarinas fazem parte de uma classe de metabólitos secundários com bastante potencial para a agroindústria, uma vez que já foram abordadas na literatura científica atividades nematicidas e larvicida associadas a duas furanocumarinas em especial: psoraleno e bergapteno (LIU et al, 2011; BADGUJAR et al, 2014; GUO et al, 2015; CABONI et al, 2015). Os óleos essenciais também têm sido fontes de potentes inseticidas botânicos que podem atuar no controle de pragas em substituição aos insumos convencionais e sido objeto de estudo de muitos pesquisadores da área (SOUZA et al, 2015; LOURENÇO et al, 2018; TOLEDO et al, 2019; RIBEIRO et al, 2020).

A Bioprospecção, nesse sentido, se enquadra como uma área bastante estratégica na pesquisa e inovação em busca de fontes alternativas aos agroquímicos convencionais. Ela se torna essencial para o estudo de novas espécies de plantas que possam exercer esse tipo de controle (PINTO et al, 2016; BENELLI et al, 2017; CAMPOS et al, 2019).

### **2.3. Cenários do agronegócio e agropecuária nacional**

O agronegócio brasileiro ocupa posição de destaque no cenário internacional. Ele é responsável pela maior empregabilidade no país – um a cada três empregos são gerados de forma direta ou indireta pelo agronegócio, além da vultosa soma de capital do PIB que ele representa (BRASIL, 2019 b).

Dados fornecidos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) apontam que, no terceiro semestre de 2017, o PIB da Agropecuária Brasileira correspondeu a R\$ 303.751 milhões. Já no ano de 2018, apenas no terceiro trimestre, o montante do PIB da agropecuária nacional foi de R\$ 248.842 milhões. No terceiro trimestre de 2019, quase todas as principais atividades da agropecuária cresceram em relação ao mesmo período de 2018 entre elas: alta no abate bovino, suínos, frangos, aquisição de leite e produção de ovos de galinhas. Para o agronegócio, logo no primeiro trimestre de 2018, o capital correspondente ao PIB foi de R\$ 1.380 bilhões. O agronegócio contribuiu com 21,6% do PIB nacional em 2017 com expectativa de crescimento de 6,0% para 2018 (BRASIL, 2019 b; IBGE, 2019).

Os principais produtos de exportação brasileira são provenientes do agronegócio como soja grão, açúcar, café, suco de laranja, carne bovina, carne de frango (em primeira posição) seguido de farelo/óleo de soja e algodão (em segunda posição), milho e carne suína (em terceira e quarta posição respectivamente) (USDA, 2019; BRASIL, 2019 b). Essa liderança abordada implica em forte dependência do Brasil de insumos importados. Além disso, a intertropicalidade do país e suas grandes áreas agricultáveis fazem com que as plantações brasileiras estejam susceptíveis ao ataque de diversas pragas agrícolas, o que também demanda o uso de defensivos agrícolas (MENTEN, 2018; MORAES, 2019).

#### **2.4. Uso de agrotóxicos**

A Lei Nº 7.802, de 12 de julho de 1989, regulamentada pelo Decreto nº 4.079/2002, define os agrotóxicos como produtos de processos químicos, físicos ou biológicos destinados ao uso no setor de produção, armazenamento e beneficiamento dos produtos agrícolas, pastagens, proteção de florestas, de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais de modo a preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos. A fiscalização federal destes produtos é feita pela Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins – CGAA e MAPA (BRASIL, 1989).

O Brasil é um grande consumidor de agrotóxicos. Por ser detentor de grandes áreas de cultivo, exportador de produtos provenientes dessas lavouras e detentor de clima favorável para manifestação de pragas agrícolas, os agrotóxicos são aplicados de forma a proteger as plantações do ataque desses organismos, por conseguinte, aumentando a produção (PINTO et al, 2016; MORAES, 2019).

Os inseticidas são ferramentas de proteção usadas para minimizar os danos causados por espécies específicas, normalmente reduzindo suas populações (GUEDES et al, 2016; SANTOS et al, 2018). Aproximadamente, 67 mil espécies de organismos são conhecidas por afetar as culturas agricultáveis em todo o mundo e sem a aplicação dos agroquímicos, 70% da produção agrícola poderia ser perdida (CAMPOS et al, 2019).

No Brasil, as plantações com maior rentabilidade para o país são anualmente atacadas por pragas como plantas daninhas, ácaros, fungos, insetos

como percevejo-marrom-da-soja *Euschistos heros*, maior inimigo da cultura da soja (GRAÇA et al, 2016; STHAL, BABENDREIER e HAYE, 2019) e moscas, como *Drosophila suzukii* e *Musca domestica* capazes de acometer plantações de frutas e de transmitir centenas de patógenos (WANG et al, 2011; STACCONI et al, 2013), além dos nematoides que afetam não somente a soja, mas também a cultura do milho, do tomate e quase todas as espécies de plantas vasculares (MANSO et al, 1994; JONES et al, 2013).

Porém, apesar dos benefícios às lavouras, o uso abusivo e indiscriminado desses produtos tem acarretado em acúmulo de resíduos tóxicos em alimentos, intoxicação de produtores rurais (pela falta de uso de equipamentos de segurança adequados) (GARRIGOU et al, 2020), intoxicação dos consumidores, contaminação de água e solo, seleção de pragas resistentes implicando em estagnação de produção agrícola (RALIYA et al, 2018), prejuízo às populações de organismos não-alvos e inimigos naturais (NDAKIDEMI, MTEI e NDAKIDEMI, 2016; RIMOLDI et al, 2017; FERREIRA et al, 2017) acarretando em aumento da população de insetos praga. Ou seja, um forte desequilíbrio ambiental e prejuízo ao ecossistema (PINTO et al, 2016; MFARREJ e RARA; 2019, SOARES et al, 2019).

Na agricultura ecológica, os insetos são divididos entre os grupos benéficos e não benéficos (pragas). Os insetos benéficos oferecem serviços ao ecossistema e podem ser agentes polinizadores, insetos parasitas (parasitoides) e inimigos naturais, fazendo parte do controle biológico. Os inseticidas sintéticos, organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretroides, usados em abundância têm afetado as populações desses insetos benéficos (GENTEZ, MURDOCH e KING, 2010; NDAKIDEMI, MTEI e NDAKIDEMI, 2016; SOARES et al, 2019). Deve-se ter cuidado com derivados de algumas plantas cujos ingredientes ativos podem causar danos em inimigos não alvos e polinizadores (NDAKIDEMI, MTEI e NDAKIDEMI, 2016; TSCHOEKE et al, 2019).

Os agroquímicos podem atingir o solo por aplicações direta ou indireta via pulverização das partes aéreas das plantas. Uma vez acumulados no solo, os pesticidas e seus compostos químicos podem ser transportados e sofrer processos químicos como hidrólise e até mesmo degradação também podendo interagir com a microbiota do solo. Por conseguinte, eles alcançam as fontes hídricas com grande possibilidade de permanecer por longos períodos no ambiente (CHAPLAIN et al,

2011; CAMPOS et al, 2019). Os pesticidas podem provocar mudanças na microbiota e atividade enzimática do solo, alteração do ciclo de nitrogênio e perturbação em relações simbióticas. Esses fatores podem conduzir em alterações da fertilidade do solo e no crescimento das plantas (HARTMANN et al, 2015; MALIK et al, 2017).

Em 23 de julho de 2019, foi aprovado o novo marco legal para agrotóxicos, medida que esclarece os critérios de avaliação e classificação toxicológica dos produtos no Brasil. A base da mudança foram padrões do Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos, o que possibilitaria convergência regulatória internacional e fortalecimento da comercialização de produtos nacionais (ANVISA, 2019). É mostrado na **Tabela 1** o novo parâmetro empregado para classificação dos agrotóxicos quanto a sua toxicidade.

**Tabela 1 - Nova classificação de agrotóxicos no Brasil**

	CATEGORIA 1	CATEGORIA 2	CATEGORIA 3	CATEGORIA 4	CATEGORIA 5	NÃO CLASSIFICADO
	EXTREMAMENTE TÓXICO	ALTAMENTE TÓXICO	MODERADAMENTE TÓXICO	POUCO TÓXICO	IMPROVÁVEL DE CAUSAR DANO AGUDO	NÃO CLASSIFICADO SEM ADVERTÊNCIA
PALAVRA DE ADVERTÊNCIA	PERIGO	PERIGO	PERIGO	CUIDADO	CUIDADO	
CLASSE DO PERIGO						
Oral	Fatal se ingerido	Fatal se ingerido	Tóxico se ingerido	Nocivo se ingerido	Pode ser perigoso se ingerido	-
Dérmica	Fatal em contato com a pele	Fatal em contato com a pele	Tóxico em contato com a pele	Nocivo em contato com a pele	Pode ser perigoso em contato com a pele	-
Inalatória	Fatal se inalado	Fatal se inalado	Tóxico se inalado	Nocivo se inalado	Pode ser perigoso se inalado	-
COR DA FAIXA						

Fonte: ANVISA, 2019 adaptado.

A Ecotoxicologia, compreendida como a união da Ecologia e Toxicologia englobando também a Química, é uma área da Ciência que estuda e avalia os efeitos tóxicos de substâncias químicas e antropogênicas no ecossistema (aquático ou terrestre). É necessária a condução de ensaios de ecotoxicidade agudos e/ou crônicos em que os organismos são expostos às substâncias estressoras e há

avaliação de sobrevivência, mortalidade, comportamento e morfofisiologia de forma que se torna possível conhecer o período de tempo e a concentração que determinado composto causará danos sobre ecossistema (BIOTOX AMBIENTAL, 2019).

Nas últimas décadas, a soja *Glycime max* (L.) estabeleceu-se como a principal cultura agrícola brasileira. No entanto é afetada por fatores bióticos como os danos causados por insetos. Durante o desenvolvimento, a soja é atacada por percevejos (Heteroptera:Pentatomidae) que ferem diretamente as vagens e sementes, diminuindo o rendimento da cultura (GRAÇA et al, 2016).

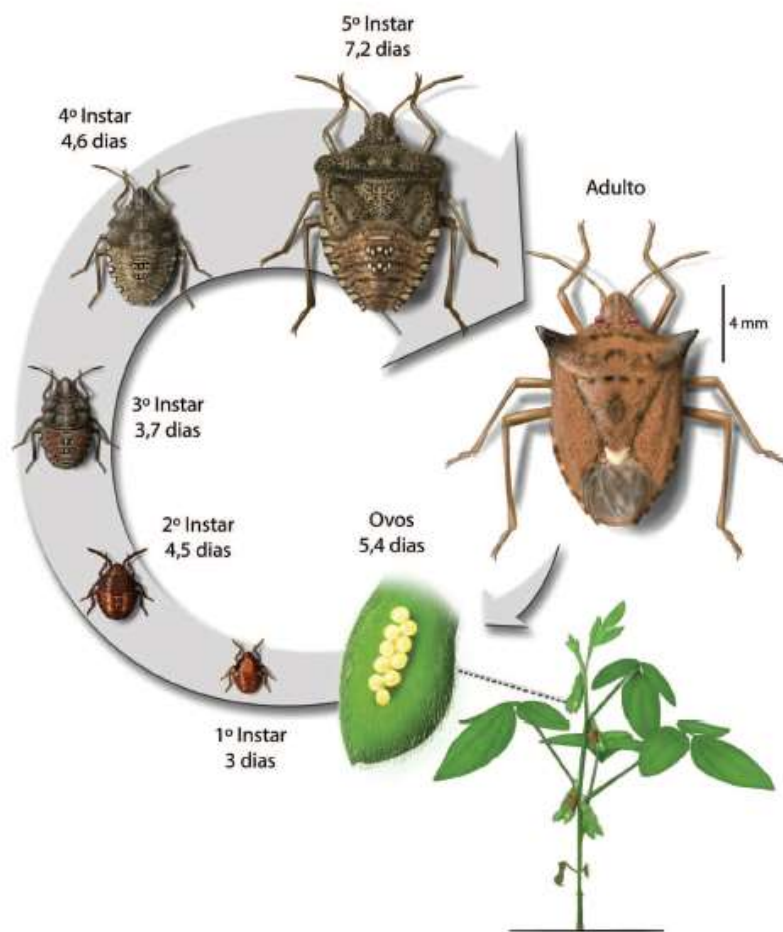
No início dos anos 2000, populações do percevejo-marrom neotropical *Euschistus heros* (Fabricius) estabeleceram-se nas plantações brasileiras e, em função de sua fácil adaptabilidade em diferentes zonas agroecológicas, espalharam-se pela área brasileira de cultivo de soja (PANIZZI, BUENO e SILVA, 2012, GRAÇA et al, 2016). Rapidamente, o percevejo-marrom-da-soja tornou-se uma praga agrícola de preocupação global, afetando não apenas o cultivo da soja, mas também plantios de pera, maçã, milho, avelã e algodão causando significativos danos econômicos a estes cultivares (STAHL, BABENDREIER, HAYE 2019).

O inseto adulto de *E. heros* apresenta coloração marrom escura, sendo chamado por essa razão de percevejo-marro-da-soja. Os ovos são depositados normalmente nas folhas ou nas vagens da soja em pequenas massas de cor amarelada e o inseto permanece no ovo por quatro a cinco dias (PANIZZI, BUENO e SILVA, 2012). Durante o desenvolvimento, as ninfas do percevejo passam por cinco estágios do desenvolvimento, do primeiro ao quinto instar. Apesar de iniciarem a alimentação apenas no segundo instar, as ninfas do percevejo-marrom causam danos às sementes apenas a partir do terceiro instar. No ciclo médio de desenvolvimento (**Figura 1**), o percevejo possui longevidade média de 116 dias do ovo à fase adulta (CORRÊA-FERREIRA e PANIZZI, 1999; PANIZZI, BUENO e SILVA, 2012).

O controle destes alvos agrícolas é quase exclusivamente por meio de inseticidas tendo os percevejos-marrons desenvolvido resistência à maioria dos inseticidas destinados ao seu controle (SOSA-GÓMEZ et al, 2009; GRAÇA et al, 2016). Por essa razão, estes insetos são alvos de estudos de pesquisadores na área com intuito de encontrar um produto pelo qual o percevejo não tenha resistência.

Visto isso, novas fontes de defensivo agrícolas têm sido buscadas, em especial a partir de fontes naturais, em substituição dos agrotóxicos convencionais em função dos impactos negativos que estes têm acarretado ao meio ambiente (MFARREJ e RARA, 2019; FALKOWSKI, 2020).

**Figura 1 – Ciclo de desenvolvimento do percevejo-marrom *Euschistus heros***



Fonte: CIVIDANES, 1992.

## 2.5. Fontes alternativas de produção de defensivos agrícolas

O apelo por novas tecnologias menos impactantes para o meio ambiente tem promovido mudança de pensamento dos agricultores convencionais e da indústria, aumentando o interesse do mercado para a descoberta de produtos naturais como fonte de bio defensivos (PAVELA e BENELLI, 2016; NOLLET e RATHORE, 2017, ABCBIO, 2019 a).

Os bio defensivos representam fontes alternativas aos defensivos agrícolas tradicionais (ALÉCIO et al, 2010; BENELLI et al, 2017). Eles baseiam-se na potencialização do uso de organismos ou substâncias de ocorrência natural para minimizar a infestação de pragas nas lavouras (PINTO et al, 2016) e são categorizados como macroorganismos (insetos, ácaros e nematoides), microrganismos (bactérias, fungos e vírus), bioquímicos (extrato de plantas, substância purificada, algas, enzimas e hormônios) e semioquímicos (óleos essenciais) (ABC BIO, 2019 a). Trata-se de um mercado em crescimento e o Brasil é o quarto país na linha de produção de produtos biológicos, o que corresponde 7% da comercialização mundial (BRASIL, 2019 c).

Os defensivos agrícolas naturais ou botânicos já foram populares e fonte de renda na exportação brasileira em décadas passadas (MENEZES, 2005; PINTO et al, 2016). São maneiras de controle que implicam em menor impacto ambiental e que se acumulam em pequenas quantidades nos vegetais (CAMPOLO et al, 2017; CAMPOS et al, 2019; RIBEIRO et al, 2020).

Os pesticidas botânicos, na forma de extrato ou substância isolada de planta, exibem diversas atividades biológicas como repelência, larvicida (PAVELA et al, 2019), inseticida, fungicida, nematicida e bactericida (ISMAN, 2006; ISMAN, 2017). O mecanismo de ação é variável podendo ser por inibição da ingestão alimentar, crescimento, desenvolvimento (inibição do hormônio de muda), oviposição, rompimento celular e ação no sistema nervoso afetando os neurotransmissores excitatórios e inibitórios (acetilcolina e GABA – ácido gama-aminobutírico - respectivamente), receptores da fenda sináptica (acetilcolina, nicotínico, octopamina, tiramina) e canais de sódio (REGNAULT-ROGER et al, 2012; PAVELA e BENELLI, 2016).

As plantas são valiosas fontes de produtos naturais e de novas substâncias bioativas (BENELLI et al, 2017; CASANOVA e COSTA, 2017; CAMPOS et al, 2019). As cucurbitacinas (terpenos tetracíclicos) reduzem a palatabilidade do animal. Os taninos reduzem a qualidade nutricional da planta. Os compostos juvenoides (isolados de *Abies balsamea*), procenos (isolados de *Agerantum houstonianum*) e fitoecdisonas são análogos hormonais dos insetos interferindo no crescimento por meio do hormônio juvenil. No caso da fitoecdisona, ela possui atividade hormonal muito maior que *alfa* e *beta*-ecdisona de maneira que, quando administrada no

inseto, pode implicar em má-formação, esterilidade e morte (SAITO e LUCCHINI, 1997). No entanto, mais estudos são necessários para compreender os mecanismos de ação dos defensivos agrícolas a partir de extrato botânicos nos insetos.

Os inseticidas botânicos precedem as principais classes de inseticidas sintéticos (organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides e neonicotinoides) (ISMAN et al, 2017). A rotenona, um derivado de flavonoide, extraída de raízes de plantas do gênero *Derris* (*Derris elliptica*, Fabacea), *Lonchocarpus* e *Tephrosia*, age bloqueando o transporte de elétrons no Complexo I da cadeia transportadora de elétrons. Seu uso para atividade inseticida decaiu ao longo dos anos. O piretro, das piretrinas naturais, é uma oleorresina extraída de folhas secas de *Tanacetum cinerariifolium* (Asteraceae). É um dos compostos naturais de ação mais tóxica e usado para o controle de insetos há séculos, ainda sendo o inseticida botânico dominante em todo o mundo até hoje (PINTO et al, 2016; ISMAN, 2017).

A nicotina, um alcaloide presente no extrato aquoso do tabaco *Nicotiana tabacum* (Solanaceae), possui efeito similar à acetilcolina, principal neurotransmissor excitatório do Sistema Nervoso Central dos insetos. Por ser um análogo a este composto, a nicotina compete pelos receptores presentes na fenda pós-sináptica, impedindo a ação da enzima acetilcolinesterase e transmissão adequada da informação nervosa. Este metabólito secundário promove ativação prolongada dos receptores implicando em hiperexcitabilidade pela transmissão ininterrupta e de longa duração dos impulsos nervosos, ocasionando tremores e paralisia no inseto. Assim como a rotenona, a nicotina foi muito empregada como inseticida, mas caiu em desuso em função da toxicidade (MENEZES, 2005; PINTO et al, 2016; ISMAN, 2017).

Plantas popularmente conhecidas como sabadilha, tendo representantes de diferentes espécies do gênero *Schoenocaulon*, contém os alcaloides cevadina e veratridina, que atuam como inseticidas botânicos com baixa toxicidade (PINTO et al, 2016). O composto azadiractina, obtido a partir de sementes da árvore de *Azadirachta indica*, conhecida como neen, já detinha relato secular associado à atividade inseticida na Índia. Porém, o estudo como inseticida botânico é recente (BENELLI et al, 2017).

O interesse na utilização de produtos naturais, em especial os óleos essenciais extraídos de sementes, flores e folhas tem se tornado crescente e uma alternativa para o manejo-sustentável de insetos-praga (ISMAN et al, 2011; ISMAN, 2017; LOURENÇO et al, 2018 et al). Esses compostos têm características que direcionam seu uso como inseticida natural, a exemplo de sua disponibilidade para comercialização de aromas e fragrâncias, a diversidade de plantas que os contêm, facilidade de preparação e análise, além de ampla aceitação e aprovação regulatória pelo longo uso tradicional associado aos óleos essenciais (ISMAN e GRIENESEN, 2014; ISMAN, 2017).

Óleos essenciais extraídos de sementes, cascas, folhas e flores têm sido testados quanto ao seu uso como fungicida, inseticida e bactericida (MASSANGO et al, 2017; LOURENÇO et al, 2018; TOLEDO et al, 2019). As plantas pertencentes à família Apiaceae, amplamente distribuídas pelo mundo, são fontes valiosas de muitos compostos bioativos, em especial os óleos essenciais atuando como inibidores alimentares, inseticida, ovicida, larvicida, repelente de insetos e reguladores de crescimento (SOUZA et al, 2015).

Alguns óleos essenciais de espécies do gênero *Croton* (Euphorbiaceae) demonstram efeito pesticida (LIMA et al, 2013; SANTOS et al, 2014). No entanto, a caracterização química e o potencial inseticida de algumas espécies do gênero foram pouco estudados. Visto isso, RIBEIRO et al, 2020 investigaram a composição química, atividade inseticida, efeito de deterrência e repelência de óleos essenciais obtidos da espécie *Croton rudolphianus*, endêmica no Brasil, em *Sitophilus zeamidis*. Foi revelada a presença de 54 compostos no óleo essencial, constituído por 23% de metil chavicol, 4,2% de (E)-cariofileno, 4% de eugenol, entre outros. O óleo essencial foi tóxico ao organismo quando ingerido, concentração letal  $CL_{50}$  102,66  $\mu\text{L/g}$ , e causou mudanças em padrões nutricionais (taxa de consumo relativo, ganho de biomassa, eficiência da conservação alimentar). O óleo também foi tóxico por contato ( $CL_{50}$  70,64  $\mu\text{L/mL}$ ) e fumigação (64  $\mu\text{L/L}$  no ar causou a maior mortalidade 43,73%). Nenhuma atividade repelente foi detectada e os resultados do estudo mostraram aos pesquisadores que o óleo essencial de folhas de *C. rudolphianus* foi tóxico em diferentes maneiras para *S. zeamidis* adultos, apontando o potencial uso na proteção de grãos (RIBEIRO et al, 2020).

O óleo essencial de pinos (*Pinus taeda* L., Pinaceae), assim como o de cravo-da-Índia (*Eugenia caryophyllus* Spreng, Myrtaceae) e de hortelã (*Mentha piperita* L., Lamiaceae) apresentam atividade herbicida. O óleo essencial de jojoba (Simmondsiaceae), de neem (*Azadirachta indica* A. Juss), de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) apresentam ação fungicida. Alguns óleos essenciais de alecrim, tomilho e cravo apresentam também atividade inseticida (Pinto et al, 2016). Entre as famílias de plantas tropicais, a Annonaceae tem mostrado grande potencial como fonte de biopesticidas, em especial atribuído à presença de acetogeninas, uma classe de produto natural limitada a alguns gêneros dessa família. Extratos etanólicos de semente de algumas espécies de *Annonas* brasileiras continuam sendo estudados visando o manejo de insetos-praga na produção de novos inseticidas botânicos comerciais (RIBEIRO et al, 2014).

A comercialização de biopesticidas tem se destacado no Brasil e no mundo. Nacionalmente, este mercado movimentou US\$165 milhões em fevereiro de 2018. Para 2020, a expectativa de faturamento mundial é de US\$ 5 bilhões e, para os próximos cinco anos, espera-se alcançar a marca dos US\$ 11 bilhões. Porém, apesar deste forte crescimento observado, a produção de biopesticidas ainda é pequena e corresponde apenas 2% do faturamento total do mercado de controle de pragas. Isso pode ser explicado pela falta de conhecimento e esclarecimento sobre os produtos biológicos para o controle de pragas e doenças nas lavouras e sua importância, pouca disponibilidade deles no mercado e resistência do agricultor em alterar sua cultura de trabalho (BRASIL, 2019 c).

Os produtos alternativos não pretendem e não irão substituir por completo os convencionais e sintéticos, mas representam formas de controle mais saudáveis para o ambiente reduzindo os danos ambientais (PINTO et al, 2016). O uso de pesticidas botânicos tem sido comercialmente vantajoso em função de serem atualmente conceituadas como *eco-friendly* - amigos do meio ambiente. Sua ação é rápida, bem como sua degradação, possui toxicidade baixa, proporciona diminuição do número de pragas resistentes, maior especificidade contra os alvos agrícolas, reestabelecimento de organismos benéficos para as lavouras e são seguros para os inimigos naturais. Alguns compostos têm função específica na natureza enquanto outros podem ser empregados para diferentes propósitos, sendo aplicáveis também à indústria farmacêutica (PINTO et al, 2016; SOARES et al, 2019).

E tão importante quanto avaliar a toxicidade dos extratos em relação aos alvos agrícolas, é necessário conhecer o comportamento deles em relação aos organismos não alvos, insetos benéficos, que fazem parte do ambiente, são membros vitais do ecossistema e têm sido profundamente prejudicados com o uso indiscriminado de inseticidas naturais (GENTZ, MURDOCH e KING, 2010; SOARES et al, 2019).

## **2.6. Legislação - Biodefensivos**

Apesar do prazo mais curto, o registro de um Biodefensivo a partir de extrato botânico segue praticamente o mesmo padrão de exigência dos agroquímicos convencionais. O registro e o monitoramento, no Brasil, são realizados por três órgãos. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, avalia as questões relacionadas com a saúde humana. O MAPA cuida das questões agronômicas e é responsável pelo registro dos produtos agrícolas. O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, IBAMA, é responsável pelas questões ambientais (ABC BIO, 2019 b). Ensaios de ecotoxicidade são requeridos por esses três órgãos para fins de registro de agrotóxicos considerados de baixa toxicidade (BIOTOX AMBIENTAL, 2019).

A depender do produto, ele poderá ser enquadrado na Instrução Normativa Conjunta (INC) nº 1, de 23 de janeiro de 2006, como no caso de se tratar de um óleo essencial que evocam respostas específicas em alguns insetos (semioquímicos) (BRASIL, 2006); pode também ser enquadrado como produto bioquímico pela INC nº 3, de 26 de outubro de 2005 alterada pela INC nº 3, de 19 de agosto de 2014 (extrato de plantas, substância purificada, algas, enzimas e hormônios) (BRASIL, 2005; BRASIL, 2014). No entanto, ainda não existe uma INC que normatize diferenciadamente o registro de produtos derivados de extratos vegetais, a análise deve ser feita caso a caso.

Caso seja interesse da empresa o registro do produto na agricultura orgânica por se tratar de um produto fitossanitário de origem vegetal, a legislação a ser seguida é o Decreto 6913 de 23 de julho de 2009 e INC nº 1 de 24 de maio de 2011 (BRASIL, 2011). Todos os estudos exigidos para avaliação toxicológica e

ecotoxicológica de produtos bioquímicos estão em INC nº 3, de 19 de agosto de 2014.

## 2.7. *Ficus carica* Linn

O gênero *Ficus*, pertencente à família botânica Moraceae e abriga mais de 800 variedades de espécies cultivadas, principalmente, em regiões de clima quente e seco como Oriente Médio, região Mediterrânea (HARZALLAH, BHOURI e HAMMAMI, 2016; ARVANITI et al, 2019) e em florestas tropicais e semitropicais (SHI et al, 2018). Este gênero é uma importante fonte genética em função de seu alto valor econômico e nutricional, além de ser integrante fundamental da biodiversidade e do ecossistema de florestas tropicais (MAWA, HUSAIN e JANTAN, 2013; AMMAR et al, 2015).

A espécie *Ficus carica* Linn, é um membro muito importante e popular do gênero *Ficus*, conhecida como figueira (BADGUJAR et al, 2014). É uma planta com intenso uso tradicional associado. Por milênios, ela tem sido usada na medicina popular para o tratamento de doenças digestivas, endócrinas, reprodutivas, respiratórias, gastrointestinais, infecções do sistema urinário, doenças de pele além de ser empregada como alimento tradicional para nutrição e benefícios para saúde (SHI et al, 2018; PALMEIRA et al, 2019).

Com relação aos relatos farmacológicos, os extratos de diferentes partes dessa planta desempenham funções biológicas variadas *in vitro* e *in vivo*, como anti-inflamatória, anti-helmíntica, hepatoprotetora, hipoglicêmica, hipocolesterolêmica, hipolipidêmica, antimicrobiana, imunoestimulante, nematicida (folha) (LIU et al, 2011), antiespasmódica, antiplaquetária, anticonstipação, citotóxica e antioxidante (fruto), anti-angiogênica, hemostática, larvicida, nematicida, controle da diabete Mellitus, antioxidante e citotóxico (látex) (ABDEL- ATY et al, 2019; ARVANTI et al, 2019), além de atividades antiviral, antimutagênico, anticonvulsão (RAAFT et al, 2019) e agente de controle biológico (BADGUJAR et al, 2014; MAWA, HUSAIN e JANTAN, 2013; AHMAD et al, 2013).

Em relação à toxicologia, o histórico de aplicação etnomedicinal sugere que *F. carica* pode ser considerada segura. Os estudos gerais de toxicidade realizados nessa espécie de planta para o fruto, folha e caule frente a modelos murinos

mostram sua segurança em doses terapêuticas recomendadas (BADGUJAR et al, 2014). Estudos fitoquímicos e farmacológicos recentes indicam o potencial benefício da espécie para a saúde (SHI et al, 2018) e recomendam a introdução do fruto da espécie na dieta diária (PALMEIRA et al, 2019).

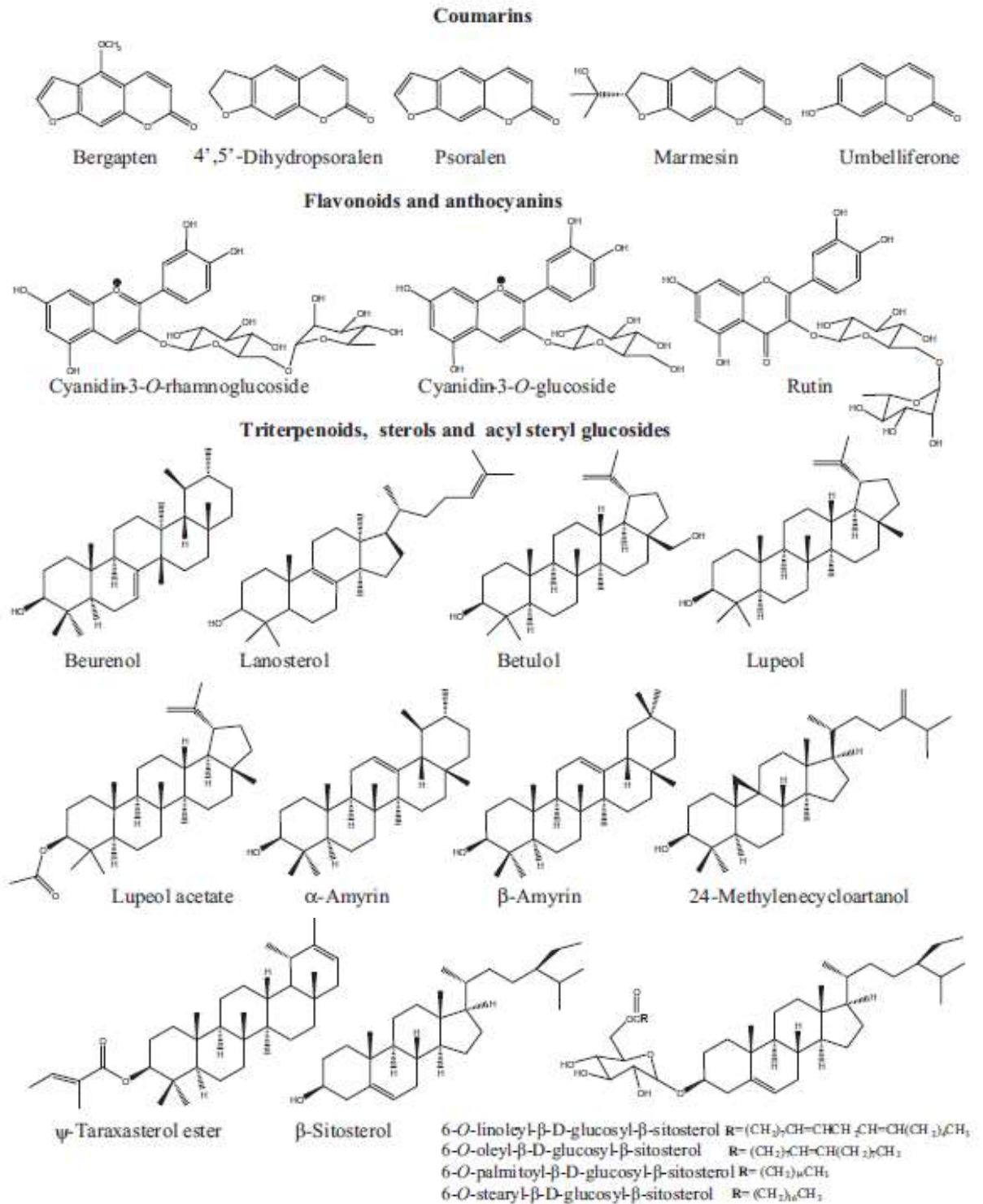
Estudos fitoquímicos em *F. carica* revelam a presença de uma variedade de compostos bioativos responsáveis pelas atividades biológicas atribuídas à espécie (**Figura 2**). Entre eles, encontram-se compostos fenólicos, fitoesteróis, ácidos orgânicos, antocianinas, triterpenoides, cumarinas, compostos voláteis (BAROLO, MOSTACERO e LÓPEZ, 2014; PETRUCELLI, IERI e BONETTI, 2018; GAALICHE et al, 2019). Os compostos fenólicos tornaram-se muito estudados entre os cientistas especialmente por conta de sua atividade antioxidante (BAROLO, MOSTACERO, LÓPEZ, 2014; ABDEL-ATY et al, 2019; ARVANIT et al, 2019).

Com relação aos flavonoides, as classes representantes mais bem estudadas nessa espécie são pertencentes às classes flavanol, flavonol, flavonas e antocianidinas (ARVANIT et al, 2019; GAALICHE et al, 2019).

Em relação às cumarinas, outra classe de metabólitos secundários, a literatura científica já mostra que algumas delas exibem atividade nematicida contra algumas espécies de nematoides (LIU et al, 2011; GUO et al, 2015; CABONI et al, 2015). O psoraleno e bergapteno são furanocumarinas com potente ação farmacológica, sendo a *F. carica* uma das principais fontes deste composto (WANG et al, 2017; ABDEL-ATY et al, 2019). Algumas espécies do gênero *Ficus* já foram estudadas como detentora de atividade inseticida contra insetos do gênero *Aedes*, *Culex* e *Anopheles* (PAVELA et al, 2019).

Diante da necessidade de busca por fontes alternativas de produção de agroquímicos e o potencial biológico do gênero *Ficus* spp., os extratos etanólicos de folhas e galhos de *F. carica* foram testados pelo grupo BIOPROS/UFV contra o nematoide das galhas *Meloidogyne javanica in vitro* e o extrato do galho implicou em 98% de mortalidade dos nematoides (ALVES et al, 2020). Neste presente trabalho, novos alvos agrícolas serão estudados e será avaliada a relação entre os extratos da planta com os possíveis compostos responsáveis pela atividade inseticida.

Figura 2 – Estrutura dos principais compostos identificados a partir de *F. carica*



Fonte: BAROLO, MOSTACERO e LÓPEZ, 2014.

## 2.8. Psoraleno e bergapteno

O metabolismo secundário detém uma enormidade de compostos químicos que garantem vantagens adaptativas ao vegetal e as plantas representam uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos (VARANDA, 2006; CASANOVA e COSTA, 2017). Dentre eles, a classe das cumarinas é constituída de substâncias fenólicas formadas pela fusão de anéis benzeno e pirona e são divididas entre cumarinas simples, furanocumarinas (lineares e angulares), dihidrofuranocumarinas, piranocumarinas, fenilcumarinas e bicumarinas (SIMÕES, 2017).

A classe das furanocumarinas é bastante abordada na literatura pela potente atividade biológica que seus compostos desempenham (BADGUJAR et al, 2014; LIU et al, 2011; GUO et al, 2015; CABONI et al, 2015; ABDEL-ATY, 2019) e são distribuídas em folhas, frutos, galhos e látex dos vegetais (SIMÕES et al, 2017).

Algumas espécies vegetais são conhecidas pela riqueza de cumarinas que elas apresentam. *Brosimum gaudichaudii* (Moraceae), popularmente conhecida como mama-cadela e presente do nordeste brasileiro até São Paulo, é uma espécie de planta que produz uma larga quantidade de furanocumarinas, incluindo bergapteno e psoraleno (GOTTLIEB, SILVA e MAIA, 1972; QUINTÃO et al, 2019). Na medicina tradicional, os extratos alcoólicos de casca, raízes e folhas de *B. gaudichaudii* são usados no tratamento da doença vitiligo e o conhecimento foi absorvido pela indústria farmacêutica, que incorporou esses compostos químicos em formulações medicamentosas para o tratamento da doença (QUINTÃO et al, 2019).

De maneira a conhecer a possível atividade biológica dos extratos das partes aéreas (folhas, ramos, frutos), córtex de raízes e substâncias isoladas de *B. gaudichaudii*, já foram realizados ensaios *in vitro* e *in vivo* para determinação de atividade anti-helmíntica, antimicrobiana, fotossensibilizante, hepatotóxica, cancerígena e toxicológica (mutagênica). Todas elas estavam associadas à ação do psoraleno e bergapteno isolados da planta (POZETTI et al, 2005).

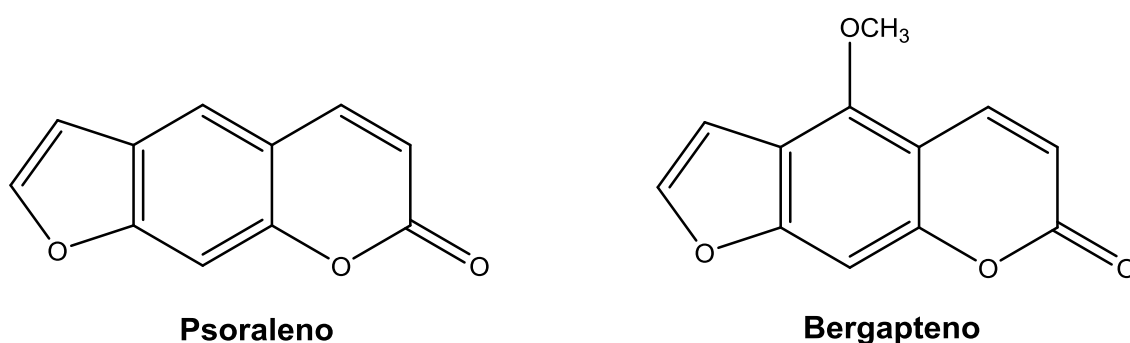
A importância biológica dessas duas furanocumarinas (**Figura 3**) é muito grande com ampla potencialidade terapêutica uma vez que na flora brasileira existem várias espécies com ocorrência desses compostos. A família Moraceae é bastante promissora em função da presença de cumarinas, em especial os gêneros *Brosimum*, *Artocarpus*, *Cecropia*, *Dorstenia* e *Ficus* (POZETTI et al, 2005).

Dentro do gênero *Ficus*, a espécie *Ficus carica* é bastante relatada na literatura pelo conteúdo de cumarinas que suas partes vegetais possuem (BADGUJAR et al, 2014; WANG et al, 2017; PETRUCCELLI et al, 2018; GAALICHE et al, 2019). E apresenta potente atividade biológica, sendo algumas associadas à ação das furanocumarinas psoraleno e bergapteno frente à fitopatógenos como nematicida, larvicida e anti-helmíntica (LIU et al, 2011; MAWA, HUSAIN e JANTAN, 2013; BADGUJAR et al, 2014; GUO et al, 2015).

O potencial antimutagênico pelo teste de Ames, micronúcleo e cometa para psoraleno e bergapteno já foi abordado na literatura (EDENHARDER et al, 1993; EDENHARDER, 1995; MARTINS, 2016). MARTINS 2016 mostrou que o psoraleno e o bergapteno extraídos de raízes de *B. gaudichaudii* apresentou mutagenicidade e genotoxicidade pelo teste de micronúcleo e cometa em doses superiores a 150 mg/mL.

O teste de Ames é um teste *in vitro* de triagem para identificar substâncias capazes de induzir mutações gênicas e é vantajoso de ser realizado por ser rápido, barato e fácil de realizar (ANVISA, 2009) além de ser exigido pela legislação para avaliação toxicológica de um possível defensivo agrícola a partir de produto natural (BRASIL, 2014).

**Figura 3 – Estrutura química do psoraleno e bergapteno**



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Avaliar a potencial atividade inseticida no percevejo-marrom da soja e realizar ensaios de ecotoxicidade e fitotoxicidade de extratos de *Ficus carica*, visando investigar os compostos relacionados com a atividade biológica.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a atividade inseticida de extratos de galho e folha de *F. carica* frente ao percevejo *Euschistus heros* adulto.
- Avaliar a toxicidade dos extratos bioativos de *F. carica* em diferentes estágios do percevejo *E. heros* em concentrações específicas.
- Determinar a concentração dos extratos de *F. carica* que mata 50% (CL<sub>50</sub>) de *E. heros* no terceiro instar do desenvolvimento por meio de uma curva de mortalidade dose-resposta.
- Analisar os perfis fitoquímicos de extratos de *Ficus carica* por HPLC-DAD e UHPLC-ESI-MS/MS.
- Realizar o fracionamento do extrato de galho de *F. carica*, monitorando a presença de cumarinas;
- Isolar e identificar os metabólitos secundários do extrato de galho de *F. carica* responsáveis pela atividade biológica;
- Avaliar a atividade toxicológica dos extratos de *F. carica* em relação ao alvo *Drosophila suzukii*.
- Avaliar a ecotoxicologia dos extratos de *F. carica* em relação aos organismos não alvos *Apis mellifera* e *Parthamona helleri* (abelhas), *Eriopsis connexa* e *Coleomegilla maculata* (joaninhas) e *Chrysoperla externa* (crisoprídeo) de acordo com a INC nº3, 19 de agosto de 2014.
- Avaliar a fitotoxidez do extrato de galho de *F. carica* em relação à mudas de tomate Santa Cruz.
- Avaliar a fitotoxidez do extrato de galho de *F. carica* na germinação e desenvolvimento da semente de soja por meio do teste de semente.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Espécie vegetal avaliada

Amostras de galhos e folhas de *Ficus carica* foram acessadas no município de Viçosa-MG e coletados na “Mata do Fundão”, localizada no *Campus* da UFV (Latitude: 20°45'44.1” S – Longitude: 42°51'07.5” W) (**Figura 4**). A exsicata vegetal foi depositada no herbário VIC/UFV sob registro VIC 31.703. O cadastro de acesso ao patrimônio genético foi realizado na Plataforma SisGEN do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (n. AF1E3D3).

### 4.2. Acesso e produção de extratos de *Ficus carica*

Amostras de galhos e folhas, 6280 g e 3795 g respectivamente, de *F. carica* foram coletadas separadamente, no mês de novembro de 2018, em cultivar da espécie pertencente ao Departamento de Agronomia da Universidade Federal de Viçosa (**Figura 4**).

**Figura 4 – Fotos de exemplares de *Ficus carica*, provenientes de cultivar na UFV**

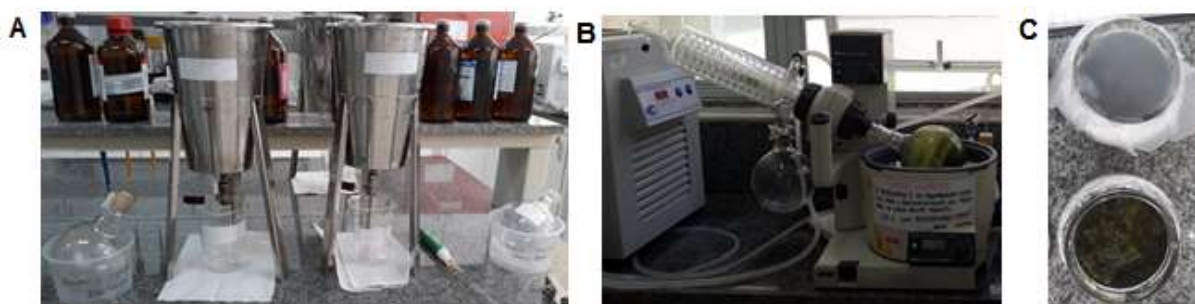


Fonte: Autoral

Amostras de galhos e folhas de *F. carica* foram submetidas à secagem em estufa ventilada a temperatura inferior a 40 °C, totalizando ao final, 1965 g e 1080 g de material seco, respectivamente, após pulverização. Os extratos brutos para ambas as partes de *F. carica* foram obtidos por percolação exaustiva empregando etanol absoluto como solvente extrator (**Figura 5**).

Foram adicionados ao percolador 1965 g de galho e 300 g de folha (material vegetal seco percolado). Os extratos etanólicos foram levados à secagem com auxílio de evaporador rotatório até completa evaporação do solvente e liofilizados para eliminação total de solventes. Ao final, foram obtidos 143,05 g de extrato bruto de galhos e 55,81 g de extrato bruto de folhas.

**Figura 5 - Produção de extratos vegetais**



Legenda: A) percoladores através dos quais ocorreu o processo de maceração e coleta do extrato líquido; B) evaporador rotatório; C) extrato liofilizado e armazenado em frasco de vidro envolto por papel alumínio e devidamente identificado. Fonte: Autoral.

### 4.3. Estudo fitoquímico do extrato de galhos de *F. carica*

#### 4.3.1. Fracionamento por partição líquido-líquido (PLL)

Para essa partição, 1 g de amostra de extrato etanólico de galho de *F. carica* (FCG) foi inicialmente ressuspendido em 100 mL de água destilada, com auxílio de banho ultrassônico a 30°C por 10 minutos. Essa suspensão foi, então, transferida para funil de separação de 250 mL de capacidade, iniciando a partição com uma sequência de solventes com polaridade crescente, começando com hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol (**Figura 6A**).

Foram usados 100 mL de cada solvente na partição, sendo cada processo realizado com mais duas repetições totalizando três repetições. Ao término de cada extração, a fase orgânica foi separada e concentrada em evaporador rotatório para se obter o extrato seco. A fase aquosa foi levada a secagem pelo processo de liofilização. Para verificar o rendimento, cada fração foi pesada após secagem.

Assim, foram obtidas as frações em hexano (FH), diclorometano (FD), acetato de etila (FA) e *n*-butanol (FB) e aquosa.

O perfil fitoquímico de cada fração foi monitorado por cromatografia em camada delgada (CCD) (**Figura 6B**) tendo como fase estacionária sílica gel 60 G – F254 (em placa de vidro) e como fase móvel uma mistura de tolueno, éter etílico e ácido acético na proporção de 40:40:2. O revelador utilizado foi KOH 5% para a identificação de cumarinas que apresenta fluorescência azulada sob luz ultravioleta no comprimento de onda de 365 nm de acordo com WAGNER e BLADT, 1996.

**Figura 6 - PLL e monitoramento de metabólitos secundários por CCD**



Legenda: A) representa o processo de PLL em ordem crescente de polaridade; B) monitoramento qualitativo de cumarinas por CCD. Fonte: Autoral.

#### 4.3.2. Análise dos extratos de *F. carica* por UHPLC-ESI-MS/MS

As análises foram realizadas em equipamento UHPLC Nexera (Shimadzu) acoplado com espectrômetro de massas de alta resolução ESI-QTOF maXis ETD (Bruker) controlado pelo software Compass 1.5. Amostras foram diluídas na concentração final de 5 e 0,05 mg/mL, sendo injetado 3  $\mu$ L. A coluna usada foi Shimadzu Shim-Pack XR-ODS-III (C18, 2,2  $\mu$ m, 2.0  $\times$  150 mm), a 40  $^{\circ}$ C, com fluxo de 400  $\mu$ L/minuto. As fases móveis A (solução de ácido fórmico 0,1% em água deionizada) e B (0.1% ácido fórmico em acetonitrila) foram usadas em condição isocrática de 5% de B nos 5 minutos iniciais, seguido por um gradiente linear até 100% B no tempo de 40 minutos, persistindo nesta concentração por 5 minutos. Os espectros de massas foram adquiridos em modo positivo.

Parâmetros de ionização empregados foram energia de 4500 V voltagem capilar, 3,0 bar de pressão de nebulização, 8 mL/minuto e 200  $^{\circ}$ C de fluxo de gás

dessecante e temperatura, respectivamente. Para fragmentação foi empregada energia de colisão entre 15 e 60 eV, sendo a configuração dos íons otimizados para faixa de  $m/z$  100-1500. Para detecção das cumarinas psoraleno e bergapteno foram obtidos cromatogramas de íons extraídos (EIC) pelo registro da intensidade do sinal observado para valores de *massa exata* referente a estes dois compostos em função do tempo de retenção. A identificação dos picos cromatográficos foi realizada pela determinação da fórmula molecular de acordo com a massa exata e do envelope isótopo do íon molecular (MS1) e comparação dos espectros de fragmentação (MS2) com espectros de referência contidos em bancos de dados MassBank e UNPD-ISDB.

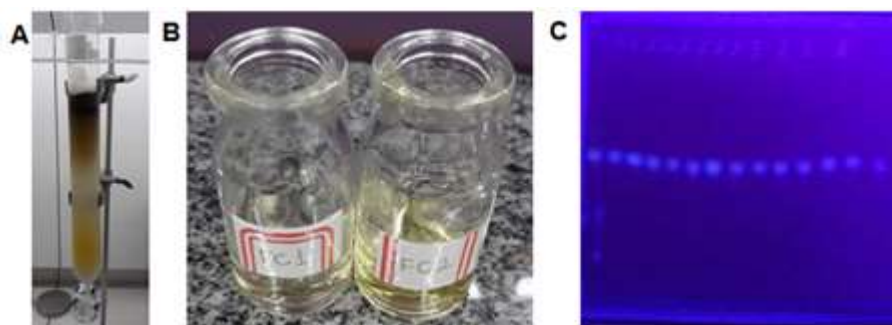
#### **4.3.3. Isolamento, purificação e identificação de metabólitos secundários do extrato ativo de galho de *F. carica***

Para a purificação de compostos bioativos a partir do extrato FCG, foi empregado cromatografia em coluna de sílica gel (40 cm x 10 cm), empacotada com 200 g de sílica gel 60 (0,05 – 0,20 mm/70 – 270 mesh ASTM), por meio de uma suspensão com de 1 L de hexano. O empacotamento da sílica na coluna foi realizado com passagem sucessiva de hexano. Uma alíquota de 15 g do extrato ativo FCG foi misturada com sílica gel e homogeneizada com auxílio de gral e um pistilo de porcelana, com adição de hexano. Esse material, quando uniforme, foi adicionado ao topo da coluna. Acima do material, foi depositado algodão para que a adição de solvente não tivesse impacto direto na coluna (**Figura 7A**).

O gradiente de eluição ocorreu utilizando os solventes puros ou uma mistura binária de solventes com o crescimento gradual e lento de polaridade sendo esses: hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol e metanol. Um total de 755 frações (FC 1 a FC 755) de 100 ou 200 mL foram coletadas da coluna, concentradas em evaporador rotatório (BUCHI Switzerland) em temperatura de 45°C e armazenadas em frascos de penicilina devidamente identificados (**Figura 7B**). O perfil cromatográfico das 755 frações eluídas da coluna foi monitorado por CCD (cromatografia em camada delgada), utilizando fases móveis de acordo com a polaridade dos compostos eluídos (**Figura 7C**). Os solventes reveladores anisaldeído sulfúrico e KOH 5% foram usados para visualizar a similaridade entre as

frações obtidas, sendo reunidas aquelas com mesmo perfil cromatográfico. A coluna também foi monitorada por meio de luz ultravioleta UV 254 e 365 nm. As frações com perfis cromatográficos similares foram reagrupadas, totalizando 28 grupos de frações (G1 a G28).

**Figura 7 - Coluna de sílica gel e armazenamento de frações**



Legenda: A) Coluna de sílica gel; B) Armazenamento das frações, após serem concentradas em evaporador rotatório, em frascos de penicilina devidamente identificados; C) Monitoramento do perfil químico das frações e grupos por CCD. Fonte: Autoral.

#### **4.3.4. Análise do perfil fitoquímico por HPLC-DAD**

Para o monitoramento quanto a presença de cumarinas no extrato ativo FCG e nos grupos de frações obtidos da cromatografia em coluna de sílica gel, aqueles grupos que apresentaram manchas referentes à cumarinas por CCD foram submetidos à cromatografia líquida de alta resolução com detector de fotodiodo (HPLC-DAD). O extrato FCG e de sete grupos G5, G6, G7, G8, G9, G18 e G20 foram escolhidos para serem analisados por HPLC. A escolha dos grupos se deu em função da presença de cumarinas, previamente obtidos pelas técnicas de cromatografia em camada delgada e por UHPLC-ESI-MS/MS.

O extrato ativo foi injetado na concentração de 2,5 mg/mL e os grupos em 1,0 mg/mL, sob fluxo de solvente de 1,0 mL/minuto, volume de injeção de 10  $\mu$ L, temperatura do forno de 40<sup>o</sup> C e coluna Phenomenex Luna C18 15  $\mu$ m. Foi feita eluição em gradiente entre os solventes A: água deionizada e B: MeOH grau HPLC. Em 0 minuto, a concentração do solvente B era correspondente a 50% e aumentou até que, em 12 minutos, a concentração era de 95% de B. Essa concentração manteve-se até os 13 minutos, retornando para 50% de B em 14 minutos e a corrida

encerrou em 15 minutos. A partir da análise dos cromatogramas gerados, elegeram-se 5 grupos (G5, G7, G8, G18 e G20) (**Figura 8**) para participarem do ensaio biológico - teste dos grupos na  $CL_{50}$  do extrato frente às ninfas de percevejo.

**Figura 8 - Grupos de frações selecionados para teste biológico**



Fonte: Autoral.

Os grupos G18 e G20 precisaram passar por uma etapa adicional chamada de *Clean up* antes de serem injetados no HPLC para a retirada de pigmentos. Primeiramente, foi preparada uma solução mãe contendo MeOH:Água (85:15 v/v). Foram pesados 20 mg de G18 e G20, separadamente, e solubilizados em 1,5 mL da solução mãe. Estas soluções foram deixadas em banho ultrassônico até completa solubilização dos grupos.

Um cartucho contendo C18 primeiramente recebeu 1,5 mL de MeOH<sup>o</sup> HPLC puro e foi lavado com auxílio de um êmbolo de seringa. O passo seguinte foi lavá-lo com 1,5 mL da solução mãe. Em seguida, a solução contendo o grupo foi adicionada ao cartucho e coletada em frasco de penicilina. Nesse momento, os compostos polares foram retirados por se tratar de um cartucho C18 e os compostos apolares ficaram retidos. Posteriormente, o cartucho foi novamente lavado com a solução mãe e o líquido coletado no mesmo frasco de penicilina. Somente após a realização deste *clean up* que os dois grupos foram injetados no HPLC.

O próximo passo foi lavar o cartucho com 3,0 mL de MeOH<sup>o</sup> HPLC puro para a retirada dos pigmentos e o líquido foi armazenado em outro frasco de penicilina devidamente identificado.

#### 4.4. Obtenção dos insetos

Os insetos *E. heros*, *Drosophila suzukii*, *Coleomegilla maculata*, *Eriopsis connexa* e *Chrysoperla externa* foram fornecidos pelo Laboratório de Fisiologia e Neurobiologia de Invertebrados da UFV. Já as espécies *Apis mellifera* e *Parthamona helleri* foram fornecidas pelo Apiário da UFV.

#### 4.5. Avaliação da ação inseticida

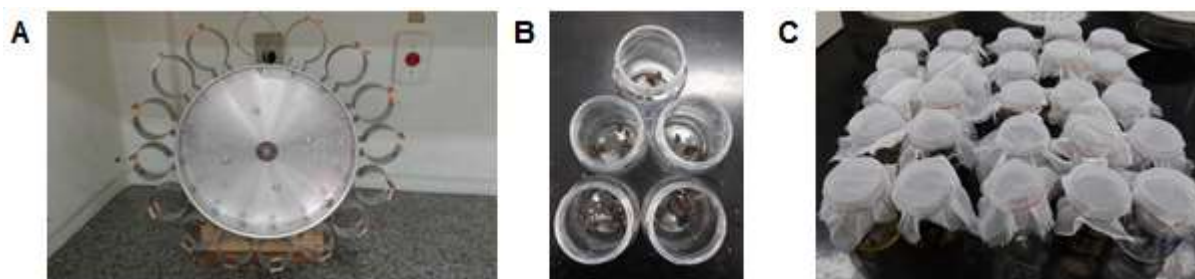
##### 4.5.1. Toxicidade dos extratos vegetais de *F. carica* em percevejos adultos por exposição por contato

Os bioensaios foram realizados em condições controladas (temperatura:  $26 \pm 3$  °C; umidade relativa:  $60 \pm 10\%$ ; fotofase: 14 h) e a exposição dos insetos seguiu o protocolo de SANTOS et al, 2015 com adaptações. Foram preparadas soluções aquosas com concentrações dos extratos de galho e folha de *F. carica* referente a 3,0% e 1,0% do volume final da solução. O dimetilsulfóxido (DMSO) foi usado como detergente para auxiliar na solubilização nas mesmas concentrações referentes aos extratos.

Uma alíquota de 2,0 mL da solução foi colocada em recipientes de vidro transparente de 250 mL de capacidade. Em seguida, os frascos foram acoplados em um sistema de rotor em posição horizontal dentro de uma cabine equipada com exaustor de forma a obter uma secagem homogênea nas paredes dos recipientes. Após secagem, a parte interna do topo de cada frasco foi revestida com Teflon para evitar que os insetos escapassem e 10 insetos adultos sexados (machos e fêmeas) foram colocados em cada recipiente, sendo este fechado com organza e elástico. Como tratamento controle, os insetos foram expostos a recipientes revestidos com água destilada e DMSO. Foram realizadas 5 repetições para cada tratamento (**Figura 9**).

. Após 24 e 48 horas de exposição, a mortalidade foi quantificada e os insetos foram reconhecidos como mortos quando incapazes de percorrer duas vezes o comprimento de seu corpo após estímulos mecânicos.

**Figura 9 - Ensaio de exposição por contato em percevejos adultos**



Legenda: A) Rrotor utilizado para secar os frascos de vidro (na presença de ventilador). B) frascos controles; C) tratados com extratos e contendo percevejos adultos. Fonte: Autoral.

#### **4.5.2. Toxicidade dos extratos vegetais de *F. carica* em percevejos adultos por exposição por ingestão e contato simultâneos**

Os bioensaios foram realizados em condições controladas (temperatura:  $26 \pm 3$  °C; umidade relativa:  $60 \pm 10\%$ ; fotofase: 14 h). Foram preparadas soluções aquosas com concentrações dos extratos de galho e folha de *F. carica* referentes a 1,0% do volume final da solução. Uma alíquota de 2 mL de extrato foi colocada em recipientes de vidro transparente de 250 mL de capacidade da mesma maneira que foi feito no item 4.5.1, sendo essa a forma de exposição dos insetos por contato aos extratos.

Outro passo, que configura a exposição por ingestão, foi realizado embebendo vagens, alimento dos percevejos, em 20 mL da solução aquosa dos extratos vegetais por 5 segundos, sendo posteriormente transferidas para os frascos de vidros previamente preparados. Tanto o recipiente de vidro quanto as vagens foram secos no sistema de rotor. Finalizada esta etapa, 10 insetos adultos sexados (machos e fêmeas) foram colocados em cada recipiente. A parte interna do topo de cada frasco foi revestida com Teflon para evitar que os insetos escapassem. Os frascos foram fechados com um pedaço de organza e elástico. Como tratamento controle, os insetos foram expostos a recipientes revestidos com água destilada e DMSO ou Tween 20 e a vagem seca embebida na mesma solução preparada para o recipiente (**Figura 10**). Para cada tratamento, foram feitas 5 repetições. Após 24 e 48 horas de exposição, a mortalidade foi quantificada e os insetos reconhecidos como mortos incapazes de percorrer duas vezes o comprimento de seu corpo após estímulos mecânicos.

**Figura 10 - Ensaio de exposição por ingestão e contato simultâneos em percevejos adultos**



Fonte: Autoral.

#### **4.5.3. Toxicidade dos extratos etanólicos de galho e folha de *F. carica* (FCG e FCF) em *E. heros* no terceiro instar**

##### **4.5.3.1 Toxicidade dos extratos vegetais em percevejos no terceiro instar por exposição por ingestão e contato simultâneos**

Este bioensaio foi realizado de maneira similar ao item 4.5.2. Como modelo animal, foram usados insetos no terceiro instar do desenvolvimento.

##### **4.5.3.2 Curva de mortalidade dose resposta dos extratos vegetais em relação aos percevejos no terceiro instar**

A curva de mortalidade foi feita seguindo a metodologia de exposição por contato de forma a mimetizar ao máximo o que acontece no ambiente real, onde os insetos não têm contato em tempo integral com a fonte de alimento. Por meio desta curva, foi possível avaliar o efeito tóxico dos extratos em diferentes concentrações e calcular os valores de  $CL_{50}$ . Foram preparadas soluções aquosas com concentrações dos extratos referentes a 0,15%, 1,0%, 1,5%, 2,0% e 3,0% do volume final da solução. O DMSO foi usado como detergente para auxiliar na solubilização dos extratos. Ele foi usado nas mesmas concentrações referentes aos extratos.

Uma alíquota de 2,0 mL da solução foi adicionada em recipientes de vidro transparente de 250 mL de capacidade. Em seguida, os frascos foram acoplados em um sistema de rotor em posição horizontal dentro de uma cabine equipada com exaustor de forma a obter uma secagem homogênea nas paredes dos recipientes

(Figura 11). Após secagem, a parte interna do topo de cada frasco foi revestida com Teflon para evitar que os insetos escapem e 10 insetos no terceiro instar do desenvolvimento foram colocados em cada recipiente, sendo este fechado com organza e elástico. Como tratamento controle, os insetos foram expostos a recipientes revestidos com água destilada e DMSO. Foram feitas 5 repetições para cada tratamento e o experimento foi realizado duas vezes em semanas distintas para se ter populações diferentes de insetos. Após 24 e 48 horas de exposição, a mortalidade foi quantificada e os insetos reconhecidos como mortos quando incapazes de percorrer duas vezes o comprimento de seu corpo.

**Figura 11 - Ensaio de toxicidade que gerou a curva de mortalidade**



Fonte: Autoral

#### **4.5.4. Toxicidade dos grupos de frações contendo cumarinas em *E. heros* terceiro instar**

Os grupos G5, G7, G8, G18 e G20, selecionados após estudo do perfil químico por demonstrar a presença de cumarinas por HPLC-DAD em 4.3.4, foram testados em ninfas de percevejo na concentração em que o extrato ativo FCG matou 50% dos insetos, conhecida como  $CL_{50}$ , de modo a observar as toxicidades desempenhadas pelos grupos e compará-las com a  $CL_{50}$  do extrato. A metodologia utilizada foi exposição por contato em ninfas do percevejo. Este resultado foi de suma importância para identificar qual ou quais compostos seriam responsáveis pela ação inseticida possibilitando chegar ao extrato padronizado.

#### **4.6. Toxicidade dos extratos vegetais FCG e FCF em relação ao alvo *Drosophila suzukii***

O ensaio de exposição dos insetos foi realizado seguindo protocolo adaptado do IRAC Método de Teste de Susceptibilidade Nº: 026.42. Foram utilizados frascos de vidro transparente de 200 mL de capacidade contendo um pavio de algodão ao fundo embebido com 1,8 mL das soluções de tratamento.

Para os tratamentos, foram utilizadas soluções aquosas açucaradas nas concentrações de 15000 e 30000 ppm dos extratos etanólicos de galho e folha de *F. carica*, contendo DMSO e Tween 20 na concentração de 1,25% (m/v) do volume final de solução. A solução de água açucarada foi preparada a partir de açúcar de cozinha dissolvido em água MilliQ na concentração de 20% (m/v). O controle foi constituído da solução de água açucarada contendo DMSO e Tween 20 na concentração de 1,25% (m/v). Os insetos foram adicionados nos frascos, os quais foram fechados com um plugue de espuma. Foram adicionados 25 insetos por frasco e um total de 5 repetições por tratamento. Os frascos foram mantidos em condições controladas (temperatura:  $25 \pm 2$  ° C; umidade relativa:  $55 \pm 10\%$ ; fotofase: 12 h) e após 24 horas avaliou-se a mortalidade dos insetos.

#### **4.7. Estudo ecotoxicológico do efeito dos extratos vegetais FCG e FCF em organismos não alvos**

Estas metodologias foram realizadas seguindo os estudos e teste requeridos pela legislação nacional vigente INC nº 26 de 26 de outubro de 2005 (BRASIL, 2005), alterada pela INC nº 03 de 19 de agosto de 2014 (BRASIL, 2014) e internacional OECD (Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico).

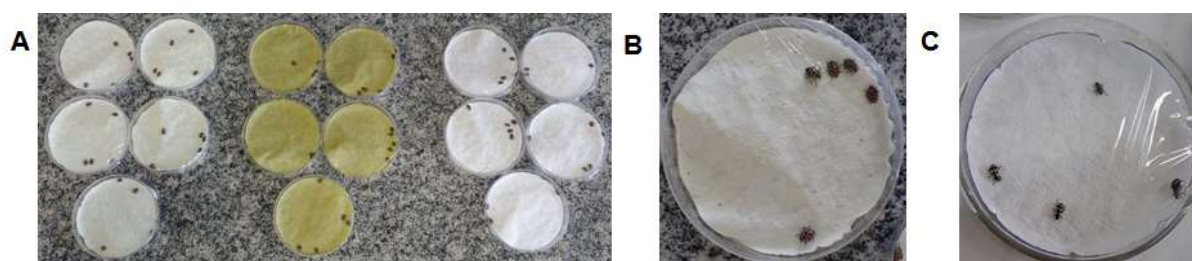
##### **4.7.1. Toxicidade dos extratos vegetais sobre *Coleomegilla maculata* e *Eriopsis connexa***

Duas espécies de joaninhas *Coleomegilla macuata* (DeGeer) e *Eriopsis connexa* (Germar) foram submetidas à avaliação de toxicidade frente aos extratos FCG e FCF por meio da metodologia de exposição por contato. Indivíduos adultos foram usados para experimento. Foram preparadas soluções aquosas na

concentração referente a 3% (30.000 ppm) dos extratos com DMSO e Tween 20 solubilizados em 1,25%.

Em uma placa de petri (9 cm de diâmetro) com fundo coberto por papel de filtro, foi aplicada uma alíquota de 500 uL de solução de maneira homogênea e o sistema permaneceu sob repouso à temperatura ambiente durante uma hora para que ocorresse a secagem completa do papel de filtro. Como controle negativo, foi preparada uma solução água destilada, DMSO e Tween 20 na concentração de 1,25%. Em seguida, foram adicionados 5 indivíduos adultos de cada espécie por placa de petri, sendo que para cada tratamento foram realizadas 5 repetições (**Figura 12**) O comportamento das joaninhas foi avaliado por 12 e 24 horas e a mortalidade foi quantificada.

**Figura 12 - Teste de segurança dos extratos em joaninhas**



Legenda: A) Avaliação da segurança dos extratos frente às joaninhas; B) Espécie *C. maculata*; C) Espécie *E. connexa*. Fonte: Autoral.

#### 4.7.2. Toxicidade dos extratos vegetais sobre *Chrysoperla externa*

Os insetos predadores crisoprídeos (*Chrysoperla externa*) foram submetidos à avaliação de toxicidade frente aos extratos FCG e FCF por meio da metodologia de exposição por contato. Foram preparadas soluções aquosas na concentração referente 3% (30.000 ppm) dos extratos com DMSO e Tween 20 solubilizados em 1,25% da solução final.

Em uma placa de petri de 6 cm de diâmetro com fundo coberto por papel de filtro, foi aplicada uma alíquota de 500 uL de solução de maneira homogênea e o sistema permaneceu sob repouso à temperatura ambiente durante uma hora para que ocorresse a secagem do papel de filtro. Como controle negativo, foi preparada uma solução água destilada, Tween 20 e DMSO na concentração de 1,25%. Em

seguida, foi adicionado 1 inseto no terceiro instar do desenvolvimento por placa de petri, sendo que para cada tratamento foram realizadas 30 repetições. O comportamento dos crisopídeo foi avaliado por 12 e 24 horas e a mortalidade foi quantificada.

#### **4.7.3. Teste de toxicidade oral aguda nos extratos vegetais sobre *Apis mellifera* e *Parthamona helleri***

Abelhas adultas das espécies *A. mellifera* e *P. helleri* foram expostas a concentração de 3% (30.000 ppm) dos extratos em experimentos isolados de acordo com a espécie. Os extratos vegetais FCG e FCF foram diluídos em uma solução contendo água e açúcar (50% m/v), Tween 20 0,1% e DMSO 1,25% da solução final e dados às abelhas em microtubos de 2,0 mL inseridos em um sistema de baixa densidade de 250 mL de capacidade. A solução de água açucarada foi preparada a partir de açúcar cristal dissolvido em água MilliQ na concentração de 50% (m/v). Os controles foram uma solução contendo água com açúcar apenas e outra solução contendo água açucarada, DMSO 1,25% e Tween 20 0,1%. Foram realizadas cinco repetições por tratamento.

Em cada recipiente, foram adicionadas 10 abelhas (que passaram por jejum de uma hora antes do início do experimento) (**Figura 13**). Depois de 6 horas de exposição oral aos extratos, as abelhas receberam dieta livre de extrato e os insetos foram avaliados após mais 18 horas, totalizando 24 horas. As abelhas foram mantidas em B.O.D 32º C e 28º C (*A. mellifera* e *P. helleri* respectivamente), 80% de umidade e foram consideradas mortas se incapazes de locomoverem quando estimuladas. Todos os microtubos foram pesados antes e após a troca da dieta a fim de se avaliar o consumo. Os sistemas foram mantidos em B.O.D com leve inclinação de forma que as abelhas conseguissem ter acesso ao alimento.

**Figura 13 - Teste de segurança dos extratos em abelhas**



Legenda: A) Avaliação da segurança dos extratos frente às abelhas; B) Espécie *A. mellifera*; C) Espécie *P. helleri*. Fonte: Autoral.

#### **4.8. Avaliação da fitotoxicidade do extrato de galho de *F. carica* em mudas de tomateiro *Solanum lycopersicum* L. cultivar Santa Cruz**

Sementes de tomateiro de cultivar Santa Cruz foram transferidas para sementeira contendo substrato comercial organomineral e mantidas em casa de vegetação até alcançarem 1 par de folhas definitivas, com temperatura média de 27°C. Após esse período, as plantas foram transferidas para potes plásticos com capacidade de 150 mL contendo solo de barranco e areia (1:1). Para os tratamentos do solo, foram utilizadas soluções aquosas nas concentrações finais em solo de 500, 1.500, 2.500 e 3.500 ppm dos extratos etanólicos de galho de *F. carica*, com DMSO e Tween 20 na concentração de 1,25% (m/v) do volume final de solução.

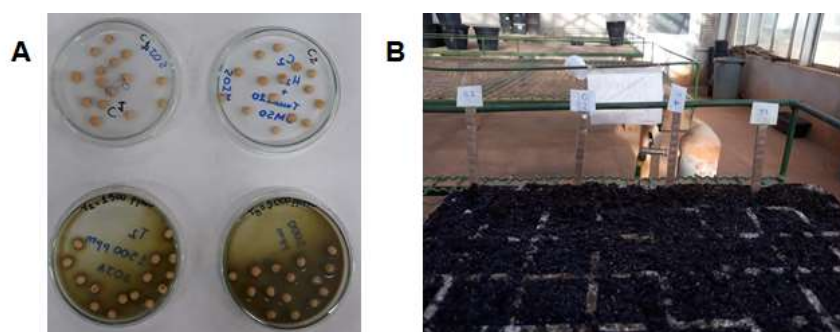
Como controle, foi preparada uma solução aquosa contendo 1,25% de DMSO e Tween 20 (m/v) solubilizados e um controle contendo apenas água MilliQ. Alíquotas de 5 mL de solução foram aplicadas na superfície do solo. As soluções foram aplicadas em 4 tempos diferentes: 14 dias antes do transplante, 7 dias antes do transplante, no dia do transplante e 7 dias após o transplante. Após as aplicações dos tratamentos, as plantas foram monitoradas para a observação de sintomas de fitotoxicidade por 14 dias, duas vezes ao dia. Foi adicionada 1 planta por pote e cada tratamento foi repetido 5 vezes.

#### **4.9. Avaliação da fitotoxicidade do extrato de galho de *F. carica* na germinação e no desenvolvimento das plântulas de soja: teste de semente**

Dez sementes de soja cultivar M5947-PRO foram tratadas com 5 mL de soluções finais em solo de 1.500 e 3.000 ppm do extrato etanólico de galho de *F.*

*carica* e deixadas em repouso por 6 horas em ausência de luz e em temperatura ambiente. Os extratos foram solubilizados em solução aquosa contendo 1,25% de DMSO e Tween 20. Um controle negativo foi uma solução aquosa contendo 1,25% de DMSO e Tween 20 e outro apenas água MilliQ. Após esse período de tempo, as sementes foram transplantadas para sementeira contendo substrato comercial organomineral e a porcentagem de germinação e o desenvolvimento das plântulas de soja foi acompanhado por duas semanas (**Figura 14**). A germinação e crescimento das mudas foram observados de modo a saber se o extrato FCG exerceria alguma ação sobre elas.

**Figura 14 - Teste de Semente**



Legenda: A) Tratamento das sementes de soja com soluções controle e extrato; B) Montagem da sementeira com as sementes tratadas. Fonte: Autoral.

#### 4.10. Análise estatística

Todos os delineamentos experimentais foram realizados de maneira inteiramente casualizada. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de médias utilizando o software Sigmaplot versão 12.5 (SYSTAT Software) e GraphPad Prisma 7, os quais foram utilizados para a confecção dos gráficos. Os dados de mortalidade foram utilizados para a obtenção das curvas de mortalidade através do modelo PROBIT (Finney, 1964) com os respectivos valores de  $CL_{50}$  através do software SAS versão 9.4 (SAS Institute).

#### 4.11. Aprovação ética

Diretrizes internacionais, nacionais e institucionais aplicáveis para o cuidado e uso dos insetos foram consideradas no presente trabalho.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Coleta do material vegetal e produção dos extratos

Após secagem, o material vegetal seco pulverizado foi de 1.965 g para o galho e 1080 g para a folha. O rendimento de cada extrato está representado na **Tabela 2**. O extrato com maior rendimento foi o da folha (FCF) com 19% (m/m) seguido pelo galho (FCG) com 7,3% (m/m).

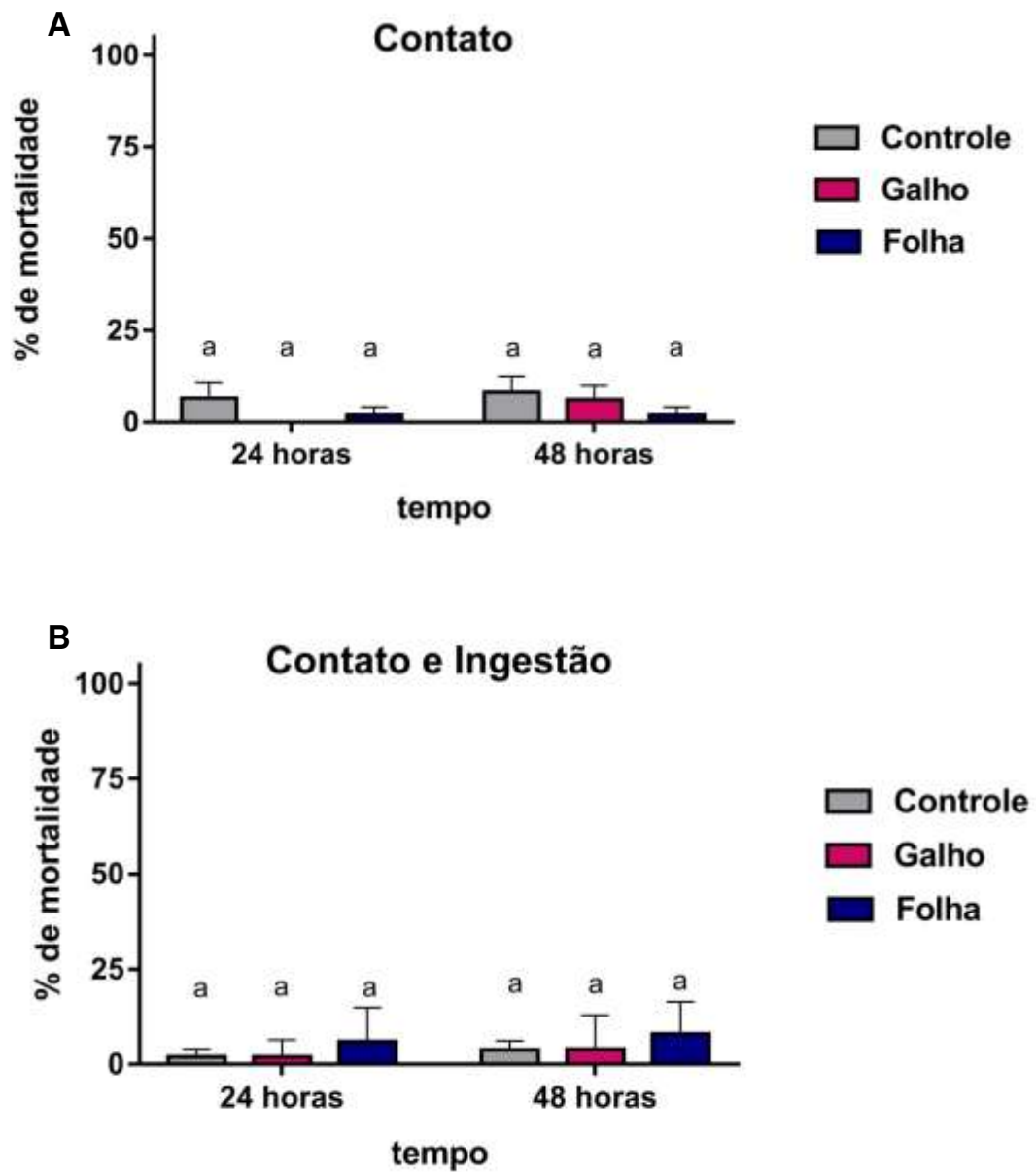
**Tabela 2 - Rendimento da produção dos extratos vegetais de *F. carica* (L.) por meio de percolação exaustiva**

Parte da planta	Material fresco (g)	Material seco (g)	Material vegetal (g) percolado	Extrato Bruto (g)	Rendimento % (m/m)
Galho (FCG)	6280	1965	1965	143,05	7,3
Folha (FCF)	3795	1080	300	55,81	19

### 5.2. Atividade inseticida dos extratos vegetais de *F. carica* frente a percevejo-marrom adulto

Foi avaliada a atividade inseticida de dois extratos vegetais feitos a partir de galhos e folhas de *F. carica* frente ao alvo agrícola *E. heros* adulto popularmente conhecido como percevejo-marrom-da-soja. Por contato, a mortalidade foi de 6% para o extrato de galho e 2% para o extrato de folha enquanto por ingestão e contato, a mortalidade foi de 4% para o galho e 8% para folha em 48 horas de avaliação. Logo, não foi observada atividade inseticida dos extratos contra este alvo (**Figura 15**).

Figura 15 – Mortalidade de *E. heros* adulto tratado com extratos de *F. carica*



Legenda: A) Ensaio de exposição por contato a 3,0%. B) Ensaio de exposição por ingestão e contato simultâneos a 1,0%. As médias não diferem entre si pela análise de variância ANOVA ( $P \leq 0,05$ ). O controle usado foi uma solução aquosa contendo DMSO solubilizado na mesma concentração do extrato, ou seja, 3,0% e 1,0% respectivamente.

Resultados prévios obtidos pelo grupo BIOPROS demonstraram que o extrato etanólico de galho de *F. carica* apresentou pronunciada atividade nematicida *in vitro*, correspondente a 98%, contra o nematoide *Meloidogyne javanica* (ALVES et al, 2020). Trata-se de uma espécie de nematoide formadora de galhas em raízes e

implicam em grande perda para a cultura da soja (MANSO et al, 1994; JONES et al, 2013). De maneira similar, LIU et al, 2011 observaram potente atividade nematicida do extrato metanólico de folha de *F. carica* frente aos nematoides *Bursaphelenchus xylophilus*, *Panagrellus redivivus* e *Caenorhabditis elegans*, causando 74,3%, 96,2% e 98,4% de mortalidade respectivamente. Este foi o primeiro relato da atividade nematicida desta espécie de planta associada à cumarinas psoraleno.

O extrato etanólico de folhas de *F. carica* mostrou forte atividade nematicida frente ao nematoide *Bursaphelenchus xylophilus*, causando mortalidade de 90,93% em 72 horas a 1,0 mg/mL. A análise química da fração em acetato de etila, cuja mortalidade foi de 95,27% em 72 horas, por espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear (RMN), após isolamento e identificação, mostrou duas furanocumarinas: bergapteno e psoraleno. Estes compostos purificados também foram submetidos à avaliação da atividade nematicida e a CL<sub>50</sub> foi de 97,08 µg/mL para o bergapteno e 115,03 µg/mL para o psoraleno, mostrando-se muito potentes. Os resultados indicam que esses dois compostos são os principais com atividade nematicida na espécie *F. carica* (GUO et al, 2015).

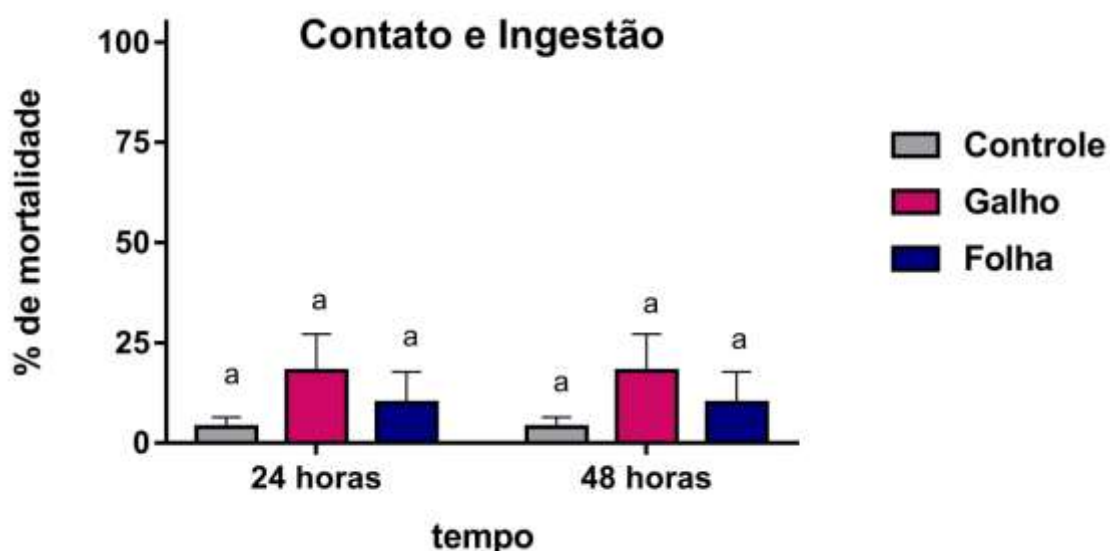
Outro estudo também relaciona essas duas furanocumarinas com atividade nematicida em outra espécie de planta. O extrato metanólico e o óleo essencial de *Petroselinum crispum* exibiram significativa atividade nematicida contra os nematoides *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne hapla* e *Meloidogyne arenaria*. As furanocumarinas mais abundantes nesse extrato metanólico foram xantotixina, psoraleno, bergapteno e *oxypeucedanin* (CABONI et al, 2015). Visto os resultados à cima apresentados, foi dado prosseguimento ao estudo com a *F. carica* nesta pesquisa, buscando outras possíveis atividades dos extratos vegetais de *F. carica* com potencial utilização na agricultura.

### **5.3. Avaliação da toxicidade dos extratos vegetais de *F. carica* em *E. heros* no terceiro instar**

Mesmo não tendo sido observada ação inseticida contra *E. heros* adultos dos extratos vegetais de *F. carica*, foi avaliada atividade biológica contra as ninfas de percevejo-marrom-da-soja no terceiro instar do desenvolvimento por meio da metodologia de ingestão e contato com concentração de 1,0% dos extratos. Também não foram encontradas mortalidades significativas (**Figura 16**). A

mortalidade causada pelo extrato galho foi de 16% e pelo extrato da folha, de 10%. Isso pode estar associado à disponibilidade do alimento que fornece mais energia para o animal, o deixando mais resistente aos estímulos negativos advindos dos extratos além de limitar a locomoção do animal na superfície tratada com o extrato.

**Figura 16 – Mortalidade de ninfas de *E. heros* tratadas com extratos de *F. carica***

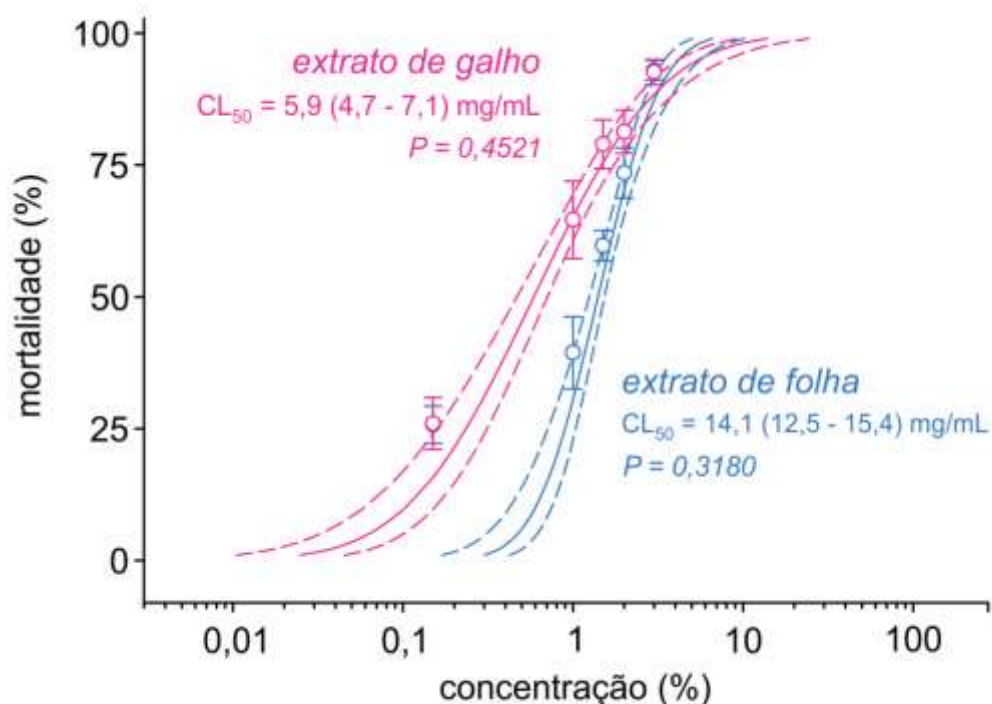


Legenda: Ensaio de exposição por ingestão e contato a 1,0% de extrato. As mortalidades foram observadas após 24 horas e 48 horas de exposição. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Dunnett e pela análise de variância ANOVA a 5% de significância. O controle usado foi uma solução aquosa contendo DMSO a 1,0%.

### 5.3.1. Curva de mortalidade

De maneira a estudar o comportamento das ninfas de percevejo no terceiro instar quando submetida à metodologia de exposição apenas por contato, foi realizado o ensaio em diferentes concentrações dos extratos vegetais para determinar a curva de mortalidade dose resposta (**Figura 17**). A  $CL_{50}$  estimada para o extrato de galho foi de 5,9 mg/mL e para o extrato de folha foi de 14,1 mg/mL. Observa-se, assim, que o extrato de galho foi o mais ativo, ou seja, é necessária menor quantidade de extrato de galho para matar 50% dos insetos do que de folha. E foi encontrada atividade inseticida contra ninfas de *E. heros* em terceiro instar tanto para o extrato do galho quanto para o extrato da folha de *F. carica*.

Figura 17 – Curva de mortalidade dose-resposta de ninfas de percevejo-marrom tratadas com extrato de *F. carica*



Legenda:  $CL_{50}$  corresponde à concentração que mata 50% das ninfas. Os valores de P indicam os valores de probabilidade obtidos para cada curva através do modelo PROBIT.

A soja se estabeleceu como a principal cultura agrícola rentável para a economia brasileira (GRAÇA et al, 2016). No entanto, a produção só não é maior por conta de as plantações serem constantemente acometidas pelo ataque de insetos-pragas, em especial o percevejo-marrom da soja *Euschistus heros* (F.). Este alvo agrícola é bastante adaptável às regiões em que ocorrem o plantio e seu controle se dá, em maior parte, por meio da aplicação de inseticidas (PANIZZI, BUENO e SILVA, 2012; GRAÇA, 2016; STHAL, BABENDREIER, HAYE, 2019).

Recentemente, fontes alternativas de produção de inseticidas têm sido bastante estudadas. Os extratos botânicos, por serem oriundos da biodiversidade, são excelentes fontes de futuros produtos para abastecer a demanda da agroindústria, sendo eficientes no controle do alvo agrícola e paralelamente seguros para os organismos não alvos presentes no ambiente (ISMÁN 2017; CAMPOS et al, 2019). Os inseticidas botânicos supostamente não impõem os mesmos riscos que

os sintéticos. Logo o interesse por eles como técnica de controle tornou-se relevante no controle de insetos-pragas (REGNAULT-ROGER, 2012; ISMAN e GRIENESEIN, 2014; ISMAN, 2017).

A espécie *Ficus carica* (Linn) possui longo uso tradicional associado, sendo sua monografia incluída em muitas farmacopeias e livros de fitoterapia (BAROLO, MOSTACERO e LÓPEZ, 2014). Trata-se também de uma espécie com potencial contribuição para o setor da agricultura. A atividade nematicida *in vitro* de extratos de *F. carica* já foi relatada na espécie e atribuída à presença de duas furanocumarinas: psoraleno e bergapteno (LIU et al, 2011; BADGUJAR et al, 2014; GUO et al, 2015).

PAVELA et al, 2019, em sua revisão, analisaram resultados obtidos de mais de 400 espécies de plantas com relação à atividade larvicida contra os principais vetores pertencentes ao gênero *Anopheles*, *Aedes* e *Culex*. Neste trabalho, algumas espécies pertencentes ao gênero *Ficus*, como *Ficus benghalensis* L., *Ficus microcarpa* L., *Ficus rancemosa* L. e *Ficus religiosa* L, foram abordadas como detentoras desta atividade contra o inseto *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* e *Culex gelidus* em terceiro instar, em valores de  $CL_{50}$  inferiores a 100 ppm. Neste caso, a atividade foi proveniente dos extratos metanólicos de folha dessas espécies vegetais. Os autores apontaram os compostos químicos responsáveis por essa atividade biológica nas plantas são alcaloides, cumarinas (furanocumarinas – khellina e visnagina), antraquinonas, flavonoides, acetogeninas, sesquiterpenos lactonas, esteróis (PAVELA et al, 2019).

CHUNG et al, 2011 encontraram significativa ação tóxica do látex de *F. carica* contra ninfas de *A. aegypti* em quarto instar com valor de  $CL_{50} = 10,2 \mu\text{g/mL}$  e  $CL_{90} = 42,3 \mu\text{g/mL}$ . Duas furanocumarinas naturais 5-metoxipsoraleno e 8-metoxipsoraleno foram isoladas do látex de *F. carica* e submetidas a mesma avaliação biológica sendo encontrados respectivos valores de  $CL_{50}$ :  $9,4 \mu\text{g/mL}$  e  $56,3 \mu\text{g/mL}$ . Os insetos estudados são vetores de muitas doenças causadas por patógenos e parasitas (FERNANDES et al, 2018) e um inseticida natural contra eles é de grande interesse do mercado tendo a espécie *F. carica* grande potencial para tanto (CHUNG et al, 2011).

KIM et al, 2005 realizaram *screening* de extrato bruto de plantas para avaliar atividade inseticida e acaricida e duas espécies do gênero *Ficus* foram estudadas,

*Ficus carica* e *Ficus erecta*. Os resultados apontaram que o extrato metanólico espécie *F. carica* interferiu negativamente na reprodução do ácaro *Tetranychus urticae*, apresentou atividade inseticida contra *Aphis gossypii* e *Trialeurodes vaporariorum* (com 80% de mortalidade) de forma que poderiam ser úteis no desenvolvimento de novos tipos de acaricidas e inseticidas. Não foram realizados estudos químicos associando a atividade biológica.

Em vista do que foi discutido acima, possivelmente a atividade inseticida para ninfas de percevejo encontradas no presente trabalho também possa estar associada à presença e ação de cumarinas e seria de grande interesse do mercado agrícola que os extratos fizessem parte de formulações e chegassem as plantações como forma de combate ao alvo *E. heros*.

#### **5.4. Estudo fitoquímico de *Ficus carica***

O extrato vegetal é uma matriz bastante complexa de compostos químicos e detém atividade biológica em função dos compostos químicos que ele detém (BAROLO, MOSTACERO e LÓPEZ, 2014; CASANOVA e COSTA, 2017). Os resultados fornecidos pela curva de mortalidade dose-resposta mostraram que tanto o extrato etanólico do galho quanto o da folha apresentaram atividade inseticida, sendo FCG o mais ativo por apresentar menor  $CL_{50}$ . A literatura aponta a riqueza química presente na espécie vegetal *F. carica* e estudos farmacológicos mostram a importância de determinados compostos como os ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas, cumarinas com bastante foco em furanocumarinas, terpenoides (BADGUJAR, 2014; ABDEL-ATY et al, 2019).

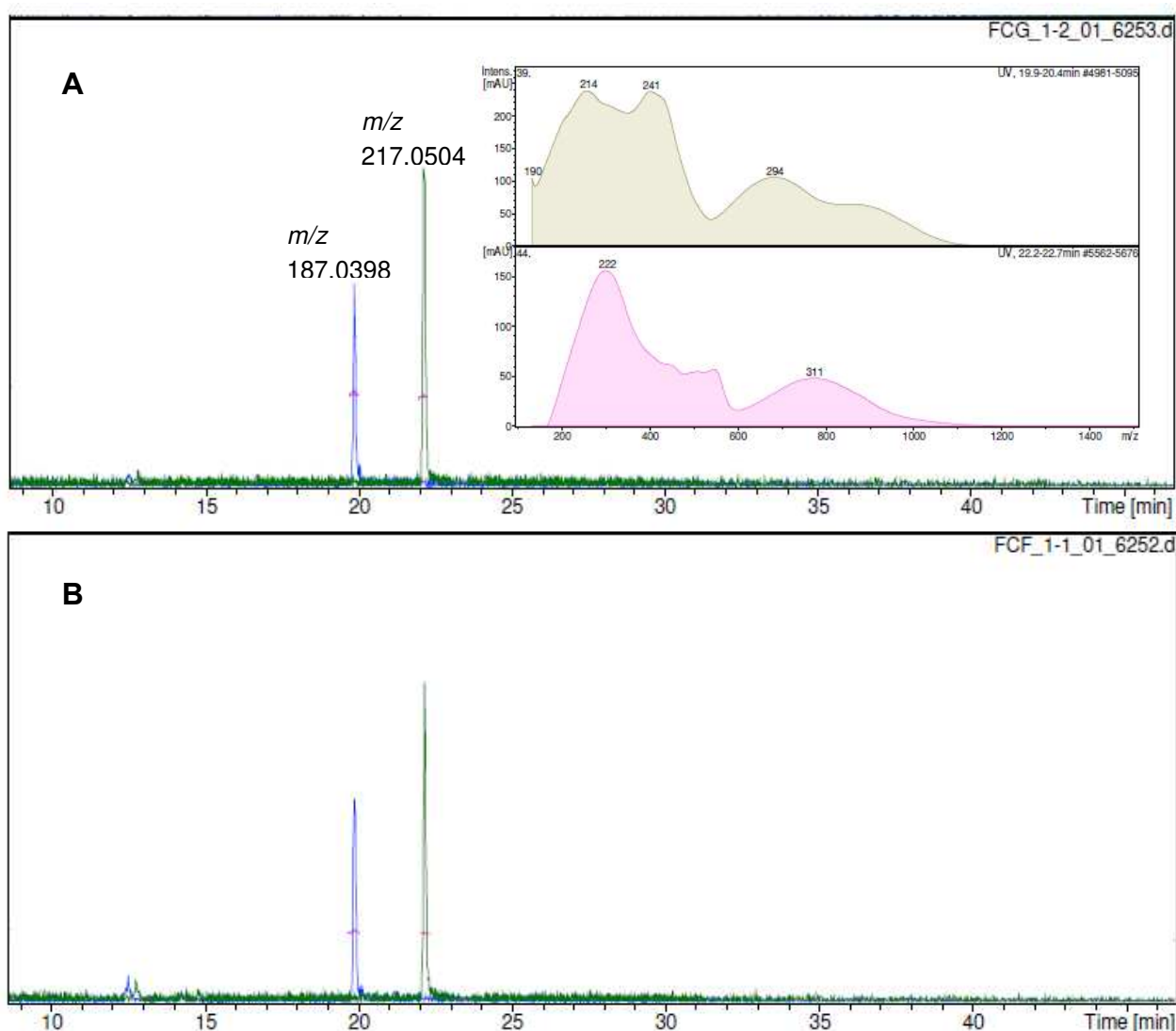
Ao trabalhar com defensivos agrícolas a partir de extrato botânico, é de extrema importância ter conhecimento dos compostos químicos bioativos presentes, quais são os responsáveis por essa atividade biológica ou se ela é por conta de sinergismo químico (JUNIO et al, 2011; CASANOVA e COSTA, 2017), de forma a alcançar um extrato padronizado. A espécie *F. carica* já possui relato de estudos fitoquímicos na literatura (MAWA, HUSAIN e JANTAN, 2013; BADGUJAR et al, 2014; BOROLO, MOSTACERO e LÓPEZ, 2014).

No intuito de conhecer qual (is) compostos (s) foram responsáveis pela ação inseticida de FCG, prosseguiu-se com o isolamento, purificação e identificação química associando técnicas cromatográficas à espectrometria de massas.

#### 5.4.1. Análise dos extratos vegetais de *F. carica* por UHPLC-ESI-MS/MS

Os extratos vegetais FCG e FCF foram analisados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução para investigação da presença das cumarinas psoraleno e bergapteno (**Figura 18**).

**Figura 18 – Cromatogramas de íons extraídos obtido por UHPLC-ESI-MS/MS (modo positivo) para  $m/z$  187,0398 (psoraleno) e  $m/z$  217,0504 (bergapteno) das amostras A: FCG  $t_R$  19,9 minutos e B: FCF  $t_R$  22,2 minutos**



Ambos os cromatogramas obtido por UHPLC-ESI-MS/MS, em modo positivo (íon extraído) de extratos de galho e folhas de *F. carica* indicaram a presença das cumarinas psoraleno ( $t_R$  19,9 minutos) e bergapteno ( $t_R$  22,2 minutos). Devido à ausência de um grupo funcional facilmente desprotonado, o cromatograma foi

observado em modo positivo. Os íons quase moleculares  $m/z$  187,0398 e  $m/z$  217,0504 foram compatíveis com as fórmulas moleculares  $C_{11}H_6O_3$  (psoraleno) e  $C_{12}H_8O_4$  (bergapteno), respectivamente. As fragmentações apresentadas nos espectros MS2 confirmam as estruturas desses compostos (**Tabela 3**) (LIU et al, 2010).

**Tabela 3 - Compostos identificados em FCG e FCF por UHPLC-ESI-MS/MS**

Composto	T <sub>R</sub> (min)	m/z (M+H) <sup>+</sup>	Mass bank	MS/MS (Fragmentações)
Psoraleno	19,9	187,0398	187.0403	159.0431 [M+H-CO] <sup>+</sup> , 143.0476 [M+H-CO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> , 131.0473 [M+H-2CO] <sup>+</sup> , 115.0531 [M-CO-CO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>
Bergapteno	22,2	217,0504	217,0498	202.0259 [M+H-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> , 173.0594 [M+H-CO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> , 115.0538 [M+H-CO <sub>2</sub> -2CHO] <sup>+</sup>

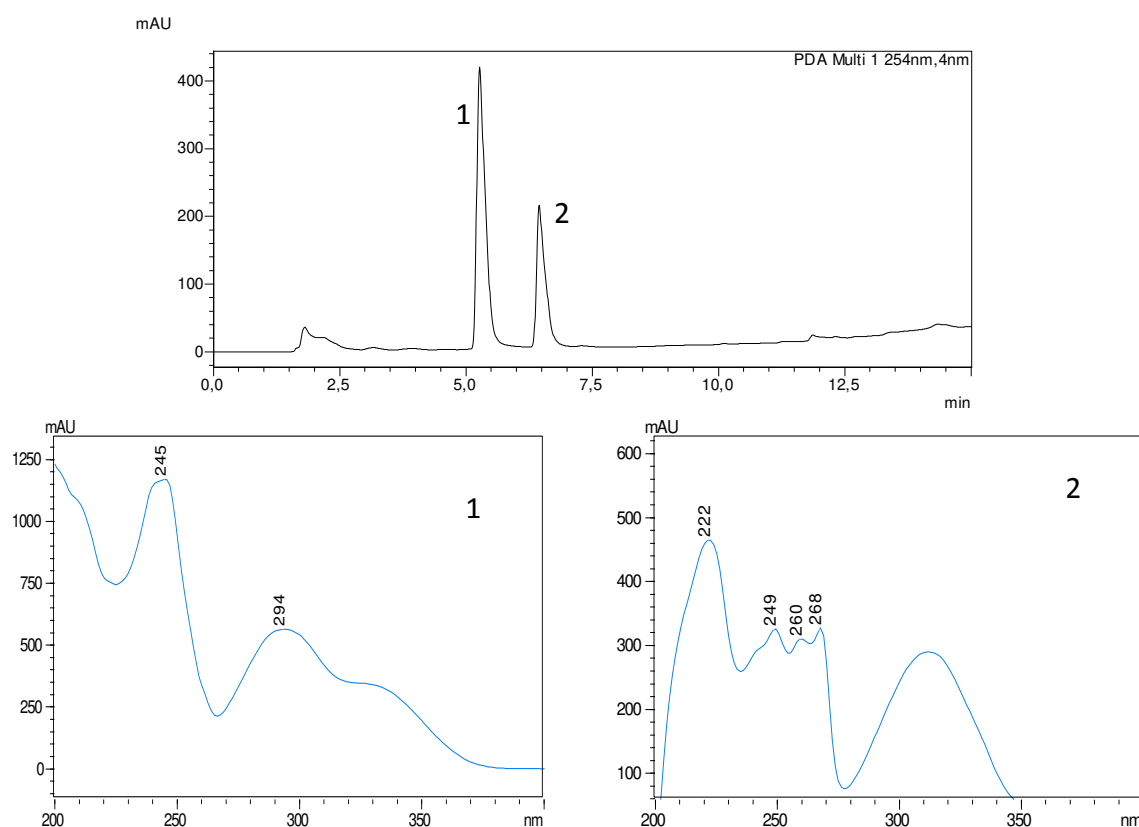
Ambas as cumarinas já foram previamente identificadas em *F. carica* (MAWA, HUSSAIN e JATAN, 2013; BADGUJAR et al, 2014; BOROLO, MOSTACERO e LÓPEZ, 2014). PETRUCCELLI, IERE e BONETTI 2018 estudaram o perfil polifenólico de folhas de *F. carica* (L.) variedade italiana por HPLC-DAD-TOF-MS em modo negativo e classificaram os compostos encontrados entre flavonoides e não flavonoides (ácidos fenólicos derivados de ácidos hidroxicinamicos e furanocumarinas). Duas furanocumarinas foram detectadas. O psoraleno apresentou absorção nos comprimentos de onda em 210, 245, 294 e 330 nm. Já o bergapteno (5-metoxipsoraleno) mostrou absorção em comprimentos de onda de 222, 250, 268 e 312. Esses comprimentos de ondas foram condizentes aos encontrados por HPLC-DAD e LC-HRMS neste trabalho.

#### 5.4.2. Monitoramento por HPLC/DAD do extrato ativo FCG

O perfil fitoquímico do extrato FCG foi monitorado por Cromatografia Líquida de Alta Performance com detector fotodiodo (HPLC-DAD). Ao analisar o cromatograma de FCG (**Figura 19**), é possível observar a presença de dois picos

majoritários bastante semelhantes ao que foi observado no UHPLC-ESI-MS/MS. O pico 1 detém tempo de retenção de  $t_R$  5,35 minutos e o pico 2,  $t_R$  6,5 minutos. Analisando o cromatograma com detalhes em UV 254 nm, é possível observar convergência entre os comprimentos de ondas dos picos em HPLC-DAD com os picos em UHPLC-ESI-MS/MS, sendo possível relacioná-los aos mesmos compostos, ou seja: o pico 1 do cromatograma refere-se ao psoraleno e o pico 2 ao bergapteno. Também existe convergência dos comprimentos de onda dos picos majoritários com dados obtidos da literatura científica (PETRUCCELLI, IERE e BONETTI, 2018).

**Figura 19 – Perfil cromatográfico do extrato de galho de *F. carica* por HPLC/DAD com detalhes em UV 254 nm**



#### 5.4.3. Isolamento e identificação de compostos da fração ativa

O extrato de galho de *F. carica*, por ser o mais ativo entre os dois estudados, foi selecionado para seguir para etapa de isolamento por cromatografia em coluna de sílica gel. Na medida em que o fracionamento cromatográfico foi realizado por uma série eluotrópica empregando solventes de polaridade crescente (hexano,

diclorometano, acetato de etila, etanol e metanol), frações foram coletadas, concentradas em rotaevaporador e armazenadas em frascos de penicilina devidamente identificados.

Um total de 755 frações foram obtidas e estudadas por cromatografia em camada delgada para identificação qualitativa do perfil químico. Frações com perfil semelhante foram agrupadas e, no final, foram obtidos 57 grupos. Esses grupos passaram por outro processo de reagrupamento finalizando em 28 grupos de frações (G1 a G28) que tiveram seu rendimento calculado (**Tabela 4**).

**Tabela 4 - Rendimento dos grupos de frações obtidos da coluna cromatográfica de sílica gel.** Os grupos G26, G27 e G28 não tiveram o rendimento calculado em massa uma vez que o aspecto que eles encontravam-se era de um óleo, sendo representado por – na tabela.

Grupo	Frações	Rendimento (mg)
G1	1	114
G2	2 ao 4	319
G3	5 e 6	32
G4	7 e 8	80
G5	9 e 10	170
G6	11 e 12	251
G7	13 e 14	471
G8	15 ao 17	180
G9	18 ao 20	35
G10	21 ao 27	77
G11	28 e 29	60
G12	30 ao 33	112
G13	34 ao 36	109
G14	37 e 38	89
G15	39 ao 41	75
G16	42 ao 44	102
G17	45	191
G18	46	316
G19	47	392
G20	48	406
G21	49 e 50	228
G22	51	713
G23	52	168
G24	53	82
G25	54	90
G26	55	-
G27	56	-
G28	57	-

Destes, sete grupos (G5, G6, G7, G8, G9, G18 e G20) foram selecionados para serem analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, tanto pelo fato de terem sido identificadas manchas referentes à cumarinas por CCD (G18 e G20 - **Figura 20**) quanto pelo aparente grau de pureza no frasco de penicilina (G5 a G9).

**Figura 20 – Perfil cromatográfico dos grupos G18 e G20 por CCD**



Legenda: Observação de cumarinas em 365 nm. O padrão para comparação e monitoramento das cumarinas foi a fração em diclorometano obtida a partir da partição líquido-líquido do extrato de galho (primeiro spot da esquerda para a direita). O círculo em preto refere-se à cumarinas presentes no grupo 18 e o círculo em branco refere-se à cumarinas presente no grupo 20.

Nos cromatogramas dos grupos G5 a G9 obtidos usando o detector DAD em comprimento de onda 254 nm, pode-se observar a presença dos dois picos majoritários com o mesmo tempo de retenção dos picos que apareceram no extrato FCG. Foram adotadas as mesmas condições cromatográficas para a análise do extrato bruto de galho e dos grupos.

Ao observar os cromatogramas dos grupos de frações selecionados (**Figura 21**), é possível observar que G5 possui pico majoritário com tempo de retenção de 5,35 minutos. O G6 possui o mesmo pico majoritário e predominante, porém já é observado o início de um segundo pico em 6,5 minutos de corrida. G7 possui perfil químico mais semelhante ao extrato bruto de galho com um dois picos majoritários em tempos de retenção de 5,35 e 6,5 minutos. G8 possui ambos os picos, sendo o segundo predominante. Em G9, o segundo pico em  $t_R$  6,5 minutos é predominante porém ainda é observado a presença da pico 1. Uma vez que já é sabido que o pico

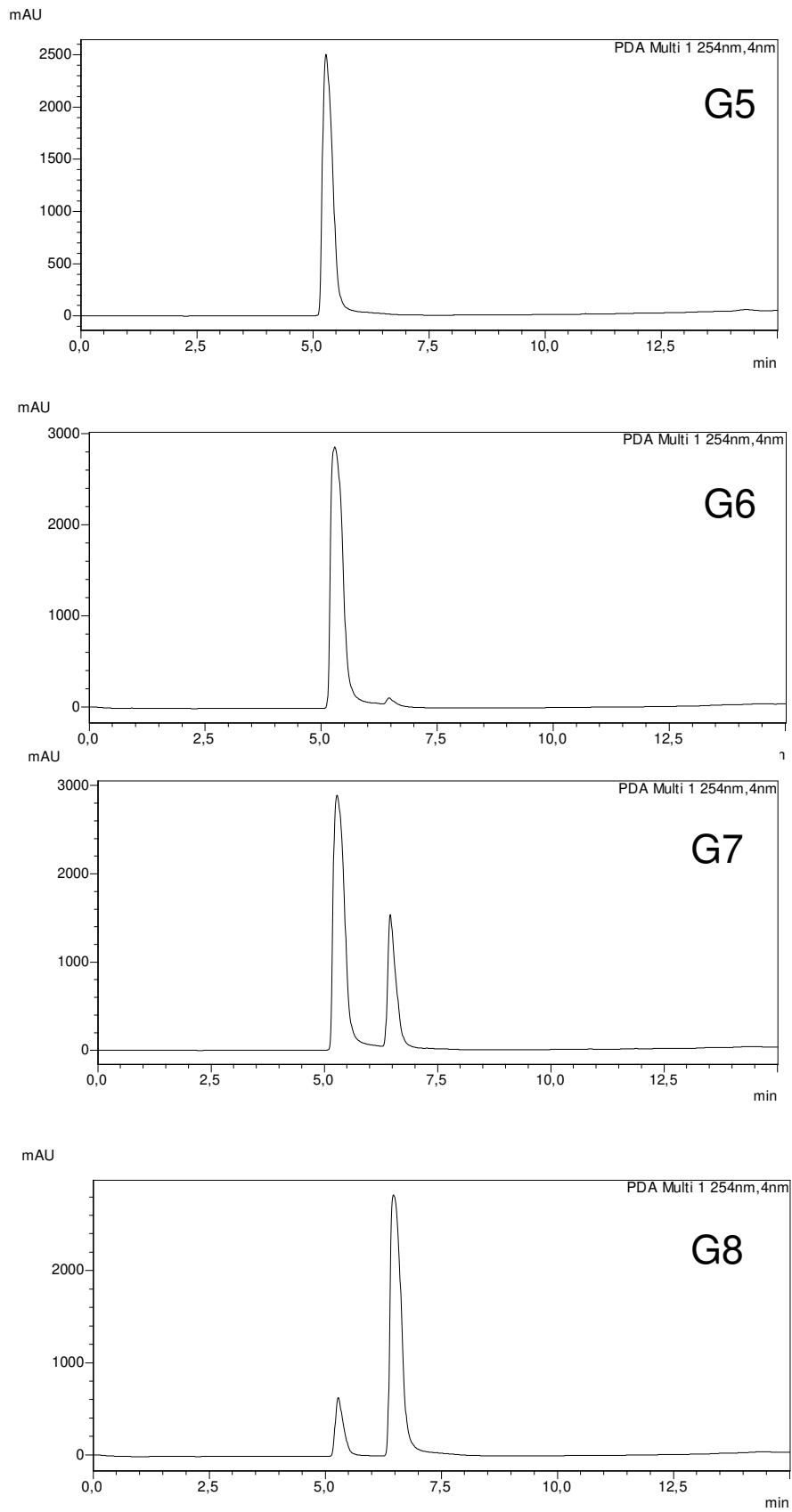
1 e 2 do extrato bruto de galho referem-se ao psoraleno e bergapteno respectivamente e que seus tempos de retenção são 5,35 e 6,5 minutos, analisando os tempos de retenção dos grupos de fração (G5 a G9) é possível afirmar de que trata-se de psoraleno e bergapteno.

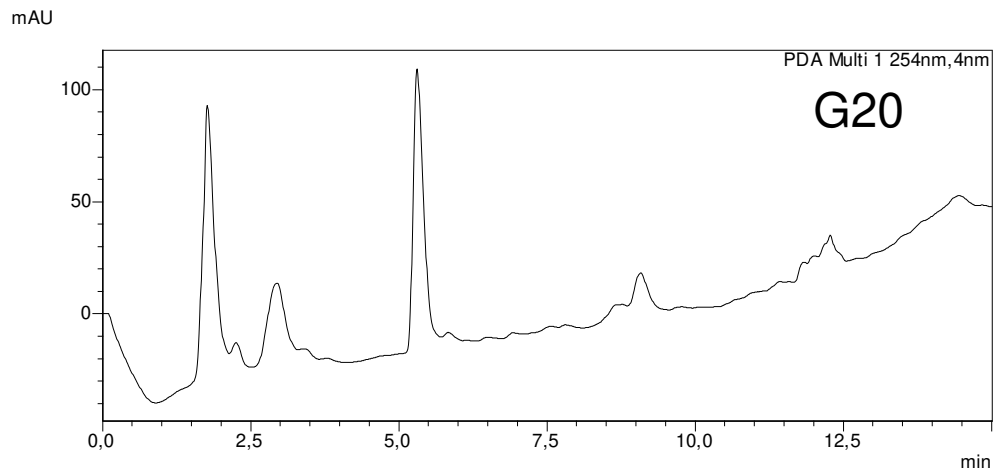
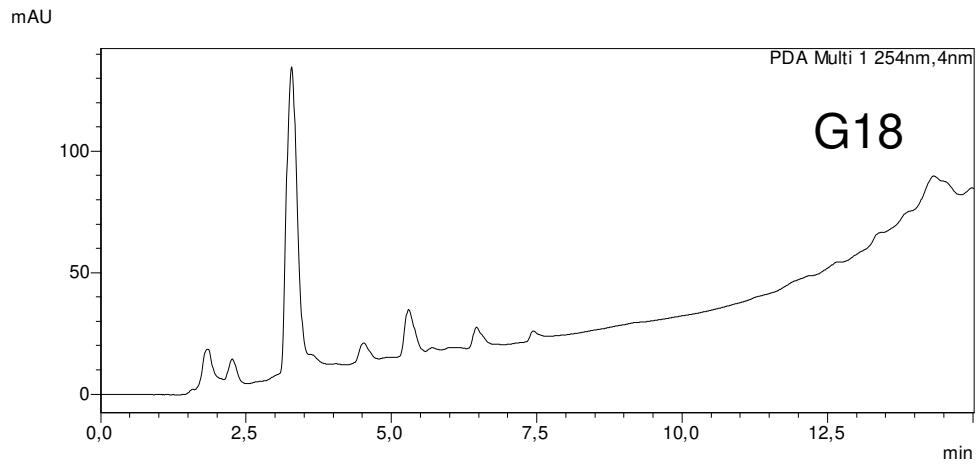
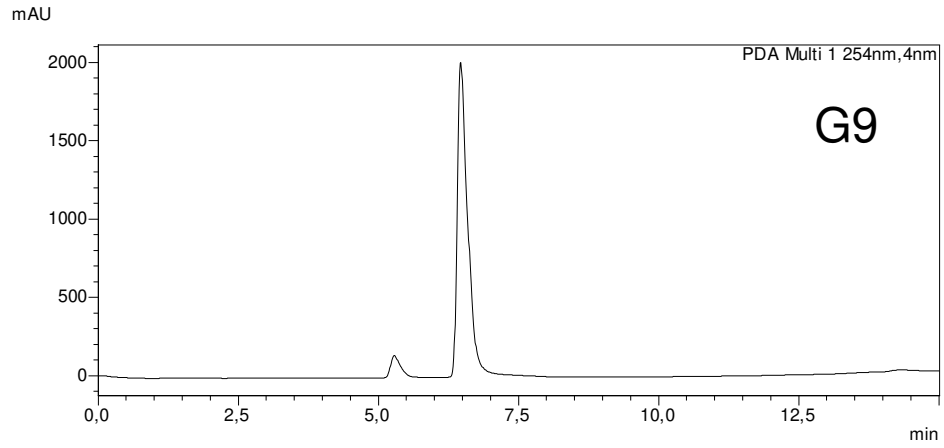
Dessa forma, foi possível identificar a presença de psoraleno em G5, e psoraleno e bergapteno em G6, G7, G8 e G9 sendo G7o grupo que apresentou perfil químico bastante semelhante ao extrato do galho e, em G8 e G9, bergapteno foi predominante. Comparando os dados obtidos por UHPLC-ESI-MS/MS e HPLC-DAD no presente trabalho com os obtidos por PETRUCCELLI, IERE e BONETTI, 2018, foi possível identificar concordância entre eles.

Os grupos G18 e G20, quando analisados por CCD, mostraram serem constituídos por cumarinas pelo fato de terem aparecido manchas referentes à elas em CCD em 254 e 365 nm (revelados com KOH 5%). Eles foram analisados em HPLC/DAD (**Figura 21**) e forneceram os seguintes tempos de retenção dos picos majoritários: G18  $t_R$  3,3 minutos; G20  $t_R$  1,79 minutos e 5,33 minutos. Porém, mais estudos precisam ser realizados para identificação destes compostos. Os grupos não estavam completamente purificados. Porém, os cromatogramas permitiram observar que eles apresentavam maior grau de pureza, tendo ocorrido separação do pico com  $t_R$  referente ao psoraleno apenas com a etapa de cromatografia em coluna.

A coluna utilizada no HPLC foi de fase reversa C18, a qual detém propriedade apolar. Dessa forma, os compostos polares foram os primeiros a saírem e serem registrados nos cromatogramas enquanto os compostos apolares, cuja afinidade pela coluna foi muito maior, saíram no final da corrida cromatográfica. O objetivo do fracionamento cromatográfico foi obter quantidade suficiente de compostos purificados e semi-purificados para serem submetidos ao teste de atividade inseticida, de forma a poder atribuir os compostos responsáveis pela atividade do extrato.

**Figura 21 – Cromatogramas referentes aos grupos de frações selecionados para análise em HPLC/DAD – G5, G6, G7, G8, G9, G18 e G20**





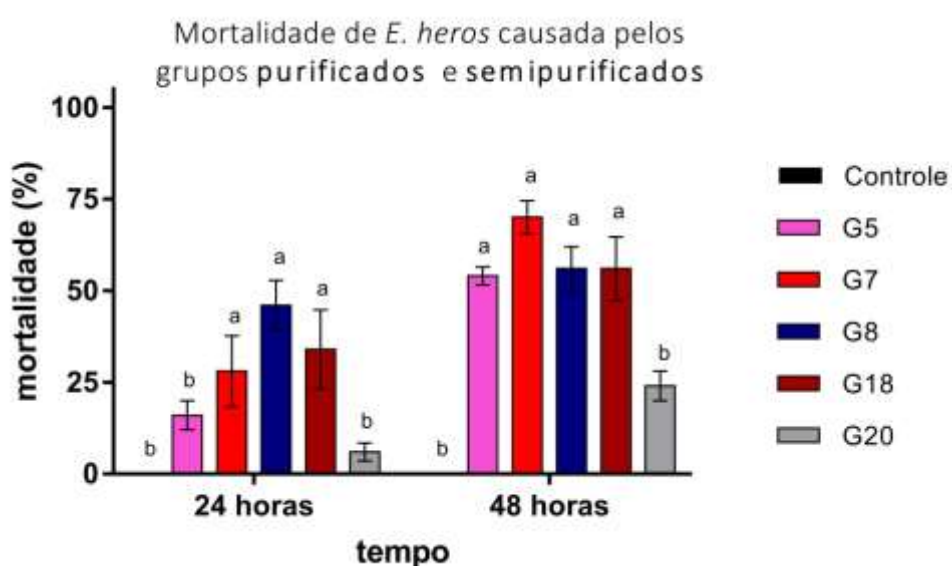
### 5.5. Avaliação da toxicidade de grupos de frações contendo cumarinas de *F. carica* em ninfas de percevejo

De forma a saber se as cumarinas presentes nos grupos de frações seriam responsáveis pela ação inseticida do extrato de galho de *F. carica*, cinco dos sete grupos monitorados por HPLC-DAD foram escolhidos para esta etapa da atividade biológica em ninfas de *E. heros* no terceiro instar.

O G5 foi escolhido por possuir apenas a cumarina psoraleno, com o maior grau de pureza. G7 foi escolhido por apresentar perfil químico bastante semelhante ao extrato FCG tendo as duas cumarinas presentes. G8 foi escolhido por ter o pico referente ao bergapteno predominante e ter massa suficiente para realização do teste nos percevejos já que G9 não tinha massa suficiente. Os grupos G18 e G20 também foram selecionados por conta de terem apresentado manchas referentes à cumarinas em CCD.

As ninfas de *E. heros* foram expostas por contato à soluções contendo os grupos, a concentração utilizada foi correspondente à  $CL_{50}$  do extrato, 5,9 mg/mL e o seguinte foi observado. Em 48 horas de avaliação, G5, G7, G8, G18 e G20 apresentaram, respectivamente, 54%, 70%, 56%, 56% e 24% de mortalidade (Figura 22).

Figura 22 – Mortalidade das ninfas em terceiro instar tratadas com os grupos



Legenda: Médias seguidas por mesma letra não diferem do controle pelo teste de Dunnett e pela análise de variância ANOVA a 5% de significância.

Como já foi dito, o extrato é uma matriz complexa de compostos químicos e 5,9 mg/mL foi capaz de matar 50% das ninfas de percevejos. Os grupos testados na  $CL_{50}$  do extrato apresentam-se bem mais puros que FCG e, com exceção de G20, foram capazes de matar mais de 50% dos insetos. Por sua vez, o grupo G7, que contém uma mistura de psoraleno e bergapteno, foi responsável pela maior mortalidade dos insetos, mostrando que, possivelmente, a atividade inseticida do extrato FCG pode estar associada à ação das duas furanocumarinas psoraleno e o bergapteno.

O interesse em efeitos sinérgicos entre substâncias químicas isoladas de extratos vegetais para aplicações terapêuticas cresceu nos últimos anos de maneira que combinação de compostos com essa capacidade pode aumentar a biodisponibilidade das substâncias ativas ou diminuir as doses em que são aplicadas (CASANOVA e COSTA, 2017). Há interação sinérgica quando o efeito produzido por pela combinação de substâncias é superior à ação individual dos componentes (WAGNER e MERZENICH, 2009; CASANOVA e COSTA, 2017).

A erva-de-são-joão, *Hipericum perforatum* L., é uma espécie medicinal amplamente utilizada como fitoterápico para o tratamento de depressão e tem sido foco de diversos estudos de sinergia entre os componentes químicos. Foi evidenciado, por meio de experimentos *in vivo*, que substâncias pertencentes à diferentes classes químicas tornam-se responsáveis pela atividade antidepressiva dessa espécie vegetal, com destaque para naftodiantrona hypericina e flavonoides hyperosídeo como isoquecitrina e miquelianina (NAHRSTED e BUTTERWECK, 2010).

Efeito sinérgico relevante também já foi observado entre artemisinina (lactona sesquiterpênica e principal componente de tratamento contra malária) e outros componentes químicos da espécie medicinal *Artemisia annua*. Estudos mostraram que os extratos da planta foram mais efetivos do que o emprego da substância isolada e foi proposto que os flavonoides metoxilados atuavam sinergicamente, potencializando a ação da artemisinina (RASOANAIVO et al, 2011).

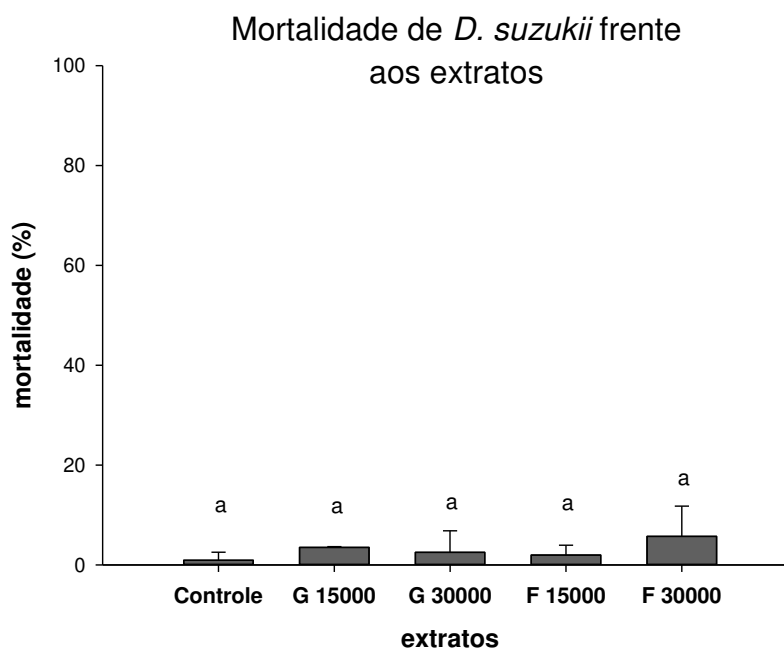
*Ginkgo biloba*, espécie de árvore milenar, tem o uso na fitoterapia amplamente aceito para o tratamento de hipertensão, doenças cardiovasculares e Alzheimer. Suas plantas contêm uma ampla variedade de flavonoides (livres e glicosilados), lactonas terpênica, ácidos fenólicos e proantocianidinas. Os

flavonoides e as lactonas terpênicas são considerados os principais componentes bioativos que proporcionam o efeito benéfico na planta, sendo observado efeito sinérgico entre esses compostos químicos (BEEK e MONTORO, 2009; LIU et al, 2009; WANG et al, 2019).

#### **5.6. Avaliação da toxicidade dos extratos vegetais frente à mosca *Drosophila suzukii***

Com o objetivo de determinar a seletividade dos extratos de *F. carica*, ou seja, saber se os extratos foram tóxicos para outros alvos e não apenas o nematoide *M. javanica* e percevejo *E. heros*, a ação inseticida dos extratos de *F. carica* foi estudada em *Drosophila suzukii*. Foram testadas as concentrações de 3,0% e 1,5% (30.000 e 15.000 ppm) dos extratos de galho e folha dessa espécie vegetal. O extrato de galho, em 15.000 ppm, implicou em 3,5% de mortalidade enquanto o extrato da folha resultou em mortalidade de 2,0%. Em 30.000 ppm, a mortalidade observada para esses insetos foi de 2,5% para o extrato de galho e 5,7% para o extrato de folha. Os resultados obtidos mostram que os extratos não apresentaram atividade inseticida (**Figura 23**) em relação à mosca *Drosophila suzukii*.

**Figura 23 - Mortalidade de *Drosophila suzukii* tratadas com extratos de *Ficus carica***



Legenda: G = extrato de galho; F = extrato de folha; 15000 = concentração de 15000 ppm ou 1,5%; 30000 = concentração de 30000 ppm ou 3,0%. As médias não diferem entre si pela análise de variância ANOVA ( $P \leq 0.05$ ). Controle: solução de água açucarada contendo Tween 20 e DMSO em 1,25%v(m/v).

*Drosophila suzukii*, pertencente ao grupo *Melanogaster* e popularmente conhecida como mosca da asa branca, é o inseto-praga de fruteiras com uma ampla gama de hospedeiros, vivendo principalmente em frutas vermelhas como o morango, cereja e framboesa (CHABERT et al, 2012). Esta espécie foi incluída na Organização Europeia de Proteção de Plantas e difere da maioria das espécies de drosofilídeos, que infestam apenas frutas maduras, caídas e podres (STACCONI et al, 2013).

O forte impacto negativo desses insetos em plantio de fruta se dá pela alta taxa de reprodução e rápido desenvolvimento, o que implica em grande população (WALSH et al, 2011). Os danos são causados pelas larvas que se alimentam dos frutos e dão oportunidade para infecções fúngica e bacterianas prosseguirem com a deterioração, implicando em perdas significativas para a cultura e economia associada (CHABERT et al, 2012). Existem poucas estratégias de controle químico e semioquímico para essa espécie. O controle biológico por meio do uso de inimigos naturais é o método mais utilizado para contribuir com diminuição da população

(BROWN et al, 2011; HAMBY et al, 2012; STACCONI et al, 2013). *Leptopilina heterotona* (Thonson), *Leptopilina boulard*, *Pachycrepoideus vindeiae* (Rondani) e *Trichopria drosophila* (Perkins) são capazes de parasitar esta espécie (CHABERT et al, 2012; STACCONI et al, 2013)

Ainda não existem relatos na literatura científica da espécie *F. carica* (L.) em relação à mosca *D. suzukii* na literatura, fazendo com que o presente trabalho mostre que os extratos de folha e galho dessa espécie não são tóxicos para a mosca da asa branca, não apresentando, dessa forma, atividade inseticida contra este inseto. Porém, outra espécie do gênero *Ficus*, *F. sarmentosa*, teve atividade inseticida dos extratos aquoso, de éter de petróleo, clorofórmio e acetato de etila de folha testada contra adultos de *Muscas domestica*, conhecida como mosca doméstica (WANG et al, 2011). A mosca doméstica é muito bem adaptada ao ambiente e capazes de transmitir uma enfermidade de patógenos aos humanos e demais animais (SILVA, 2019).

WANG et al, 2011 observaram que extratos de folha em clorofórmio e acetato de etila de *F. sarmentosa* foram os mais ativos implicando em mortalidade 92,6 e 88,9% após 24 horas de tratamento, respectivamente. Quatro compostos foram isolados e identificados dessas frações por LC-MS/MS e RMN: 7-hidroxycumarina, apigenina, eriodictol e quercetina e desempenharam forte mortalidade contra adultos de *M. domestica* e quarto instar de *Aedes albopictus*. A atividade inseticida de 7-hidroxycumarina foi a mais potente com  $CL_{50} = 72,13 \mu\text{g/g}$  contra *M. domestica* e  $4,87 \mu\text{g/mL}$  conta *A. albopictus*. A citotoxicidade dos compostos em células BTI-Tn-5B1-4 foi analisada de forma que a quercetina mostrou superior atividade de inibição celular pelo ensaio de MTT, mas ainda inferior que o controle positivo azadiractina. Os autores concluem que alguns compostos de *F. sarmentosa* tem potencial para ser empregado como inseticida botânico.

## **5.7. Avaliação da segurança dos extratos em insetos benéficos**

### **5.7.1. Avaliação da segurança dos extratos em relação às abelhas**

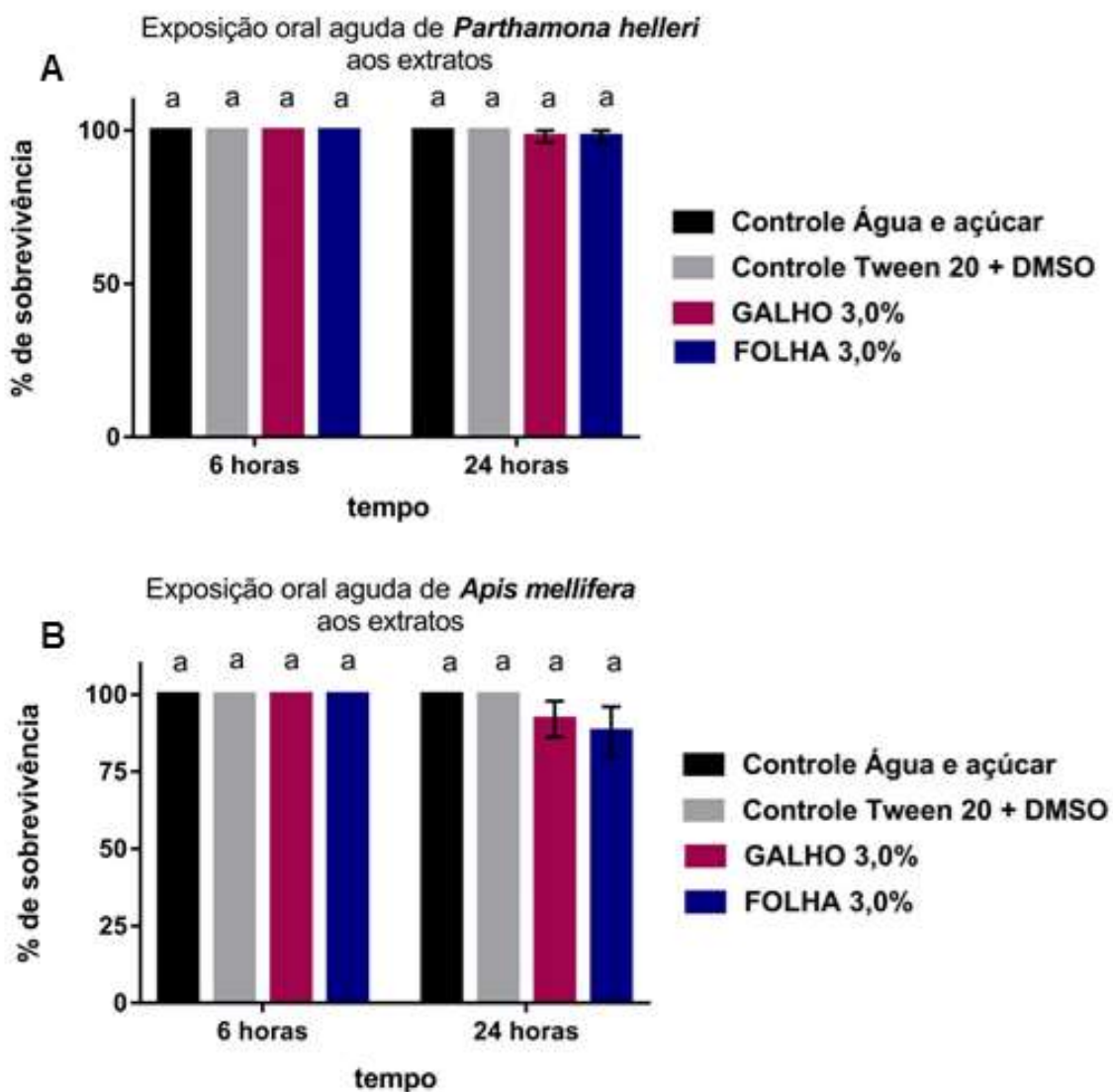
Os extratos vegetais de folha e galho de *F. carica* tiveram sua segurança estudada em relação a duas espécies de abelhas *Apis mellifera* e *Parthamona*

*helleri*. A concentração dos extratos testada nesses insetos foi de 3,0% (ou 30.000 ppm), uma vez que foi a concentração mais alta testada anteriormente neste trabalho.

O tempo total referente a este experimento foi de 24 horas e ele foi dividido em duas etapas. Nas primeiras seis horas (primeira etapa) a dieta das abelhas consistiu nas soluções controles (água açucarada; água açucarada + 0,1% de Tween 20 e 1,25% de DMSO) e nas soluções aquosas tratadas com os extratos de galhos e folhas. Após esse período, a mortalidade foi quantificada e a dieta foi trocada por uma exclusivamente a base de solução água com açúcar e dada aos insetos por mais 18 horas (segunda etapa), totalizando 24 horas de ensaio. Todos os microtubos foram pesados no início e no final de cada etapa de avaliação para observar o consumo, saber se as abelhas realmente ingeriram extrato e possibilitar que os resultados fossem conclusivos.

O consumo de alimentos nos microtubos tratados com os extratos foi comparado com o consumo dos microtubos controles (**Tabela 5**) e foi observado que os insetos se alimentaram da solução que continha os extratos. Com 6 horas de experimento, nenhuma das espécies de abelhas apresentou mortalidade. No fim das 24 horas de avaliação, as abelhas da espécie *A. mellifera* tratadas inicialmente com o extrato de galho apresentaram 92% de sobrevivência enquanto as tratadas com a folha apresentaram 88% de sobrevivência. Para a espécie *P. helleri*, a sobrevivência foi de 98% para ambos os tratamentos com extrato. Conclui-se, portanto, que os extratos mostraram-se seguros para ambas as espécies (**Figura 24**).

Figura 24 – Sobrevivência de *Parthamona helleri* e *Apis mellifera* tratadas com extratos de *F. carica*



Legenda: A) Espécie estudada *Parthamona helleri*. B) Espécie estudada *Apis mellifera*. As médias não diferem entre si pela análise de variância ANOVA ( $P \leq 0.05$ ). O controle em preto é uma solução água com açúcar e o controle em cinza é água açucarada contendo Tween 20 e DMSO solubilizados em 0,1% e 1,25%, respectivamente, do volume final de solução.

**Tabela 5 - Consumo de alimento pelas abelhas em gramas.** C1: controle solução água açucarada; C2: Controle água açucarada + Tween 20 + DMSO; GALHO: solução aquosa açucarada contendo extrato de galho de *F. carica* a 3,0%; FOLHA: solução aquosa açucarada contendo extrato de folha de *F. carica* a 3,0%.

Tratamento	<i>Parthamona helleri</i>		<i>Apis mellifera</i>	
	6 horas	18 horas	6 horas	18 horas
C1	0,137 g	0,110 g	0,351 g	0,310 g
C2	0,119 g	0,142 g	0,321 g	0,303 g
GALHO	0,089 g	0,157 g	0,255 g	0,264 g
FOLHA	0,080 g	0,163 g	0,236 g	0,234 g

As abelhas são agentes polinizadores de vital importância para as plantações, em especial em regiões tropicais. No entanto, estudos têm mostrado o declínio nas populações desses insetos decorrentes, sobretudo, da aplicação abusiva de agroquímicos (LIMA et al, 2016, TOMÉ et al, 2017, BOTINA et al, 2019). Agroquímicos considerados seguros para as abelhas como os bioinseticidas, fungicidas, fertilizantes e herbicidas podem exibir toxicidade letal e apresentar efeitos deletérios para das abelhas sem ferrão *Melipona quadrifasciata* (TOMÉ et al, 2015; SEIDE et al, 2018), *Parthamona helleri* (Tomé et al, 2017) e *Apis mellifera* (Tomé et al, 2017; LOPES et al, 2018).

TOMÉ et al, 2017 analisaram a susceptibilidade de abelhas africanizadas *A. mellifera* e sem ferrão, *P. helleri* em formulações comerciais dos inseticidas deltametrina e imidacloprideo e fungicidas a base de metil-tiofanato e clorotalonil. Os resultados fornecidos pelos autores mostraram que a espécie *P. helere* foi mais sensível e susceptível aos inseticidas do que *A. mellifera*. Já os fungicidas comerciais individuais implicaram em baixa mortalidade independente da concentração estudada enquanto a combinação deles se mostrou tão tóxica para ambas as espécies quanto o inseticida imidacloprideo e mais tóxico do que deltametrina para *A. mellifera* na ordem de quatrocentas vezes. Foi mostrado o alto efeito sinérgico dos produtos na mortalidade quando as abelhas *A. mellifera* foram submetidas à mistura de imidacloprideo e fungicidas enquanto a mistura dos fungicidas com deltametrina induziu maior sinergismo em *P. helleri*, porém teve pouco efeito na mortalidade.

A traça da cera é considerada um inseto-praga bastante prejudicial cujas larvas alimentam-se da cera e do mel nas colmeias (SANAD e MOHANNY, 2015).

Estas pragas são controladas por inseticidas conhecidos por prejudicar as populações de abelhas e contaminar os produtos agrícolas produzidos por elas, conduzindo os pesquisadores na busca de novas formas de controle menos danosas para os insetos polinizadores e humanos, como os inseticidas botânicos (DAYAN, CANTRELL e DUKE, 2009, ISMAN e GRIENEISEN, 2014). Os óleos essenciais apresentam potencial para o controle dessa praga (ELBEHERY et al, 2016).

FERREIRA et al, 2017 avaliaram se a aplicação do óleo essencial de *Siparuna guianensis*, planta medicinal aromática presente no nordeste e centro-oeste brasileiro conhecida como Negramina, seria seguro para as abelhas *A. mellifera* sem comprometer o controle da traça da cera *Galleria mellonella* L. e *Achrosia grisela* F. A composição química (por CG-MS) apresentou dois constituintes principais do óleo, 79,7% de beta-miraceno e 14,6% de 2-undecaona. *Galleria mellonella* L. e *Achrosia grisela* foram susceptíveis enquanto as abelhas apresentaram-se bem mais tolerantes ao óleo de Negramina. Com relação à repelência, o óleo não teve essa atividade em relação às abelhas adultas na concentração de 0,30 µg do óleo/cm<sup>2</sup>. Já as larvas e adultos de ambos os bichos da cera estudados sofreram efeito de repelência em 0,08 µg do óleo/cm<sup>2</sup>. Os autores concluíram que, diante os resultados apresentados, o óleo essencial de Negramina apresenta potencial para substituir o uso de inseticidas sintéticos no controle da traça da cera em colônias de abelhas.

Em vista da ameaça sofrida pelos polinizadores por conta do uso inapropriado e excessivo de inseticidas que compromete a segurança ecológica desses insetos assim como a contribuição econômica fornecida pelos seus produtos (KOVÁCS-HOSTYAN et al, 2017; GARIBALDI et al, 2018; TSCHOKE et al, 2019), TSCHOEKE et al, 2019 estudaram os pesticidas: botânico a base de neem, sintético (piretroide, deltametrina) e fungicida (metil-tiofanato e clorotalonil) em plantação de melão da espécie *Cucumis melo* L. no cerrado brasileiro avaliando se eles interfeririam nas rotas de visitação das abelhas polinizadoras *Apis mellifera*, *Halictus* sp., *Plebeia* sp. em campo sendo que essa visitação também estava associada a parâmetros como frutos disponíveis e rendimento deles.

Os pesticidas afetaram as abelhas de maneira diferente. A abelha *Plebeia* sp. não foi afetada por nenhum pesticida enquanto *A. mellifera* e *Halictus* sp.

reduziram bastante a visitação após aplicação de deltametrina e inseticidas a base de neem. Os fungicidas sozinhos não exerceram influência. Foi observado que os campos tratados com deltametrina produziram frutos mais leves e o rendimento dos melões foi menor em campos tratados com inseticidas a base de neem. Os autores concluíram em sua descoberta que os pesticidas botânicos também podem ser arriscados de forma devem ser submetidos às mesmas avaliações de risco que os produtos sintéticos.

Os extratos vegetais de *F. carica* avaliados no presente trabalho mostraram-se seguros para *A. mellifera* e *P. helleri* sem comprometer o controle do percevejo-marrom-da-soja.

### 5.7.2. Avaliação da segurança dos extratos em relação às joaninhas

Os extratos vegetais de folha e galho de *F. carica* foram estudados em relação a duas espécies de joaninha, *Coleomegilla maculata* e *Eriopis connexa*, para se avaliar a segurança. A concentração dos extratos testada nesses insetos foi de 3,0% (ou 30000 ppm) e a metodologia foi de exposição por contato. Os extratos mostraram-se seguros para ambas as espécies (**Tabela 6**).

**Tabela 6 - Mortalidade de joaninhas tratadas com extratos de *F. carica*.** Todos os extratos foram utilizados na concentração de 3,0% (30000 ppm). Os dados não diferem entre si pela análise de variância ANOVA ( $P \leq 0.05$ ) a tabela traz informações da média e desvio padrão. O controle contém água destilada e Tween 20 e DMSO solubilizados em 1,25% do volume final de solução.

<b>Joaninha - Contato (3,0%) - 24 horas</b>			
<i>Coleomegilla maculata</i>		<i>Eriopis connexa</i>	
<b>Tratamento</b>	<b>Mortalidade (%)</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Mortalidade (%)</b>
Controle	0,00 ± 0,00	Controle	0,00 ± 0,00
FCG	0,00 ± 0,00	FCG	0,00 ± 0,00
FCF	0,00 ± 0,00	FCF	0,00 ± 0,00

### 5.7.3. Avaliação da segurança dos extratos em relação aos crisopídeos

Os extratos vegetais de folha e galho de *F. carica* foram avaliados em relação ao crisopídeo *Chrysoperla externa*. A concentração dos extratos testada

nesses insetos foi de 3,0% (ou 30.000 ppm). Os extratos também se mostraram seguros esta espécie (**Tabela 7**).

**Tabela 7 - Mortalidade de crisopídeo tratados com extratos de *Ficus carica*.** Todos os extratos foram utilizados na concentração de 3,0% (30.000 ppm). Os dados não diferem entre si pela análise de variância ANOVA ( $P \leq 0.05$ ) e a tabela traz informações da média e desvio padrão. O controle contém água destilada e Tween 20 e DMSO solubilizados em 1,25% do volume final de solução.

<b><i>Chrysoperla externa</i></b>		
<b>Contato (3,0%) - 12 e 24 horas</b>		
<b>Tratamento</b>	<b>Mortalidade (%) 12 horas</b>	<b>Mortalidade (%) 24 horas</b>
Controle	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
FCG	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
FCF	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

*Eriopis connexa* Germar (Coleoptera: Coccinellidae), *Coleomegilla maculata* DeGeer (Coleoptera: Coccinellidae) e *Chrysoperla externa* Hagen (Neuroptera: Chrysopidae) são três predadores benéficos neotropicais considerados como agentes em potencial do controle biológico de diferentes pragas agrícolas, estão associados a vários ecossistemas e alimentam-se dos corpos moles de alvos agrícolas como pulgões, moscas-brancas e ácaros (RIMOLDI, SCHNEIDER e RONCO, 2009; HARAMBOURE et al, 2010; RIMOLDI et al, 2017; CASTILHOS, GRUTZMACHER e COATS, 2018). Uma das presas mais comuns para as joaninhas é o pulgão *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). Ele é uma praga de importância econômica sendo capaz de transmitir mais de cem vírus vegetais distintos (RIDDICK, 2017; TOLEDO et al, 2019).

A alta toxicidade de alguns inseticidas convencionais tem implicado em efeitos adversos em organismos não alvos como peixes, anfíbios, microcrustáceos, plantas vasculares e inimigos naturais da agricultura, entre eles predadores e parasitoides (RONCO et al, 2008, SCHNEIDER et al, 2009, FOGEL et al, 2016).

RIMOLDI et al, 2017 avaliaram a toxicidade de dois inseticidas em ovos de *C. externa* e *E. connexa* expostos às doses máximas recomendadas para cada produto. Foram feitas três diluições 50%, 25% e 12,5% e as concentrações estudadas foram 75, 37,6, 18,7 e mg/L de piriproxifem e 200, 100, 50 e 25 mg/L de

acetamiprido. O piriproxifem é um análogo do hormônio juvenil nos insetos e causa supressão da embriogênese, da metamorfose e má formação de adultos (GHANIM e ISHAYA, 2010; SULLIVAN e GOH, 2008). O acetamiprido é um inseticida neonicotinoide e afeta o sistema nervoso dos insetos levando a paralisia e morte (TOMIZZAWA e CASIDA, 2005).

A sobrevivência de *E. connexa* foi reduzida em todas as concentrações testadas de ambos os inseticidas enquanto *C. externa* sofreu significativa queda na sobrevivência em dose igual ou maior que 50 mg/mL e 37,6 mg/mL de acetamiprido e piroproxifem respectivamente. Foi observado prolongamento dos períodos de ovo e primeiro instar de ambas as espécies estudadas quando tratadas com os inseticidas. O acetamiprido foi mais tóxico para as joaninhas do que para os crisopídeos nas duas concentrações mais altas. Este trabalho mostrou a necessidade de avaliação dos efeitos toxicológicos dos inseticidas agrícolas em inimigos naturais uma vez que a joaninha e crisopídeo estudados sofreram efeitos negativos quando tratadas com os inseticidas (RIMOLDI et al, 2019).

Plantas aromáticas são fontes alternativas de inseticidas naturais frente aos sintéticos convencionais (REGNAULT-ROGER, 2012; PAVELA e BENELLI, 2016). Entre as plantas que produzem óleos essenciais, a *Siparuna guianensis* Aublet detém atividade inseticida contra diferentes insetos-pragas que afetam relevantes cultivos agrícolas e mostrou-se segura quando teve seu efeito estudado em abelhas (FERREIRA et al, 2017; LOURENÇO et al, 2018).

TOLEDO et al, 2019 avaliaram o efeito do óleo essencial de Negramina, *Siparuna guianensis*, no pulgão *Myzus persiae* e em dois inimigos naturais: *Coleomegilla maculata* (DeGeer) and *Eriopis connexa* (Germar). Os constituintes majoritários desse óleo são beta-miraceno e 2-undocanona como mostrado por FERREIRA et al, 2017. O óleo essencial em estudo apresentou atividade inseticida e de repelência em relação ao pulgão em respectivas concentrações de  $LC_{95} = 1,08$  mg/cm<sup>2</sup> e abaixo de 0,14 mg/cm<sup>2</sup>; não afetou a predação de *C. maculata* enquanto *E. connexa* teve sua habilidade em predação de *M. persiae* potencializada. Os autores procederam análises de docking computacional de forma a prever as interações físicas entre os dois componentes majoritários do óleo essencial. O trabalho reforçou o potencial uso do óleo de *S. guianensis* como ferramenta de controle no manejo

integrado de pragas, fornecendo fundamentos fisiológicos para sua potencial atividade inseticida.

HARAMBOURE et al, 2010 avaliaram o efeito colateral do extrato de *Melia azdaracth* (Meliaceae) em ovos, larvas e adultos de *Eriopsis connexa*. Esta planta apresenta estruturas e atividade inseticida similar à da azadiractina. A exposição se deu por imersão dos ovos na solução contendo o extrato e, em indivíduos adultos, foi realizada ingestão. Os autores não observaram danos nos organismos tratados por nenhuma das vias de exposição e em nenhum estágio do desenvolvimento de forma que o extrato de fruto de *M. azdaracth* é seguro para essa joaninha caso esteja presente no controle de pragas.

CASTILHOS, GRUSTZMACHER e COATS avaliaram a ação de sete terpenoides e três óleos essenciais (com ação inseticida reconhecida) no predador *Chrysoperla externa*. Os compostos testados foram timol e carvacrol (monoterpenos fenólicos), citral (aldeído), (R)-(+)- limoneno e (R)-(-)- limoneno (hidrocarbonetos), alfa-*thujone* e sesquiterpenoide (cetonas), óleo de *Amyris* (*Amyris balsamifera* Linnaeus, Rutaceae), óleo de oregano (*Origanum vulgare* Linnaeus, Lamiaceae) e óleo de *thyme* (*Thymus vulgaris* Linnaeus, Lamiaceae). A toxicidade aguda e efeitos subletais foram avaliados e os autores concluíram que os compostos foram seguros para o crisopídeo, de forma que esses compostos têm potencial para serem utilizados como inseticidas naturais.

No presente trabalho, os extratos de *F. carica* mostraram-se tóxicos para o percevejo *E. heros* em terceiro instar, mas seguros frente a insetos benéficos estudados, de forma que defensivos agrícolas desenvolvidos à base de extrato de *F. carica* indicam potencial eficácia no controle do percevejo-marrom-da-soja e reduzida toxicidade frente a insetos benéficos, condições estas importantes para a validação do produto.

## **5.8. Efeito fitotóxico do extrato de galho de *F. carica***

### **5.8.1. Avaliação de Fitotoxicidade de FCG em tomateiro**

Como relatado anteriormente, estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa, mostrou um potencial efeito nematicida *in vitro* dos extratos FCG e FCF. Entretanto, uma etapa fundamental que precede a realização da atividade

nematicida em campo é a avaliação da ação fitotóxica dos extratos sobre o vegetal em que ele será aplicado. Dessa maneira, foram realizados ensaios em casa de vegetação para avaliar se há fitotoxicidade dos extratos de galho de *F. carica* sobre mudas de tomateiro Sant Cruz.

Foram utilizadas soluções aquosas nas concentrações finais em solo de 500, 1.500, 2.500 e 3.500 ppm de FCG. Essas concentrações foram selecionadas devido ao fato de, *in vitro*, o extrato de galho ter apresentado mortalidade de 98% sobre o nematoide *M. javanica* na concentração de 1.500 ppm (ALVES et al, 2020). Logo, foram eleitas concentrações inferiores e superiores a esta para realização de testes preliminares de forma a verificar a concentração máxima que a planta suporta sem que ocorra fitotoxidez. Também pretendeu-se observar se na concentração que apresentou potente atividade nematicida *in vitro*, não haveria toxicidade para o tomateiro, cultura em que o possível nematicida botânico seria aplicado por conta de essa cultura ser acometida pelo alvo agrícola nematoide *M. javanica*, sofrendo fortes perdas econômicas.

É importante salientar que as concentrações finais foram calculadas e ajustadas para o volume final de solo utilizado nos experimentos. Trata-se de um experimento *in vivo* e as concentrações devem ser pensadas e condizentes da forma como seria aplicada no solo caso fosse um produto final.

As soluções contendo o extrato FCG foram aplicadas no solo duas semanas antes, uma semana antes, no dia do transplântio (**Figura 25**) e uma semana após o transplântio (**Figura 26**) sendo que para que esse transplântio ocorresse, era necessário que a muda de tomate tivesse, no mínimo, um par de folhas definitivas. Foi possível observar que para todas as formas de aplicação e em todas as concentrações utilizadas, os extratos mostram-se fitotóxicos para tomateiro.

No primeiro experimento, durante o transplântio, as mudas apresentaram sintomas de estresse uma vez que estavam ainda pequenas. Para tentar contornar tal problema, realizou-se a aplicação dos extratos uma semana após o transplântio, depois da recuperação das mudas.

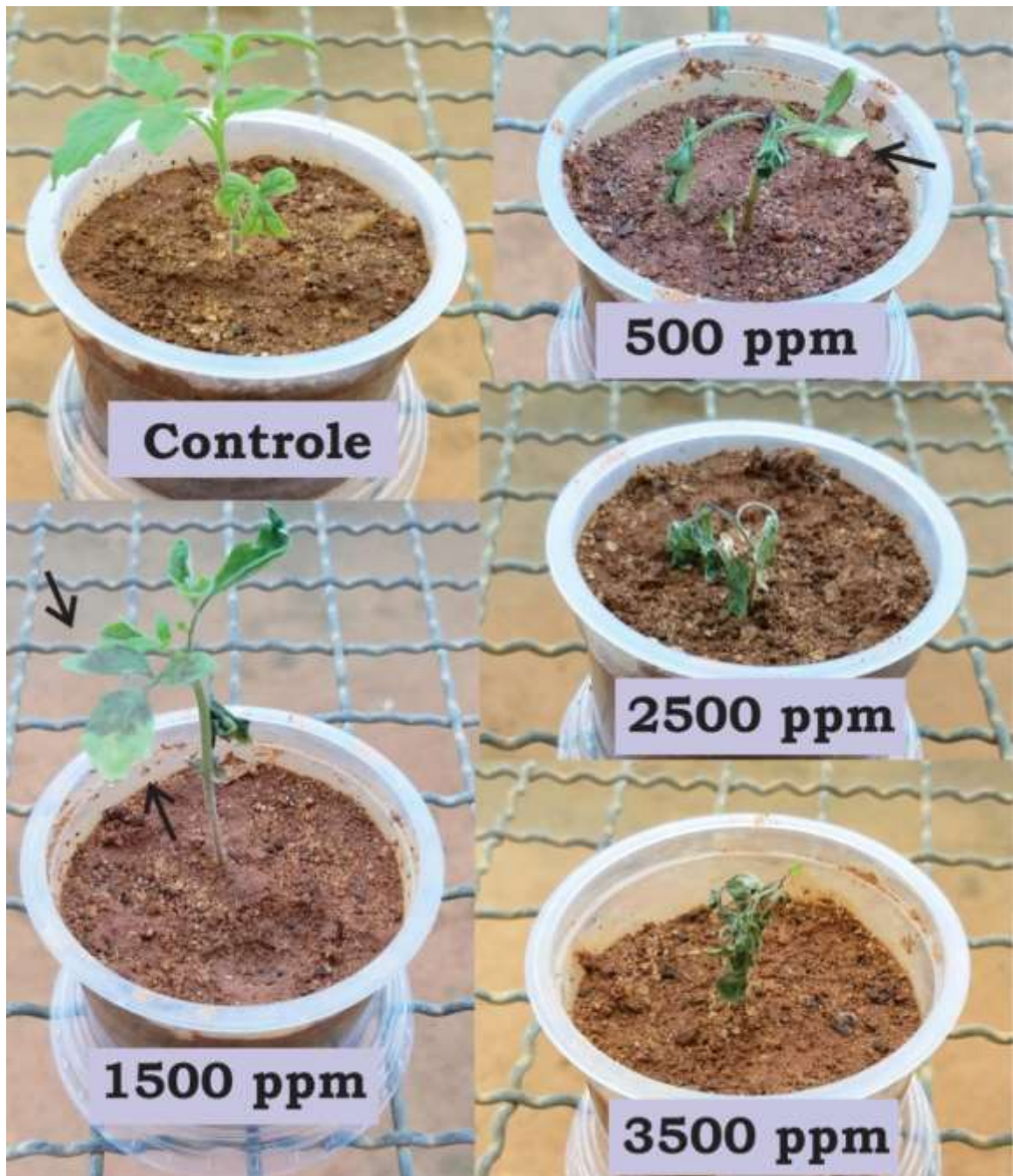
Figura 25 – Fitotoxicidade do extrato de galho de *F. carica* sobre mudas de tomateiro



Legenda: A) Extratos aplicados 14 dias antes do transplante; B) Extratos aplicados 7 dias antes do transplante; C) Extratos aplicados no dia do transplante. As concentrações finais em solo são dadas em ppm. C1 = controle contendo apenas água; C2 = controle contendo DMSO e Tween 20 (1,25%). As fotos foram tomadas 3 dias após o transplante.

Embora a murcha da parte aérea não tenha sido instantânea, sintomas de necrose e clorose na parte aérea foram observados e após o quarto dia as plantas começaram a murchar (**Figura 26**).

Figura 26 – Fitotoxicidade dos extratos de galho de *F. carica* aplicados uma semana após o transplante em mudas de tomateiro



Legenda: O controle apresentado continha DMSO e Tween 20 (1,25%). As setas indicam a ocorrência de necrose e clorose foliar. As fotos foram tomadas 4 dias após a aplicação dos extratos.

Apesar disso, não foram observados nenhum dano visível ao sistema radicular (**Figura 27**) o qual esteve diretamente em contato com os extratos. Os detergentes Tween 20 e DMSO não interferiram nas plantas.

**Figura 27 - Plantas de tomateiro tratadas com extrato de galho de *F. carica* aplicados uma semana após o transplantio**



Legenda: A) Planta tratada com a solução controle contendo DMSO e Tween 20 (1,25%); B) Planta tratada com solução final em solo de 500 ppm; C) Planta tratada com solução final em solo de 1.500 ppm; D) Planta tratada com solução final em solo de 2.500 ppm; E) Planta tratada com solução final em solo de 3.500 ppm.

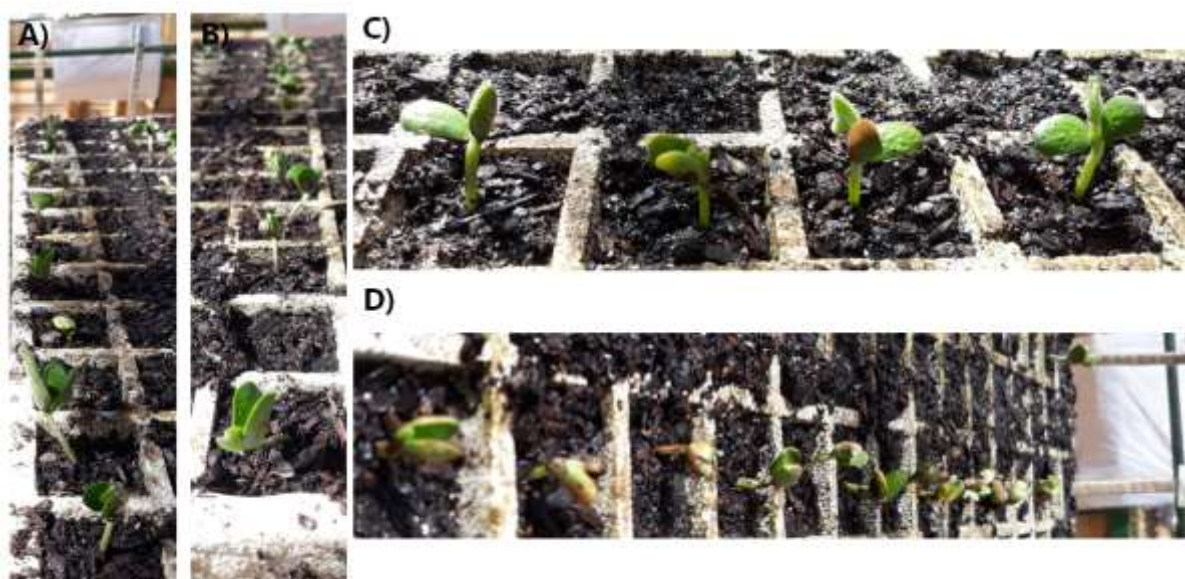
### **5.8.2. Avaliação da fitotoxidez de FCG em germinação e desenvolvimento de plântulas de soja – teste de semente**

Devido ao fato do extrato FCG ter resultado em fitotoxidez em tomateiro, sementes de soja foram tratadas com a mesma solução aquosa contendo o extrato de galho para observar quais seriam os impactos durante a germinação, no desenvolvimento da plântula e se seria possível sua utilização como nematicida natural para esta cultura, uma vez que a soja também é acometida pelos nematoides das galhas *M. javanica*.

As sementes de soja foram tratadas com duas concentrações finais em solo distintas de FCG, 1.500 e 3.000 ppm, além dos controles (testemunhas) água e água + Tween 20 + DMSO. Houve 100% de germinação para todos os tratamentos e testemunhas testados. Nos primeiros oito dias de avaliação do experimento, todas as parcelas experimentais tratadas com extrato vegetal apresentam desenvolvimento semelhante às mudas testemunhas (controles). No fim dos quatorze dias de observação, foi possível concluir que as sementes tratadas na maior concentração não desenvolveram em comparação com as demais amostras.

Já as sementes tratadas com a concentração final em solo de extrato de 1.500 ppm apresentaram desenvolvimento semelhante às testemunhas (controles) (**Figura 28**). Os detergentes empregados para auxiliar a solubilização dos extratos não interferiram no processo. O extrato etanólico de galho de *F. carica*, na concentração de 1.500 ppm (concentração estudada *in vitro* e que forneceu potente atividade nematicida), devidamente ajustada para o volume de solo, pode prosseguir nos estudos em busca de um possível nematicida natural de aplicação direta no solo para combater o nematoide *M. javanica* que tanto acarreta em prejuízos econômicos para a cultura da soja.

**Figura 28 – Teste de semente de soja tratada com extrato etanólico de galho de *F. carica***



Legenda: A) Muda tratada com controle contendo água MilliQ; B) Muda tratada com controle contendo solução de água MilliQ, DMSO e Tween 20 (1,25% m/v); C) Muda tratada com concentração final em solo de 1.500 ppm no 14<sup>o</sup> dia; D) Muda tratada com concentração final em solo de 3.000 ppm no 14<sup>o</sup> dia não desenvolveram quando comparada às testemunhas.

Os mecanismos pelos quais os extratos apresentaram esse efeito tóxico não estão claros. ALI et al, 2014 observaram que extratos metanólicos de folhas de *F. carica* inibiram tanto a germinação quanto o crescimento *in vitro* de *Lemna minor*. Esta planta é considerada planta modelo para a identificação de compostos

fitotóxicos, indicando que tais extratos de *F. carica* possuem compostos fitotóxicos e a espécie tem potencial uso para alelopatia. O efeito fitotóxico foi tão evidente, que mesmo uma concentração de 10 ppm houve inibição de 45% no crescimento das plantas. Abordar o potencial alelopático de *F. carica* é importante, uma vez em que a literatura científica levanta alguns estudos sobre o assunto.

Muitas plantas medicinais são reportadas por deterem potencial alelopático e usadas para proteger plantações contra plantas daninhas e agentes patogênicos (LADHARI et al, 2013; NASRINE, EL-DARIER e EL-TAHET, 2014). Existem poucos estudos que abordam a interação entre os compostos fenólicos em diferentes cultivares da espécie *F. carica* e o potencial alelopático (efeito inibitório ou benéfico direto ou indireto de uma planta sobre outra por meio da produção de compostos químicos liberados no ambiente) (LADHARI et al, 2020).

Tem se tornado crescente a conscientização global das questões ambientais e a possibilidade de investigação das potencialidades fornecidas pelos resíduos agrícolas (folha, galho, fruto caído) de algumas espécies da família Moraceae (GAALICHE et al, 2017). Diante da realidade de grande acúmulo de resíduos de *F. carica* em pomares e a riqueza de sua biomassa contendo substâncias ativas, essa espécie vegetal também possui potencial para ser utilizada no controle de plantas daninhas (LADHARI et al, 2020).

Nesse sentido, LADHARI et al, 2020 revelaram o potencial alelopático e mecanismo de treze cultivares de *F. carica* Tunísia em folha e fruto. A triagem dos extratos aquosos e orgânicos (éter de petróleo, acetato de etila e metanol) foi conduzida na germinação e no crescimento de mudas de quatro espécies alvos, rabanete e alface (sensíveis a maioria dos compostos aleloquímicos), e duas ervas daninhas comuns. Foi observado que todos os extratos desempenharam significativa atividade fitotóxica sendo os extratos da folha os mais tóxicos. A análise por HPLC mostrou bastante similaridade entre os cultivares. No entanto, o conteúdo de compostos fenólicos diferiu significativamente, fato que também foi observado por outros autores (PETRUCCELLI et al, 2018, GAALICHE et al, 2019).

GAALICHE et al. 2017 estudaram duas variedades de *F. carica* e observaram que extratos de folha com diferentes polaridades (éter de petróleo, acetato de etila e acetona) inibiram a germinação, o crescimento e o crescimento radicular em rabanete e alface nas concentrações de 3000 e 6000 ppm. Essa

inibição foi acompanhada da redução do índice mitótico em raízes, indicando ação citotóxica dos extratos. Os autores associaram o efeito fitotóxico aos terpenos, esteróis e ácidos graxos detectados por CG-MS. O perfil fitoquímico foi similar para ambos os cultivares com disparidade na composição dos terpenóides.

Ademais, de acordo com os resultados aqui obtidos, o FCG apresentou atividade biológica contra mudas de tomate com o primeiro par de folhas permanentes, porém essa atividade não foi observada no desenvolvimento de mudas de soja crescidas em solo contendo a concentração final em solo do extrato de 1500 ppm. Desse modo, vale ressaltar que nos sistemas de plantio de soja, não há sucessão com plantas de tomate, mas sim com plantas monocotiledôneas como o milho, por exemplo. Ou seja, a aplicação de FCG como alternativa para o controle de nematoides pode ser feita em campos de plantios de soja, porém estudos futuros de fitotoxidez com as culturas usadas na sucessão ao plantio de soja e a durabilidade da atividade do produto (FCG) no solo devem ser feitos. Este resultado não interfere na atividade inseticida encontrada contra o percevejo, uma vez que para a ação inseticida foram estudados modos de aplicação e concentrações distintos.

O experimento em mudas de tomate mostrou que o extrato aplicado no solo 14 dias antes da semeadura ainda implicou em fitotoxidez. Por essa razão, são necessários mais estudos que promovam o entendimento da durabilidade do produto no solo. Serão necessárias também pesquisas adicionais para esclarecer os mecanismos pelos quais o extrato de galho de *F. carica* no presente trabalho foi tóxico em as plantas de tomate e soja na maior concentração e avaliar suas características como pH, composição química e uso de adjuvantes para uma possível formulação a fim de contornar tais problemas.

## 6. CONCLUSÃO

Este trabalho mostrou o forte potencial inseticida *in vivo* das cumarinas psoraleno e bergapteno extraídos de *Ficus carica*. O estudo também sugeriu que ambos os compostos sejam responsáveis pelo efeito inseticida do extrato de galho em percevejos em terceiro instar. Quanto ao estudo de ecotoxicidade, os resultados demonstram que os extratos etanólicos de galho e folha de *F. carica* foram seguros para os insetos benéficos estudados, entre eles os predadores naturais (joaninhas e crisopídeos) e abelhas, polinizadores sob grande risco em função do uso em larga escala dos pesticidas sintéticos.

No estudo de fitotoxicidade, foi verificado que o extrato de galho interferiu no desenvolvimento de mudas de tomateiro em todas as concentrações finais em solo e em todas as formas de aplicação estudadas. Já ao avaliar a fitotoxicidade em soja, foi verificado que na menor concentração final em solo avaliada (1.500 ppm) não houve interferência do extrato. No entanto, observou-se interferência no desenvolvimento da muda soja quando foi testada uma concentração final em solo de 3.000 ppm de FCG. Estes resultados são importantes para complementar o trabalho de emprego de *Ficus carica* no controle de nematoides em soja, estudo este em andamento dentro do grupo BIOPROS.

Outros estudos precisam ser realizados para se obter mais informações sobre o tema, como compreensão do mecanismo de ação desses compostos nos insetos e avaliação frente a outros fitopatógenos, de forma a ampliar o espectro de ação inseticida de defensivo agrícola desenvolvido a base de extratos da espécie.

## 7. BIBLIOGRAFIA

ABDEL-ATY, A. M. et al, *Ficus carica*, *Ficus sycomorus* and *Euphorbia tirucalli* latex extracts: Phytochemical screening, antioxidant and cytotoxic properties.

**Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 20, p. 1-8, 2019

AHMAD, S. et al. A REVIEW ON THE PROSPEROUS PHYTOCHEMICAL AND PHARMACOLOGICAL EFFECTS OF *Ficus carica*. **International Journal of Bioassays**, p. 843-849, 2013

ALI, N., VISHWAKARMA, P. K., IKHAN, SOHAIB, M. *In Vitro* Antibacterial, Antifungal and Phytotoxic Activities of *Ficus Carica* Methanolic Leaves Extracts. **Int. J. Curr. Biotechnol.**, v. 2, n. 2, p. 11-15, 2014

ALVES, J.R., ASSIS, J.N., PÁDUA, C.C.A., BALBINO, H. M., Lima, L.L., GOUVEIA, A.S., VITAL, C.E., BUONICONTRO, D.S., FREITAS, L.S., LEITE, J.P.V., RAMOS, H.J.O. Phytochemical potential of *Ficus species* for the control the phytonematode *Meloidogyne javanica*. **Journal of Plant Protection Research**, v. 60, n. 2, p. 193-206, 2020

AMMAR, S. et al. New insights into the qualitative phenolic profile of *Ficus carica* L. fruits and leaves from Tunisia using ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry and their antioxidant activity.

**RSC Advances**, v. 5, p. 20035-20059, 2015

ARVANTI, O. S. et al. Review on fresh and dried figs: Chemical analysis and occurrence of phytochemical compounds, antioxidant capacity and health effects.

**Food Research International**, v. 119, p. 244-267, 2019

ALÉCIO, M. R. et al. Ação inseticida do extrato de *Derris amazonica* Killip para *Cerotoma arcuatus* Olivier (Coleoptera: Chrysomelidae). **ACTA AMZONICA**, v. 40, p. 719-728, 2010

ALMEIDA, A. A. **Bioprospecção de produtos naturais antitumorais em coleção de extratos de espécies arbóreas da Mata Atlântica**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, 2015

ABC BIO. Associação Brasileira de Controle Biológico. Controle Biológico: estratégia que agrega sustentabilidade à agricultura. São Paulo, 2019 a. Disponível em: <https://www.abcbio.org.br/blog/controle-biologico/>. Acesso em 16 de setembro de 2019

ABC BIO. Associação Brasileira de Controle Biológico. Legislação. São Paulo, 2019 b. Disponível em: <https://www.abcbio.org.br/informativos/legislacao/categoria/inc/>. Acesso em 16 de setembro de 2019

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamentação Anvisa aprova o novo marco regulatório para agrotóxicos, 2019. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset\\_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/anvisa-aprova-novo-marco-regulatorio-para-agrotoxicos/219201](http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/anvisa-aprova-novo-marco-regulatorio-para-agrotoxicos/219201). Acesso em 16 de dezembro de 2019

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Metodologias utilizadas para a realização de estudos toxicológicos e Ofício Circular nº 002/2009/GGTOX. 2009. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/451840/apresentacao\\_metodologias.pdf/afb504e2-8a37-4991-b578-2bb267c76b6d?version=1.0](http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/451840/apresentacao_metodologias.pdf/afb504e2-8a37-4991-b578-2bb267c76b6d?version=1.0). Acesso em 20 de janeiro de 2020

BADGUJAR, S. B. et al. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Ficus carica*: A review. **Pharm. Biol.**, v. 52, n. 11, p. 1487-1503, 2014

BAROLO, M. I., MOSTACERO, N. R., LÓPEZ, S. N. *Ficus carica* L. (Moraceae): An ancient source of food and health. **Food Chemistry**, v. 164, p. 119-127, 2014

BEEK, T. A., MONTORO, P. Chemical analysis and quality control of *Ginkgo biloba* flavanol glycosides leaves, extracts and phytopharmaceutical. **J. Chromatograf**, v. 11, p. 1216, 2009

BENELLI, G. et al. Neen (*Azadirachta indica*): towards the ideal insecticide? **Natural Product Research**, v. 31, n. 4, p.369-396, 2017

BIOTOX AMBIENTAL. Ensaio de Ecotoxicidade, 2019. Disponível em: <http://www.biotoxambiental.com.br/ensaios-de-ecotoxicidade/>. Acesso em: 11 de dezembro de 2019

BOHMONT, B. L. The standard pesticide user's guide. **Upper Saddle River: Prentice-Hall**, p. 544, 2000

BOTINA, L. L. et al. Behavior and gut bacteria of *Partamona helleri* under sublethal exposure to a bioinsecticide and a leaf fertilizer. **Chemosphere**, v. 234, p. 187-195, 2019

BRASIL. **Biodiversidade Brasileira**. Ministério do Meio Ambiente. Brasília, 2019 a. Disponível em: <https://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira.html>. Acesso em 12 de dezembro de 2019

BRASIL. **Biodiversidade**. Ministério do Meio Ambiente. Brasília, 2018. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade.html>. Acesso em 12 de dezembro de 2019

BRASIL. **Agropecuária Brasileira em Números**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2019 b. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/agropecuaria-brasileira-em-numeros>. Acesso em 16 de dezembro de 2019

BRASIL. **Mercado de Biodefensivos cresce mais de 70% em um ano no Brasil.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2019 c. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/noticias/feffmercado-de-biodefensivos-cresce-em-mais-de-50-no-brasil>. Acesso em 23 de dezembro de 2019

BRASIL. **Mata Atlântica.** Ministério do Meio Ambiente, 2019 d. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biomas/mata-atlantica-emdesenvolvimento>. Acesso em 17 de janeiro de 2020

BRASIL. LEI Nº 13.123, DE 20 DE MAIO DE 2015. Dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade. **Diário Oficial da União, 20.05.15**

BRASIL. Instrução Normativa Conjunta n.03. Dispõe sobre os estudos exigidos para a avaliação toxicológica e ecotoxicológica de produtos bioquímicos, 19 de agosto de 2014

BRASIL. Instrução Normativa Conjunta SDA/ SDC/ ANVISA/IBAMA n.1. Dispõe sobre o procedimento para registro de produtos fitossanitários com uso aprovado para a agricultura orgânica, 24 de maio de 2011

BRASIL. Instrução Normativa Conjunta n. 32. Dispõe sobre os procedimentos a serem dotados para efeito de registro de produtos bioquímicos, 26 de outubro de 2005

BRASIL. Instrução Normativa Conjunta n.1. Dispõe sobre os procedimentos a serem adotados para efeito de registro de produtos semioquímicos, 23 de janeiro de 2006

BRASIL. Lei 7802, de julho de 1989. Dispõe sobre os agrotóxicos, seus componentes e afins. Diário da União, 12 de julho de 1989

BROWN, P.H., SHEARER, P.W., MILLER, J.C., THISTLEWOOD, H.M.A. The discovery and rearing of a parasitoid (Hymenoptera: Pteromalidae) associated with spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii*, in Oregon and British Columbia. ESA 59<sup>o</sup> Encontro Anual, p.13-16, 2011

CABONI, P et al. Nematicidal activity of furanocoumarins from parsley against *Meloidogyne* spp. **Pest. Mang. Sci.**, v. 71, p.1099-1005, 2015

CAMPOS, E. V. R. et al. Use of botanic insecticides for sustainable agriculture: Future perspectives. **Ecological Indicator**, v. 105, p. 483-495, 2019

CAMPOLO, M. R. et al. Citrus peel essential oil nanoformulations to control the tomato borer, *Tuta absoluta*: chemical properties and biological activity. **Sci Rep**, v. 7, p. 13036, 2017

CASANOVA, L. M., COSTA, S. S. Interações Sinérgicas em Produtos Naturais: Potencial Terapêutico e Desafios. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 2, p. 575-595, 2017

CASTILHOS, R. V., GRUTZMACHER, A. D., COATS, J. R. Acute Toxicity and Sublethal Effects of Terpenoids and Essential Oils on the Predator *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae). **Neotrop. Entomol.**, v. 47, p. 311-317, 2018

CHABERT, S. et al. Ability of European parasitoids (Hymenoptera) to control a new invasive Asiatic pest, *Drosophila suzukii*. **Biological Control**, v. 63, p. 40-47, 2012

CHUNG, I. M. et al. Immunotoxicity activity of natural furocoumarina from milky sap of *Ficus carica* against *Aedes aegypti* L. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v. 53, p. 515-518

CIVIDANES, F.J. **Determinação das exigências térmicas de *Nezara viridula* (L., 1758), *Piezodorus guildinii* (West., 1837) e *Euschistus heros* (Fabr.,1798) (Heteroptera: Pentatomidae) visando ao seu zoneamento ecológico.** Tese

(Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP, Piracicaba, 1992

CORRÊA-FERREIRA, B. S., PANIZZI, A. S., Percevejo da sola e seu manejo. Londrina, **Embrapa Soja**, 1999

DAYAN, F. E., CANTRELL, C. L., DUKE. S. O. Natural products in crops. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 4022-4034, 2009

EDENHARDER, R. et al. Inhibition of mutagenesis of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinolone (IQ) by coumarins and furanocoumarins, chromanones and furanochromanones. **Mutation Res.**, v. 345, p. 57-71, 1995

EDENHARDER, R., RAUSCHER, R. Antimutagenic effects of flavonoids, chalcones and structurally related compounds on the activity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) and other heterocyclic amine mutagens from cooked food. **Mutation Res.**, v. 287, p. 261 – 274, 1993

EMBRAPA. BIOECONOMIA – a ciência do futuro no presente. 2019. Disponível em: <http://embrapa.br/tema-bioeconomia/sobre-o-tema>. Acesso em 17 de janeiro de 2020

FACHIN, P. Amazônia 4.0. A criação de ecossistemas de inovação e o enraizamento de uma nova Bioeconomia. 2018. Disponível em: <https://www.amazoniasocioambiental.org/pt-br/radar/amazonia-4-0-a-criacao-de-ecossistemas-de-inovacao-e-o-enraizamento-de-uma-nova-bioeconomia-entrevista-especial-com-carlos-nobre/>. Acesso em 17 de janeiro de 2020

FACHIN, P., MACHADO, R. Amazônia e a Bioeconomia: um modelo de desenvolvimento para o Brasil. 2019. Disponível em: <https://amazonia.org.br/2019/05/amazonia-e-a-bioeconomia-um-modelo-de-desenvolvimento-para-o-brasil-entrevista-especial-com-carlos-nobre/>. Acesso em 17 de janeiro de 2020

FALKOWSKI, M. Towards the optimization of botanical insecticides research: *Aedes aegypti* larvicidal natural products in French Guiana. **ACTA Tropica**, v. 201, p. 1-12, 2020

FERNANDES, J. N. et al. Revamping Mosquito-borne Disease Control to Tackle Future Threats. **Trends in Parasitology**, v. 44, n. 5, p. 359-368

FERREIRA, T. P. et al. Potential use of Negramina (*Siparuna guianensis* Aubl.) essential oil to control wax moths and its selectivity in relation to honey bees. **Industrial Crops and Products**, v. 109, p.151-157, 2017

FOGEL, M. N. et al. Toxicity assessment of four insecticides with different modes of action on pupae and adults of *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae), a relevant predator of the Neotropical Region. **Environ. Sci. Pollut.**, v. 23, p. 14918-14926

GAALICHE, B. Impact of foliar potassium fertilization on biochemical composition and antioxidant activity of fig (*Ficus carica* L.). **Scientie Horticulturae**, v. 253, p. 111-119, 2019

GAALICHE, B. et al. Relationship between phytochemical profiles and phytotoxic proprieties of Tunisian fig leaf cultivars. **S. Afr. J. Bot.**, v. 112, p. 322–328, 2017

GARIBALDI, L. A. Complementarity and synergisms among ecosystem services supporting crop yield. Global. **Global Food Secur.**, v. 33, p. 719-731, 2018

GRAÇA, J. P. et al. The natural plant stress elicitor cis-jasmone causes cultivar-dependent reduction in growth of the stink bug, *Euschistus heros* and associated changes in flavonoid concentrations in soybean, *Glycine max*. **Phytochemistry**, v. 131, p. 84-91, 2016

GENTZ, M. C., MURDOCH, G., KING, G. F. Tandem use of selective insecticides and natural enemies for effective, reduced-risk pest management. **Biological Control**, v. 52, p. 208-215, 2010.

GHAMIM, M., ISHAAYA, I. Insecticides with novel modes of action: mechanism and resistance management. **Springer**, p. 385-407, 2010

GUO, Q. et al. Two nematicidal furanocoumarins from *Ficus carica* L. leaves and their physiological effects on pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). **Natural Products Research**, p. 1-6, 2015

GOTTLIEB, O. R., SILVA, M. L., MAIA, J. G. Distribution of coumarins in Amazonian *Brosium* species. **Phytochemistry**, v. 11, p. 3479-3480, 1972

GUEDES, R. et al. Insecticide-induced hormesis and arthropod pest management. **Pest Manag Sci**, p. 690-697, 2016

HAMBY, K.A., BOUNDY-MILLS, A.H., ZALOM, F.G. Associations of Yeasts with Spotted-Wing Drosophila (*Drosophila suzukii*; Diptera: Drosophilidae) in Cherries and Raspberries. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 78, n.14, p. 4869-4873, 2012

HARAMBOURE, M. et al. Compatibility of a *Melia azedarach* extract in *Eriopsis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae). **Commun Agric. Appl Biol. Sci.**, v. 75, n. 3, p. 373-378.

HARTMANN, M. et al. Distinct soil microbial diversity under long-term organic and conventional farming. **The ISME Journal – Nature**, v. 9, p.1177-1194, 2015

HARZALLAH, A. Phytochemical content and antioxidant activity of different fruit parts/juices of three figs (*Ficus carica* L.) varieties grown in Tunisia. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 255-267, 2016

HOFFMANN-CAMPO, C.B., NETO, J.A., OLIVEIRA, M.C., OLIVEIRA, L.J. Detrimental effect of rutin on *Anticarsia gemmatalis*. **Pesqui. Agropecu.**, v. 41, p. 1453-1459, 2006

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Indicadores da Pecuária crescem em relação ao trimestre anterior e ao 3º trimestre de 2018. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de->

noticias/releases/26346-indicadores-da-pecuaria-crescem-em-relacao-ao-trimestre-anterior-e-ao-3-trimestre-de-2018. Acesso em 16 de dezembro de 2019

ICMBIO Instituto Chico Mendes MMA. Catálogo de Produtos da Sociobiodiversidade do Brasil. Brasília, 2019

ISMAN, M. B. Bridging the gap: Moving botanical insecticides from the laboratory to the farm. **Industrial Crops and Products**, v. 110, p. 10-14, 2017

ISMAN, M. B., GRIENEISEN, M. L. Botanical insecticide research: many publications, limited useful data. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 3, p. 140-145, 2014

ISMAN, M. B., MIRESMAILLI, S., MACHIAL, C. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. **Phytochem. Rev.**, v. 10, p.197-204, 2011

ISMAN, M. B., Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 51, p45-66, 2006

JOLY, C. A., METZGER, J. P., TABARELLI, M. Experiences from the Brazilian Atlantic Forest: ecological findings and conservation initiatives. **New Phytologist**, v. 204, n. 3, p. 459-473, 2014

JONES, J. T. et al. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 14, n. 9, p. 946-961, 2013

JUNIO, H. A. et al. Synergy Directed Fractionation of Botanical Medicines: A Case Study with Goldenseal (*Hydrastis canadensis*). **J. Nat. Prod.**, v. 74, n. 7, p. 1621-1629, 2011

KIM, I. Screening of Some Crude Plant Extracts for their Acaricidal and Insecticidal Efficacies. **J. Asia-Pacific. Entomol.**, v. 8, n. 2, p. 93-100, 2005

KOVACS-HOSTYANSZKI, A. Ecological intensification to mitigate impacts of conventional intensive land use on pollinators and pollination. **Ecol. Lett.** v. 20, p. 673-689, 2017

LADHARI, A. et al. Allelopathic potential and phenolic allelochemicals discrepancies in *Ficus carica* L. cultivars. **S. Afr. J. Bot.**, v. 133, p. 30-44, 2020

LADHARI, A. et al. Phytotoxic activity of *Cleome arabica* L. and its principal discovered active compounds. **S. Afr. J. Bot.**, v. 88, p. 341-351, 2013

LIMA, M. A. P. Agrochemical-induced stress in stingless bees: peculiarities, underlying basis, and challenges. **J. Comp. Physiol.**, v. 202, p. 733-747, 2016

LIU, X. G. et al. Direct analysis of 18 flavonol glycosides, aglycones and terpene trilactones in *Ginkgo biloba* tablets by matrix solid phase dispersion coupled with ultra-highperformance liquid chromatography tandem triple quadrupole mass spectrometry, **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 97, p. 123–128, 2014

LIU, G.Q, DONG, J., WANG, H., HASHI, Y., CHEN, S.Z. Differentiation of four pairs of furocoumarin isomers by electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Eur. J. Spectrom.**, v.16, p. 215-220, 2010

LIU, F. et al. Nematicidal coumarin from *Ficus carica* L. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 14, p. 79-81, 2011

LOPES, M. P. et al. Spinosad-mediated effects on the walking ability, midgut, and malpighian tubules of Africanized honey bee workers. **Pest Manag. Sci.**, v. 74, p. 1311-1318, 2018

LOURENÇO, A. M. et al. Essential oil of *Siparuna guianensis* as an alternative tool for improved lepidopteran control and resistance management practices, **Sci. Rep.**, v. 8, p. 1-13, 2018

MALIK, Z. et al. Agrochemicals and Soil Microbes: Interaction for Soil Health. **Springer International Publishing**, p. 139-152, 2017

MANSO, E. C. et al. Catálogo de nematóides fitoparasitas encontrados, associados a diferentes tipos de plantas no Brasil. Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, p. 488, 1994

MAWA, S., HUSSAIN, K., JANTAN, I. *Ficus carica* L. (Moraceae): Phytochemistry, Traditional Uses and Biological Activities. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-8, 2013

MARTINS, F. S. **Estudo sistemático da ação melanogênica do extrato de *Brosimum gaudichaudii* Trécul.** Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, 2016.

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

MORAES, R. F. Agrotóxicos no Brasil: Padrões de uso, política de regulação e prevenção de captura regulatória. Brasília: Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada, 2019

MENTEN, J. O. Consumo de produtos fitossanitários no Brasil. SINDGEV. 2016. Disponível em: <<http://sindiveg.org.br/consumo-de-produtos-fitossanitarios-no-brasil/>> Acesso em: 16 de dezembro de 2019

NAHRSTED, A., BUTTERWECK, V. Lessons learned from herbal medicinal products: the example of St, John's Wort. **J. Nat. Prpd.**, v. 73, p. 1015, 2010.

NASRINE, S., EL-DARIER, S., EL-TAHER, H. M. Allelotoxicity of *Oudneya Africana* R. Br. A[queous leachate on germination efficiency of *Bromus tectorum* L. and *Triticum aestivum* L. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n.10, p. 1194-1197, 2014

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **J. Nat. Prod.**, v. 79, p. 629-661, 2016

NDAKIDEMI, B., MTEI, K., NDAKIDEMI, P. A. Impacts of synthetic and Botanical Pesticides on Beneficial Insects. **Agricultural Sciences**, v. 7, p. 364-372, 2016

NIEMEYER, K., BELL, I. R., KOITHAN, M. Traditional Knowledge of western Herbal Medicine and Complex Systems Science. **J Herb Med.**, v. 3, n. 3, p. 112-129, 2013

NOLLET, L. M., RATHORE, H. S. Orange oil. Green pesticides handbook: essential oils for pest control. **CRC Press, Ghent**, p. 291–300, 2017

PANIZZI, A. R., BUENO, A. F., SILVA, F. A. C. Insetos que atacam vagens e grãos. **Embrapa Soja**, p. 335-420, 2012

PAVELA, R., MAGGI, F., IANNARELLI, R., BENELLI, G. Plant extracts for developing mosquito larvicides: From laboratory to the field, with insights on the modes of action. **ACTA Tropica**, v. 193, p. 236-271, 2019

PAVELA, R., BENELLI, G. Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and constraints. **Trends Plant Sci.** P.1000-1007, 2016

PALMEIRA, L. et al. Nutritional, chemical and bioactive profiles of different parts of a Portuguese common fig (*Ficus carica* L.) variety. **Food Research International**, v. 126, p. 1-10. 2019

PANIZZI, A.R., BUENO, A.F., SILVA, F.A.C. Insetos que atacam vagens e grãos. In: HOFFMANN-CAMPO, C.B., CORRÊA-FERREIRA, B.S., MOSCARDI, F. (Eds.), Soja: Manejo Integrado de Insetos E Outros Artropodes-Praga. Embrapa, Brasília, p. 335-420, 2012

PETRUCCELLI, R., IERI, F., BONETTI, A. Polyphenolic profiling and chemometric analysis of leaves from Italian *Ficus carica* L. varieties. Polyphenol compounds in common fig. **J. Hortic. Sci.**, v. 83, n. 2, p. 94-103, 2018

PIMENTEL, V. P. et al. Biodiversidade brasileira como fonte da inovação farmacêutica: uma nova esperança? **Revista do BNDES**, n. 43, p. 41-89, 2015

PINTO A. S. et al. Defensivos agrícolas Naturais Uso e perspectivas. 1 ed. Brasília: Embrapa Meio Ambiente, 2016

POZETTI, G. L. *Brosimum gaudichaudii* Trecull (Moracea): da planta ao medicamento. **Ver. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 26, n. 3, p. 159-166, 2005

QUINTÃO, W. S. C. et al. Microemulsions incorporating *Brosimum gaudichaudii* extracts as a topical treatment for vitiligo: In vitro stimulation of melanocyte migration and pigmentation. **Journal of Molecular Liquids**, v. 294, p. 1-12, 2019

RALIYA, R. et al. Nanofertilizer for Precision and Sustainable Agriculture: Current State and Future Perspectives. **J. Agric. Food Chem**, v.66, p. 6487-6503, 2018

RAAFT, K., WURGLICS, M. Phytochemical analysis of *Ficus carica* L. active compounds possessing anticonvulsant activity. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 9, p. 263-270, 2019

RASOANAIVO, P. et al. Whole plant extracts versus single compound for the treatment of malaria: synergy and positive interactions. **Malaria Journal**, v. 10, 2011

REGNAULT-ROGER, C., VINCENT, C., ARNASON, J. T. The potential of botanical essential oils for insects pest control. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 57, p.405-424, 2012

RIBEIRO, I. A. T. A. et al. Chemical characterization and insecticidal effect against *Sitophilus zeamais* (maize weevil) of essential oil from *Croton rudolphianus* leaves. **Crop Protection**, v.129, p. 1-7, 2020

RIBEIRO, L. P. et al. Comparative bioactivity of selected seed extracts from Brazilian *Annona* species and an acetogenin-based commercial bioinsecticide against *Trichoplusia ni* and *Myzus persicae*. **Crop Protection**, v. 62, p. 100-106, 2014

RIDDICK, E. W. Identification of conditions for successful aphid control by ladybirds in greenhouses. **Insects**, v. 8, n. 2, p. 1-17, 2017

RIMOLDI, F. et al, Comparative susceptibility of two Neotropical predators, *Eriopis connexa* and *Chrysoperla externa*, to acetamiprid and pyriproxyfen: Short and long-term effects after egg exposure. **Environmental Pollution**, v. 231, p. 1042-1050, 2017

RIMOLDI, F, SCHINEIDER, M. I., RONCO, A.E. **Evaluacion ecotoxicologica de plaguicidas usados en el paquete tecnologico Soja RR, sobre el sistema achiplusia *Chrysoperla externa***. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Exatas, Universidade Nacional da Prata, La Plata, 2009

RONCO, A. E. et al. Integrated approach for the assessment of biotech soybean pesticides impact on low order stream ecosystems of the Pampasic Region. **Nova Science Publishers**, p. 209-239, 2008

SACCARO JUNIOR, N. L. A regulamentação de acesso a recursos genéticos e repartição de benefícios: disputas dentro e fora do Brasil. *Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada: Brasília*, 2011

SAITO, M. L., LUCCHINI, F. Plants secondary metabolites in the agricultural pest control. *Embrapa, Bragança Paulista*, v. 15, n. 1/2, p. 211-245, 1997

SALUSTIANO, I. V. **Bioprospecção de compostos com atividade antimicrobiana de extratos de *Maclura tinctoria* (L.) D. don ex Steud.** Dissertação (Mestrado em Bioquímica Aplicada) – Universidade Federal de Viçosa, 2018

SANTOS, M. F. et al. Non-target insecticidal stress on the Neotropical brown stink bug *Euschistus heros*. **Crop Protection**, n. 82, p. 10-16, 2016

SANTOS, M. F. et al. Non-targeted insecticidal stress in a pest species: insecticides, sexual fitness and hormesis in the Neotropical brown stink bug *Euschistus heros*. **Annals of Applied Biology**, v. 179, p. 375-383, 2015

SANTOS, G. K. N. et al. Effects of *Croton rhamnifolioides* Essential Oil on *Aedes aegypti* Oviposition, Larval Toxicity and Trypsin Activity. **Molecules**, v. 19, p.16573-16587, 2014

SANAD, R. E. MOHANNY, K. M. Toxicological and biological effects of propolis and three plant extracts on the greater wax moth, *Galleria mellonella* L. Egypt **J. Biol. Pest Cont.**, v. 25, p. 213, 2015

SCHENEIDER, M. I. Impact of glyphosate on the development, fertility and demography of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae): Ecological approach. **Chemosphere**, v. 76, p. 1451-1455, 2009

SEIDE, V. E. et al. Glyphosate is lethal and Cry toxins alter the development of the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. **Environ. Pollut.** v. 243, p. 1854-1860, 2018

SHI, Y. et al. The genus *Ficus* (Moraceae) used in diet: Its plant diversity, distribution, traditional uses and ethnopharmacological importance. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 226, p. 185-196, 2018

SILVA, I. **Moscas**. FIOCRUZ, 2019. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/biosseguranca/Bis/infantil/moscas.htm>

SIMÕES, C. M. O. Farmacognosia Do Produto Natural ao Medicamento. Artmed, p. 1-848, 2017

SOARES, M A. et al. Botanical insecticide and natural enemies: a potential combination for pest management against *Tuta absoluta*. **Journal of Pest Science**, v. 92, p. 1433-1443, 2019

SOUZA, R. M. O. F. et al. Activities of Apiaceae essential oils and volatile compounds on hatchability, development, reproduction and nutrition of *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae). **Industrial Crops and Products**, v. 63, p. 226-237, 2015

SOZA-GÓMEZ, D. R. et al. *Insecticide susceptibility of Euschistus heros* (Heteroptera:Pentatomidae) in Brazil. **J. Econ. Entomol**, v. 102, p. 1209-1216, 2009

STACCONI, M. V. et al. First field records of *Pachycrepoideus vindemiae* as a parasitoid of *Drosophila suzukii* in European and Oregon small fruit production areas. **Entomology**, v. 1, p. 11-16, 2013

SULLIVAN, J. J., GOH, K. S. Environmental fate and properties of pyriproxyfen. **Journal of Pesticide Science**, v. 33, n. 4, p. 339-350, 2008

STHAL, J., BABENDREIER, D., HAYE, T. Life history of *Anastatus bifasciatus*, a potential biological control agent of the brown marmorated stink bug in Europe. **Biological Control**, n. 129, p. 178-186, 2019

TOLEDO, P. F. S. et al. Essential oil from Negramina (*Siparuna guianensis*) plants controls aphids without impairing survival and predatory abilities of nontarget Ladybeetles. **Environmental Pollution**, v. 255, p. 1-12, 2019

TAMIZAWA, M., CASIDA, J. E. NEONICOTINOID INSECTICIDE TOXICOLOGY: Mechanisms of Selective Action. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol**, v. 45, p. 247-268, 2005

TOMÉ, H. V. V. et al. Agrochemical synergism imposes higher risk to Neotropical bees than to honeybees. **Royal Society Open Science**, p. 1-11, 2017

TOMÉ, H. V. V. et al. Spinosad in the native stingless bee *Melipona quadrifasciata*: regrettable non-target toxicity of a bioinsecticide. **Chemosphere**, v. 124, p. 103-109, 2015

TSCHOEKE, P. H. et al. Botanical and synthetic pesticides alter the flower visitation rates of pollinator bees in Neotropical melon fields. **Environmental Pollution**, v. 251, p. 591-599, 2019

USDA. **Browse data and analysis**. Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. Disponível em: [https://www.fas.usda.gov/data/search?f\[0\]=field\\_countries:434](https://www.fas.usda.gov/data/search?f[0]=field_countries:434). Acesso em 16 de dezembro de 2019

VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 27, n.1, p.1-7, 2006

VOGT, T. Phenylpropanoid biosynthesis. **Mol. Plant**, n. 3, p.2-20, 2010

WALSH, D.B. et al. *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae): invasive pest of ripening soft fruit expanding its geographic range and damage potential. **J. Int. Pest Manag.**, v.2, n. 1, p. 1-8, 2011

WANG, L. et al. A sensitive and selective multiple reaction monitoring massspectrometry method for simultaneous quantification of flavonolglycoside, terpene lactones, and biflavonoids in *Ginkgo biloba* leaves. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 170, p. 335-340, 2019

WANG, T. et al. Enhanced and green extraction polyphenols and furanocoumarins from Fig (*Ficus carica* L.) leaves using deep eutectic solvents. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.145, p.339-345, 2017

WANG, X. et al. Insecticidal Constructure and Bioactivities of Compounds from *Ficus sarmentosa* var. *henryi*. **Agricultural Sciences in China**, v. 10, n. 9, p. 1402-1409, 2011

WAGNER, H., MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v. 16, p. 97-110, 2009.

WAGNER, H., BLADT, S. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. **Springer Science & Business Media**, 1996

## APÊNDICE A: Perspectiva em Bioprospecção

### 1. Acesso e produção dos extratos vegetais de *Maclura tinctoria* e *Anadenanthera peregrina*

Amostras de galhos e folhas de duas espécies vegetais foram acessadas no município de Viçosa-MG, a saber: *Maclura tinctoria* coletada na Mata do Paraíso (Latitude: 20°79'87.5" S e Longitude: 42°86'23.4" W); *Anadenanthera peregrina* coletada na Mata do Paraíso (Latitude: 20°80'20.1" S e Longitude 42°85'96.1" W). As exsiccatas vegetais foram depositadas no herbário VIC/UFV sob registro: *M. tinctoria* VIC 40.269 e *A. peregrina* VIC 40.213 e o cadastradas no SisGen (CNPq/number 010134/2014-0).

A produção do extrato de *A. peregrina* seguiu a metodologia descrita por MCCLOUD 2010 e adaptado por ALMEIDA 2015, a partir de amostras separadas de folhas e galhos da espécie. Os materiais vegetais frescos foram secos em estufa de ventilação a temperatura controlada de 40°C, por 72 horas. Os materiais vegetais secos foram moídos e triturados em moinho de facas. Em seguida, as amostras foram pesadas e submetidas ao processo de maceração em série, empregando inicialmente como solvente extrator mistura de diclorometano-metanol (1:1), por 24 horas. Após este intervalo, o solvente foi lixiviado e concentrado em evaporador rotatório. A torta retida foi posteriormente extraída com metanol, também por maceração por 24 horas, sendo o extrato obtido ao final também concentrado em evaporador rotatório. A relação material vegetal seco-solvente em ambas as etapas de maceração foi de 1 para 5.

Para a espécie *M. tinctoria*, foi realizada uma extração seriada e exaustiva empregando solventes extratores de polaridades distintas: hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol. Os extratos líquidos foram concentrados em evaporador rotatório, liofilizados, pesados para calcular o rendimento e armazenados em freezer -20°C. Para a espécie *M. tinctoria*, os extratos foram produzidos a partir da folha e para *A. peregrina*, os extratos orgânicos e aquosos foram produzidos a partir de folha e galho, porém apenas o aquoso foi utilizado para triagem biológica neste trabalho.

## **2. Avaliação da ação inseticida**

### **2.1. Triagem dos extratos vegetais por avaliação da toxicidade em *E. heros* (F.) adultos**

Esta triagem foi realizada com os 6 extratos vegetais em estudo: extratos em hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol de folha de *M. tinctoria*; extratos aquosos de folha e galho de *A. peregrina*.

#### **2.1.1. Toxicidade dos extratos vegetais em percevejos adultos por exposição por contato**

Os bioensaios foram realizados em condições controladas (temperatura:  $26 \pm 3$  °C; umidade relativa:  $60 \pm 10\%$ ; fotofase: 14 h) e a exposição dos insetos seguiu o protocolo de SANTOS et al, 2015 com adaptações. Foram preparadas soluções aquosas com concentrações dos extratos das espécies *M. tinctoria* e *A. peregrina* referente a 3,0%, 1,0% e 0,3% do volume final da solução. O dimetilsulfóxido (DMSO) ou Tween 20 foram usados como detergentes para auxiliar na solubilização dos extratos, sendo o DMSO necessário para auxiliar na solubilização de todos os extratos e o Tween 20 apenas para o extrato de *M. tinctoria*. Os detergentes foram usados nas mesmas concentrações referentes aos extratos.

Uma alíquota de 2,0 mL da solução foi colocada em recipientes de vidro transparente de 250 mL de capacidade. Em seguida, os frascos foram acoplados em um sistema de rotor em posição horizontal dentro de uma cabine equipada com exaustor de forma a obter uma secagem homogênea nas paredes dos recipientes. Após secagem, a parte interna do topo de cada frasco foi revestida com Teflon para evitar que os insetos escapassem e 10 insetos adultos sexados (machos e fêmeas) foram colocados em cada recipiente, sendo este fechado com organza e elástico. Como tratamento controle, os insetos foram expostos a recipientes revestidos com água destilada e DMSO ou Tween 20. Os detergentes foram usados nas mesmas concentrações referentes aos extratos. Foram realizadas 5 repetições para cada tratamento. Após 24 e 48 horas de exposição, a mortalidade foi quantificada e os insetos foram reconhecidos como mortos quando incapazes de percorrer duas vezes o comprimento de seu corpo após estímulos mecânicos. A concentração de 0,3% foi

utilizada apenas para os extratos de *M. tinctoria*, sendo este experimento realizado 3 vezes.

### **2.1.2. Toxicidade dos extratos vegetais em percevejos adultos por exposição por ingestão e contato simultâneos**

Os bioensaios foram realizados em condições controladas (temperatura:  $26 \pm 3$  °C; umidade relativa:  $60 \pm 10\%$ ; fotofase: 14 h). Foram preparadas soluções aquosas com concentrações dos extratos das duas espécies de planta referentes a 1,0% do volume final da solução. Uma alíquota de 2 mL de extrato foi colocada em recipientes de vidro transparente de 250 mL de capacidade da mesma maneira que foi feito no item 4.6.1.1, sendo essa a forma de exposição dos insetos por contato aos extratos.

Outro passo, que configura a exposição por ingestão, foi realizado embebendo vagens, alimento dos percevejos, em 20 mL da solução aquosa dos extratos vegetais por 5 segundos, sendo posteriormente transferidas para os frascos de vidros previamente preparados. Tanto o recipiente de vidro quanto as vagens foram secos no sistema de rotor. Finalizada esta etapa, 10 insetos adultos sexados (machos e fêmeas) foram colocados em cada recipiente. A parte interna do topo de cada frasco foi revestida com Teflon para evitar que os insetos escapassem. Os frascos foram fechados com um pedaço de organza e elástico. Como tratamento controle, os insetos foram expostos a recipientes revestidos com água destilada e DMSO ou Tween 20 e a vagem seca embebida na mesma solução preparada para o recipiente.

Para cada tratamento, foram feitas 5 repetições. Após 24 e 48 horas de exposição, a mortalidade foi quantificada e os insetos reconhecidos como mortos incapazes de percorrer duas vezes o comprimento de seu corpo após estímulos mecânicos.

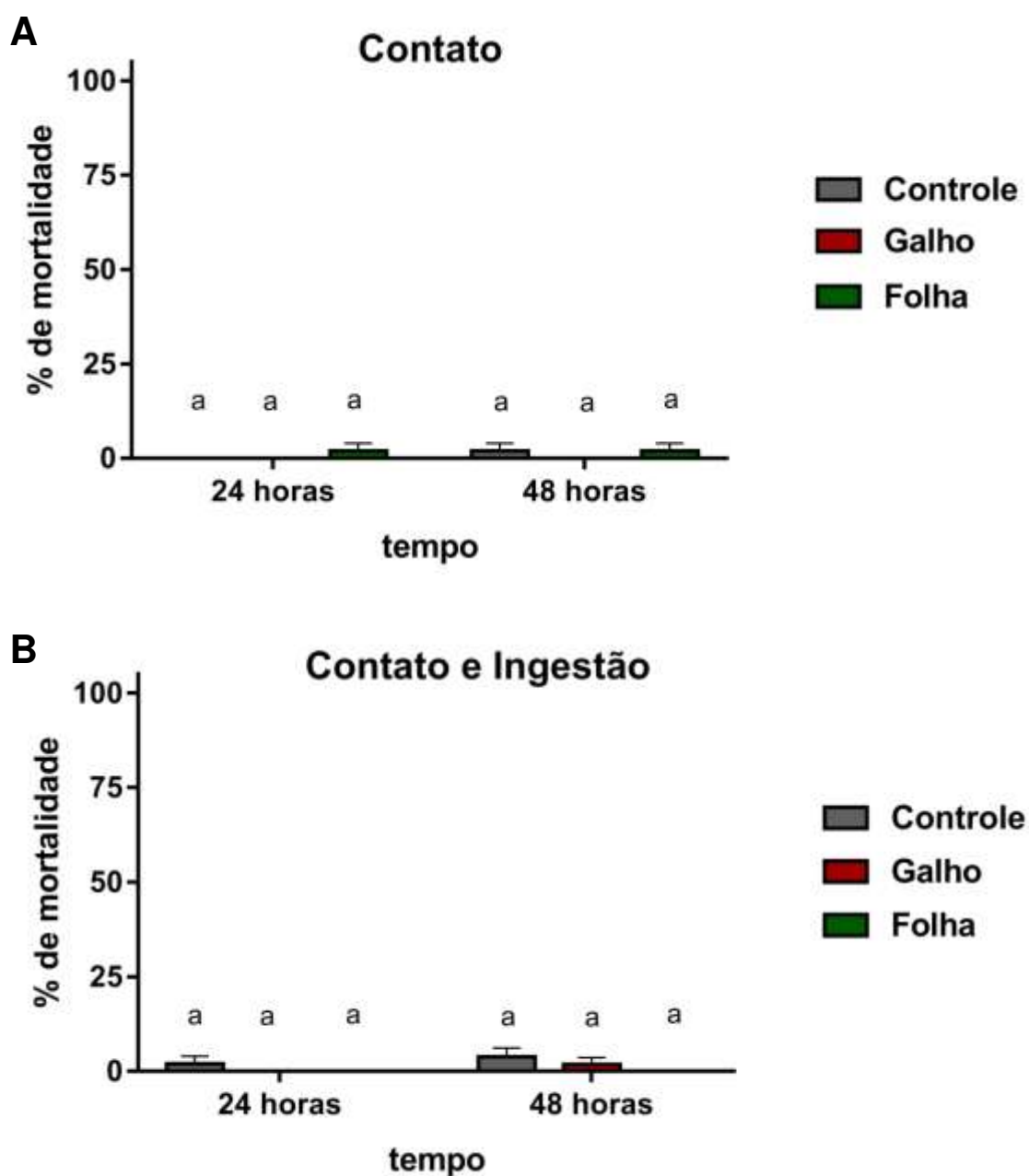
### 3. Resultado da triagem da atividade inseticida dos extratos vegetais frente ao percevejo-marrom adulto

Não foi observada atividade inseticida para os extratos de *Anadenanthera peregrina* em ambos os ensaios (**Figura 29**), sendo que para a exposição por contato, o máximo de mortalidade alcançado foi de 2% para o extrato da folha, enquanto o extrato de galho não implicou em mortalidade em 48 horas de avaliação. Por ingestão e contato simultâneos, a folha não implicou em mortalidade dos insetos enquanto o galho apresentou mortalidade apenas de 2% em 48 horas.

Para extratos da espécie *Maclura tinctoria* foi possível observar significativa atividade inseticida pela metodologia de exposição por contato (**Figura 30**). No ensaio de exposição por contato com concentração de 3,0% do extrato, o extrato etanólico da folha implicou em 56% de mortalidade do percevejo-marrom adulto após 24 horas de exposição e 98% de mortalidade após 48 horas de exposição. O extrato em acetato de etila gerou menor mortalidade, 42,5%, mas ainda foi superior aos extratos em hexano e em diclorometano, com respectivas mortalidades de 17,5% e 7,6% em 48 horas de exposição. Importante ressaltar, que os extratos de *M. tinctoria* usados nesta triagem preliminar foram obtidos na forma de percolação seriada, diferentemente do processo de obtenção dos extratos das demais espécies. A percolação seriada empregando solventes de diferentes polaridades proporciona uma melhor separação e concentração de classes de metabólitos secundários em cada extrato.

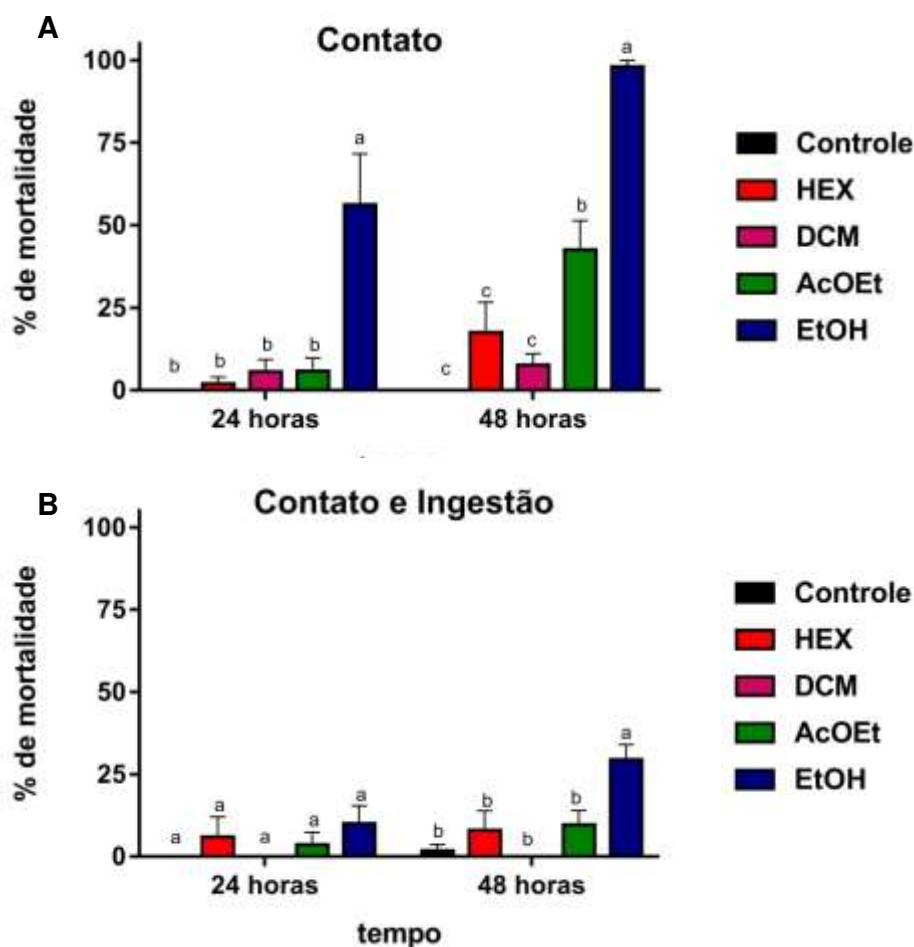
Pela metodologia de exposição por ingestão e contato simultâneos com concentração de 1,0% do extrato (**Figura 30**), apenas após 48 horas de exposição foi possível observar aumento da mortalidade dos percevejos adultos tratados com extrato etanólico, correspondente a 29,5%. A mortalidade dos demais extratos, em ordem crescente de polaridade, foi de 8% para o hexano, 0% para o diclororometano e 9,7% para o acetato de etila em 48 horas de exposição. A redução na mortalidade dos insetos neste ensaio pode estar associada à disponibilidade de alimento, o qual fornece maior energia para que o inseto possa suportar e resistir aos estímulos negativos ocasionados pelos extratos vegetais. Ademais, a presença do alimento (vagem) limita a locomoção do inseto pelo frasco reduzindo o contato com a superfície tratada com os extratos.

Figura 29 – Mortalidade de *E. heros* adulto tratado com os extratos de *Anadenanthera peregrina*



Legenda: A) Ensaio de exposição por contato. B) Ensaio de exposição por ingestão e contato simultâneos. As médias não diferem entre si pela análise de variância ANOVA ( $P \leq 0,05$ ). O controle usado foi uma solução aquosa contendo DMSO solubilizado na mesma concentração do extrato, ou seja, 3,0% e 1,0% respectivamente.

Figura 30 – Mortalidade de *E. heros* adulto tratado com extratos de *Maclura tinctoria*

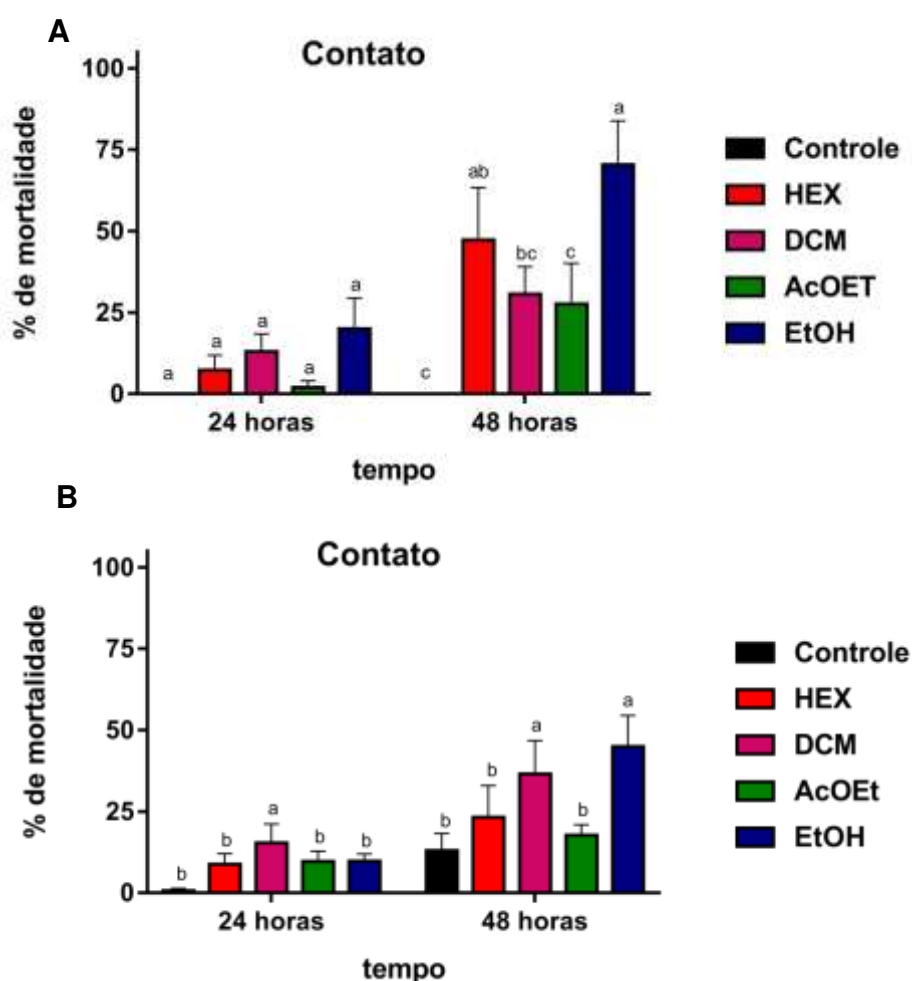


Legenda: HEX: extrato em hexano; DCM: extrato em diclorometano; AcOEt: extrato em acetato de etila, EtOH: extrato em etanol. Controle: Água, DMSO e Tween 20. A) Exposição por contato a 3,0% de extrato. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelos testes de Dunnett (24 horas) e pelo teste de Holm-Sidak (48 horas) a 5% de significância. B) Exposição por ingestão e contato a 1,0% de extrato. Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pela análise ANOVA (24 horas) e pelo teste de Dunnett (48 horas) a 5% de significância.

Como foi observada atividade inseticida dos extratos etanólicos e acetato de etila por exposição por contato a 3,0%, outras concentrações (1,0% e 0,3%) foram avaliadas para descobrir se a atividade persistia. Quando estudada a concentração de 1,0%, os extratos em hexano e em etanol mostraram atividade inseticida de 47% e 70% de mortalidade, respectivamente, após 48 horas de experimento (**Figura 31**) enquanto os extratos de diclorometano e acetato de etila apresentaram mortalidade

inferior de 30% e 27%. Já na concentração de 0,3%, apenas o extrato etanólico apresentou atividade inseticida mais relevante, correspondente a 45% enquanto o extrato de hexano, diclorometano e acetato de etila tiveram mortalidade compatível à 23%, 36% e 17%. Os resultados indicam que essa espécie é promissora na busca por inseticidas naturais e o extrato etanólico da folha de *M. tinctoria* apresenta potencial ação inseticida em adultos de *E. heros* por desempenhar atividade biológica nas três concentrações e nas duas metodologias estudadas.

Figura 31 – Mortalidade de *E. heros* adulto tratado com extratos de *Maclura tinctoria*



Legenda: Controle: Água, DMSO e Tween 20. A) Exposição por contato a 1,0% de extrato. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pela análise de variância e teste de Dunnett (24 horas) e pelo teste de Holm-Sidak (48 horas) a 5% de significância. B) Exposição por contato a 0,3% de extrato. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pela análise de variância ANOVA e Dunnett a 5% de significância. .

A literatura mostra que a soja, principal cultura afetada por essa espécie de percevejo, produz flavonoides que oferecem proteção contra o ataque de pestes agrícolas (VOGT, 2010). A rutina e genisteína produzidas em folhas de soja afetam o desempenho desfolhar de lagartas *Trichoplusia ni* e *Anticarsia gemmatalis*. O aumento de concentrações de daidzeína e genisteína (isoflavonoides) em sementes de soja causou danos no percevejo *Nezara viridula*, provocando efeitos adversos na preferência alimentar (HOFMAN-CAMPO, NETO e OLIVEIRA, 2006). GRAÇA et al, 2016 mostraram que o percevejo *E. heros* sofreu prejuízo no ganho de peso quando tratado com sementes contendo cis-jasmona, liberada pelo estresse natural sofrido pela planta e responsável por aumentar os níveis de isoflavonoides (daidzeína e genisteína) em sementes imaturas da soja.

Cerca de 30 compostos flavonoídicos já foram identificados em extratos etanólicos de casca e folha de *M. tinctoria* e nem todos foram submetidos a algum tipo de atividade biológica (SALUSTIANO, 2018). Possivelmente, a atividade inseticida encontrada para o extrato etanólico de folha de *M. tinctoria* no presente trabalho está associada à presença e ação de algum flavonoide ou um conjunto dele.

Os extratos de *M. tinctoria* mostraram-se promissores para serem utilizados em formulação para aplicação como inseticida de origem natural. Porém, mais estudos são necessários para avaliar a ação inseticida frente a outros alvos agrícolas e a segurança desses extratos em relação a insetos não alvos precisa ser avaliada por meio da Ecotoxicologia.