

**JÉSSICA NUNES DE ASSIS**

**CARACTERIZAÇÃO DE METABÓLITOS DE FOLHAS E GALHOS DE  
ESPÉCIES DE *Ficus* COM POTENCIAL FITOTERÁPICO E PARA O  
CONTROLE DE *Meloidogyne javanica***

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: Humberto Josué de Oliveira Ramos

Coorientadores: Dalila Sêni Buonicontro  
Eduardo Vinícius Vieira Varejão  
João Paulo Viana Leite  
Leandro Grassi de Freitas

**VIÇOSA - MINAS GERAIS**

**2020**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

A848c  
2020 Assis, Jéssica Nunes de, 1996-  
Caracterização de metabólitos de folhas e galhos de  
espécies de *Ficus* com potencial fitoterápico e para o controle de  
*Meloidogyne javanica* / Jéssica Nunes de Assis. – Viçosa, MG,  
2020.

41 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Humberto Josué de Oliveira Ramos.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.39-41.

1. Nematoda em plantas. 2. Espectrometria de massas.  
3. Cromatografia gasosa. 4. Cromatografia líquida. 5. *Ficus*  
*carica*. 6. *Meloidogyne javanica*. I. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.  
Programa de Pós-graduação em Bioquímica Aplicada. II. Título.

CDD 22. ed. 632.6257

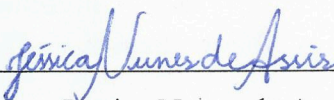
JÉSSICA NUNES DE ASSIS

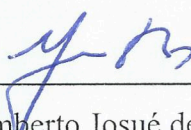
CARACTERIZAÇÃO DE METABÓLITOS DE FOLHAS E GALHOS DE  
ESPÉCIES DE *Ficus* COM POTENCIAL FITOTERÁPICO E PARA O  
CONTROLE DE *Meloidogyne javanica*

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: 07 de agosto de 2020

Assentimento:

  
\_\_\_\_\_  
Jessica Nunes de Assis  
Autora

  
\_\_\_\_\_  
Humberto Josué de Oliveira Ramos  
Orientador

## AGRADECIMENTOS

Aos colaboradores na condução dos experimentos deste trabalho Janaína Roberta Alves, Angélica de Souza Gouveia, Juliano Mendonça Rodrigues e Lucas Leal Lima.

Ao professor orientador Humberto Josué de Oliveira Ramos pela confiança e aos coorientadores Prof. João Paulo Viana Leite e Prof. Eduardo Vinícius Vieira Varejão pelos conhecimentos transmitidos, especialmente à professora e coorientadora Dalila Sêni Buonicontro e à equipe do Laboratório de Nematologia do departamento de Fitopatologia/UFV, pelo suporte na obtenção dos nematoides neste estudo.

Ao Prof. Paulo Roberto Cecon do departamento de Estatística da UFV, pela atenção e auxílio nas descrições das análises estatísticas.

Ao Núcleo de Análise de Biomoléculas da UFV, onde desenvolvi a maior parte das atividades relacionadas a espectrometria de massas, e ao Laboratório de Biodiversidade da UFV.

Obrigada a Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pelo suporte institucional e à CAPES pela concessão da bolsa de estudos e apoio financeiro para a realização do projeto.

A todos os colegas do programa de pós-graduação em Bioquímica Aplicada. Em especial minhas amigas Lethícia e Marina pelo companheirismo de sempre.

Aos meus pais, Maria e José, pela confiança e pelo amor incondicional.

À minha irmã e sobrinho, Daiane e Cauã, pelo incentivo e motivação.

A Deus, pela minha vida e sabedoria!

Muito obrigada!

## RESUMO

ASSIS, Jéssica Nunes, M.Sc, Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2020. **Caracterização de metabólitos de folhas e galhos de espécies de *Ficus* com potencial fitoterápico e para o controle de *Meloidogyne javanica*.** Orientador: Humberto Josué de Oliveira Ramos. Coorientadores: Dalila Sêni Buonicontro, Eduardo Vinícius Vieira Varejão, João Paulo Viana Leite e Leandro Grassi de Freitas.

Os fitonematoides são organismos altamente especializados que parasitam plantas causando prejuízos. Dentre os principais fitonematoides destacam-se os do gênero *Meloidogyne*, também conhecidos como “nematoides das galhas”. No Brasil, *Meloidogyne javanica* é uma das espécies reconhecidas pela grande importância econômica, devido aos danos causados à diversas culturas agronomicamente relevantes (Ferraz & Monteiro, 2011). Recentemente testes conduzidos *in vitro* por (Alves et al. 2020), comprovaram que espécies do gênero *Ficus* demonstraram elevado potencial como agente nematicida. Especialmente extratos provenientes dos galhos de *Ficus carica*. No entanto, embora o efeito nematicida nestas espécies tenha sido observado, os compostos especificamente associados a esta atividade ainda foram pouco elucidados. Desse modo, este estudo teve como principal objetivo a caracterização de moléculas biologicamente ativas presentes em seis espécies *Ficus*, com ênfase em *Ficus carica*, potencialmente ativas frente a *M. javanica*. Neste sentido, foram empregadas tecnologias analíticas para a obtenção do perfil metabólico das plantas, tais como os métodos baseados em espectrometria de massas acoplada com cromatografia líquida e gasosa para identificação de compostos putativos. Os perfis fitoquímicos qualitativos das amostras de folhas e galhos de *F. carica* revelaram a presença de diferentes classes de metabólitos secundários, sendo elas antraquinonas, cumarinas, esteroides, triterpenos, flavonoides, óleos essenciais, saponinas e taninos. Sub-frações por partição líquido-líquido e em fase sólida foram utilizadas para análises de inibição dos juvenis J2. Com relação aos flavonoides caracterizados, observou-se um contraste nas concentrações de kaempferol e rutina na folha e no galho de *F. carica* quando comparada as demais espécies monitoradas. Percentuais de juvenis do segundo estágio totalmente mortos ou imóveis em solução, confirmaram a eficiência de subfrações provindas da extração em fase normal e reversa da folha e do galho de *F.carica* sobre a mortalidade ou paralise de *M. javanica*.

**Palavras-chave:** *Ficus carica*. *Meloidogyne javanica*. Espectrometria de massas. Cromatografia gasosa.

## ABSTRACT

ASSIS, Jéssica Nunes, M.Sc, Universidade Federal de Viçosa, August, 2020. **Characterization of leaf and branch metabolites of *Ficus* species with phytotherapeutic potential and for the control of *Meloidogyne javanica*.** Advisor: Humberto Josué de Oliveira Ramos. Co-advisors: Dalila Sêni Buonicontro, Eduardo Vinícius Vieira Varejão, João Paulo Viana Leite and Leandro Grassi de Freitas.

Phytonematoids are highly specialized organisms that parasitize plants causing damage. Among the main phytonematodes, those of the *Meloidogyne* genre, also known as “gall nematodes”, stand out. In Brazil, *Meloidogyne javanica* is one of the species recognized for its great economic importance, due to the damage caused to several agronomically relevant crops (Ferraz & Monteiro, 2011). Recently tests conducted *in vitro* by (Alves et al. 2020), proved that species of the genus *Ficus* demonstrated high potential as nematicidal agent. Especially extracts from the *Ficus carica* branches. However, although the nematicidal effect in these species has been observed, the compounds specifically associated with this activity have still been little elucidated. Thus, this study had as main objective the characterization of biologically active molecules present in six *Ficus* species, with an emphasis on *Ficus carica*, potentially active against *M. javanica*. In this sense, analytical technologies were used to obtain the metabolic profile of the plants, such as methods based on mass spectrometry coupled with liquid and gas chromatography to identify putative compounds. The qualitative phytochemical profiles of *F. carica* leaves and branches samples revealed the presence of different classes of secondary metabolites, namely anthraquinones, coumarins, steroids, triterpenes, flavonoids, essential oils, saponins and tannins. Sub-fractions by liquid-liquid partition and solid phase were used for J2 juvenile inhibition analyzes. Regarding to the characterized flavonoids, a contrast was observed in the concentrations of kaempferol and rutin in the leaf and branch of *F. carica* when compared to the other monitored species. Percentages of second stage juveniles totally dead or immobile in solution, confirmed the efficiency of subfractions from the extraction in normal and reverse phase of the leaf and branch of *F. carica* on *M. javanica* mortality or paralysis.

**Keywords:** *Ficus carica*. *Meloidogyne javanica*. Mass spectrometry. Gas chromatography.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	7
METODOLOGIA .....	10
<i>Coleta, processamento e identificação do material vegetal</i> .....	10
<i>Obtenção dos extratos vegetais</i> .....	10
<i>Prospecção fitoquímica</i> .....	11
<i>Perfil metabólico por GC-MS</i> .....	12
<i>Perfil de flavonoides por LC-MS</i> .....	13
<i>Partição líquido – líquido do extrato bruto de Ficus carica</i> .....	14
<i>Extração em fase sólida (SPE – fase reversa)</i> .....	15
<i>Extração em fase sólida (SPE – fase normal)</i> .....	15
<i>Obtenção de juvenis do segundo estágio de Meloidogyne javanica</i> .....	16
<i>Teste in vitro</i> .....	16
RESULTADOS .....	17
<i>Prospecção fitoquímica</i> .....	17
<i>Perfil metabólico por GC-MS</i> .....	18
<i>Perfil de flavonoides por LC-MS</i> .....	22
<i>Efeito das subfrações dos extratos de F. carica sobre a motilidade de J2 de M. javanica</i> .....	31
<i>Efeito nematocida das frações dos extratos de F. carica sobre J2 de M. javanica</i> .....	34
DISCUSSÃO.....	35
CONCLUSÃO .....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	39

## INTRODUÇÃO

Os fitonematoides são organismos microscópicos altamente especializados que parasitam plantas causando prejuízos nas mais variadas culturas e regiões do mundo. Dentre os principais fitonematoides destacam-se os do gênero *Meloidogyne* Goeldi, também conhecidos como nematoides das galhas. No Brasil, *Meloidogyne javanica* é uma das espécies reconhecidas pela grande importância econômica, devido aos danos causados em culturas agronomicamente relevantes do país (Jones et al. 2013).

Em regiões de clima tropical, espécies do gênero *Meloidogyne* encontram condições de umidade e temperatura ideais para reprodução. Segundo Sikora & Fernandez (2005), os prejuízos contabilizados em culturas susceptíveis como a berinjela e o tomate nessas regiões, podem variar de 17 a 20% para a cultura da berinjela e de 24 a 38% para a cultura do tomate. Atualmente, perdas de até 100% no rendimento dessas hortaliças já foram observadas quando medidas de controle para esses fitoparasitas não foram adotadas (Pinheiro et al. 2019).

O ciclo biológico inicia quando as fêmeas depositam seus ovos dentro de uma matriz gelatinosa, que os mantêm agregados. O desenvolvimento do ovo começa dentro de algumas horas após sua deposição e resulta na formação do primeiro estágio do juvenil (J1) que permanece enrolado no interior do ovo. Após uma ecdise ainda dentro do ovo, ocorre a eclosão do juvenil do segundo estágio (J2) que migra para o solo até localizar o sistema radicular da planta hospedeira (Cepulyte, 2018). Plantas atacadas por esses fitoparasitas geralmente apresentam sistema vascular completamente desorganizado, parte aérea e radicular reduzidas, conseqüentemente a absorção e a translocação da água e dos nutrientes pela planta ficam comprometidos (Kihika, 2017).

A aplicação de compostos puramente sintéticos e altamente tóxicos é a principal forma de manejo de parasitas em diversas culturas agrícolas. Estima-se que mais de 50% do consumo mundial de nematicidas sintéticos seja destinado a combater perdas econômicas causadas pelos nematoides das galhas (Haydock, 2006). No entanto, o uso inadequado e prolongado destas substâncias causa danos, muitas vezes irreparáveis, ao ecossistema como assoreamento e contaminação de corpos hídricos, superficiais e subterrâneos (Carneiro, 2015). Relatórios recentes apontam o Brasil como o maior consumidor de agrotóxicos do mundo e seu uso na agricultura já se tornou um problema de saúde pública devido a carência

de ações e tecnologias que garantam o uso seguro e racional desses insumos (Pignati et al. 2017).

As últimas décadas têm sido marcadas por preocupações da população mundial com questões ambientais que envolvem o esgotamento de recursos fósseis e as consequências da poluição. Nesse contexto, uma demanda crescente tem surgido em relação a processos e produtos baseados na exploração racional e sustentável de recursos renováveis, os quais atraem o interesse de diversos setores industriais. A expectativa é que os inúmeros recursos da biodiversidade brasileira, quando bem caracterizados e racionalmente explorados pelas novas ciências, possam contribuir de forma cada vez mais efetiva com a pujança da bioeconomia nacional (Embrapa, 2018).

Em resposta a esta realidade, práticas agrícolas ambientalmente seguras e pesquisas acerca de novos produtos capazes de atuarem no manejo sustentável, vêm crescendo no Brasil. Atualmente, medidas de controle alternativas como a rotação de culturas têm se mostrado eficazes na redução das populações e na recuperação de áreas infestadas por *Meloidogyne* spp. No entanto, este grupo de nematoides possui uma ampla gama de hospedeiros, o que dificulta a adoção dessas medidas (Castro, 2019). No âmbito das estratégias de pesquisa, destaca-se a bioprospecção associada à química de produtos naturais. O termo bioprospecção foi definido, de acordo com a Medida Provisória 2186-16/2001 revogada pela Lei nº 13.123/2015, como “atividade exploratória que visa identificar componente do patrimônio genético e informação sobre conhecimento tradicional associado, com potencial de uso comercial”.

As plantas são organismos que sintetizam uma grande variedade de metabólitos secundários, também chamados de princípios ativos, os quais respondem a diferentes fatores de estresse ambiental, bióticos e abióticos. Estes compostos, aparentemente não apresentam relação direta com os processos metabólicos de fotossíntese, respiração e crescimento. Entretanto, oferecem diversas vantagens para sobrevivência, desenvolvimento e perpetuação da espécie (Tiwari & Rana, 2015). Uma vez que os metabólitos secundários desencadeiam efeito farmacológico ou toxicológico em humanos e animais, eles são muito utilizados pelas indústrias para a fabricação de medicamentos, cosméticos, fragrâncias, suplementos alimentares, defensivos agrícolas e outros bioprodutos. Portanto, o interesse científico e industrial em torno dos metabólitos secundários das plantas tem se tornado cada vez maior (Guerriero et al. 2018).

Dentre as famílias botânicas avaliadas como promissoras para o controle de fitoparasitas está a família Moraceae Gaudich. No Brasil, o gênero *Ficus* reúne espécies popularmente conhecidas como lombrigueiras, por serem desde a antiguidade, utilizadas no tratamento de verminoses. Segundo Lansky (2008), mais de 130 compostos naturais já foram encontrados em espécies do gênero na literatura e dentre as principais classes de compostos com atividade antagonista sobre fitonematoides estão os alcaloides, cumarinas, terpenos e flavonoides. Acredita-se que os compostos fenólicos sejam os mais tóxicos para os nematoides, visto que muitos deles atuam como nematicidas, compostos nemostáticos (que não matam, mas inibem seu movimento), repelentes ou inibidores da eclosão dos ovos.

Recentemente, experimentos *in vitro* realizados por Alves et al. (2020) demonstraram a eficiência dos extratos de diferentes espécies de *Ficus* na inibição da eclosão de ovos e mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*. Dentre as espécies estudadas, *Ficus carica* L. foi a que apresentou elevado potencial como agente nematicida sobre a espécie *Meloidogyne javanica*. Adições de extratos provenientes de galhos de *F. carica* (1500 µg/mL), causaram altas taxas de mortalidade de juvenis (98,20%), sendo as doses eficazes comparáveis às adotadas para compostos isolados quando aplicados no controle de fitonematoides já registradas na literatura ( $EC_{50} = 275,42$  µg/mL). Frações polares obtidas por partição líquido-líquido também demonstraram significativa atividade nematicida (fração aquosa:  $EC_{50} = 724,44$  µg/mL e fração acetato de etila:  $EC_{50} = 1023,29$  µg/mL).

No entanto, embora o efeito nematicida nestas espécies já tenha sido observado, os compostos especificamente associados a esta atividade ainda são pouco elucidados (Mawa et al. 2013). Neste sentido, tecnologias analíticas empregadas para a obtenção do perfil metabólico de plantas, tais como os métodos baseados em espectrometria de massas (MS) acoplada com a cromatografia líquida (LC-MS) e gasosa (GC-MS), encontram grande aplicabilidade (Lanças, 2013). Portanto, o presente trabalho teve como objetivos principais a investigação e a caracterização de moléculas biologicamente ativas presentes na folha e no galho de seis diferentes espécies do gênero *Ficus* e a avaliação do efeito de subfrações dos extratos de folhas e de galhos de *F. carica* purificadas sobre juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica*.

## METODOLOGIA

### *Coleta, processamento e identificação do material vegetal*

O material proveniente de seis espécies de *Ficus* foi coletado na região do bioma da Mata Atlântica localizada no município de Viçosa–MG. A partir disso, foi feita a separação das folhas e dos galhos e em seguida foram determinados os valores de peso fresco para cálculo do rendimento. As amostras foram submetidas ao processo de desidratação, o qual ocorreu em estufa ventilada por cerca de 72 horas a 40°C. Posteriormente, as amostras secas foram pulverizadas em moinho de facas. Logo foi determinado o peso seco e as amostras foram armazenadas à temperatura ambiente em local seco e protegido da luz. Exemplos do material vegetal coletado encontram-se depositados no herbário da UFV e estão disponíveis para consulta na plataforma virtual de dados para coleções científicas *speciesLink*, sob os respectivos números de registros VIC descritos na Tabela 1 (<http://splink.cria.org.br/>). A pesquisa envolvendo as espécies de *Ficus* avaliadas está devidamente cadastrada junto ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen) sob o número AF1E3D3.

**Tabela 1** - Identificação botânica de espécies de *Ficus* nativas do bioma Mata Atlântica. VIC N° corresponde ao registro de exsicata depositada no HERBÁRIO VIC /UFV/DBV.

Espécie	VIC N°	Coordenadas Geográficas
<i>Ficus adhatodifolia</i> Schott Ex Spreng.	31644	20°45'40.2"(S) 42°52'14.1"(W)
<i>Ficus benjamina</i> L.	31702	20°45'37.8"(S) 42° 51'54.1"(W)
<i>Ficus carica</i> L.	31703	20°45'44.1"(S) 42°51'07.5"(W)
<i>Ficus elastica</i> Roxob. ex Hornews	22434	20°45'19.1"(S) 42°52'25.5"(W)
<i>Ficus gomelleira</i> Khunt.	31667	20°46'25.0"(S) 42°52'29.8"(W)
<i>Ficus microcarpa</i> L. f.	31464	20°45'27.3"(S) 42°52'30.0"(W)

### *Obtenção dos extratos vegetais*

Os extratos vegetais foram obtidos pelo método de percolação exaustiva, no Laboratório de Biodiversidade do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBB-UFV). A extração foi realizada em percolador (em aço inox Prolab) à temperatura ambiente

na proporção de 150g de material pulverizado para 1,5 L de etanol 99,5° como solvente extrator. O conteúdo extraído do percolador foi imediatamente concentrado em evaporador rotatório à vácuo, à temperatura de 40°C e em seguida liofilizado (ScanVac – CoolSafe 55-4 Labogene). Por fim, os extratos foram armazenados em frascos de vidro âmbar, hermeticamente fechados, e mantidos em refrigerador a -20°C. O rendimento dos extratos brutos obtidos foi calculado conforme a Tabela 2.

**Tabela 2** - Dados de rendimento do material vegetal e extratos de *Ficus* spp.

Espécie de <i>Ficus</i>	Parte da Planta*	Material Vegetal fresco (g)	Material Vegetal desidratado (g)	Rendimento (%)	Droga Vegetal (g)	Extrato (g)	Rendimento (%)
<i>F.adhatodifolia</i>	F	4810	1120	23,28	150	8,06	5,37
	G	3210	645	20,37	150	3,45	3,50
<i>F.benjamina</i>	F	1916	1110	57,94	150	11,01	7,40
	G	1800	955	53,05	150	3,72	2,50
<i>F.carica</i>	F	2075	460	22,17	150	17,41	26,11
	G	1015	205	20,20	150	7,82	11,73
<i>F.elastica</i>	F	3770	1125	29,84	150	9,35	6,24
	G	2130	715	33,57	150	10,65	7,10
<i>F.gomelleira</i>	F	2395	878	36,67	150	15,56	10,40
	G	2660	911	34,25	150	6,90	4,60
<i>F.microcarpa</i>	F	4045	1170	28,90	150	17,56	7,02
	G	1348	540	40,05	150	34,26	13,70

\* Folha (F); Galho (G)

### **Prospecção fitoquímica**

A prospecção fitoquímica foi realizada através do método da Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Foram solubilizados 5 mg do extrato bruto etanólico em 0,5 mL de etanol e éter 1:1 (v/v), além de padrões puros para cada classe, que foram aplicados com o auxílio de capilares de vidro em folhas de alumínio contendo sílica (com indicador

fluorescente 254 nm, Sigma®) nos tamanhos 10 cm de altura por 5 cm de largura. As placas foram ativadas em estufa à 50°C por 10 min, tanto antes como após a aplicação das amostras. Posteriormente, as placas foram colocadas em cuba de vidro contendo as fases móveis sugeridas pelos protocolos referentes à identificação de classes de metabólitos secundários descritos por Wagner & Bladt (1984). As diferentes classes de produtos naturais presentes nas frações foram identificadas utilizando-se os padrões e os agentes reveladores também descritos em Wagner & Bladt (1984) conforme a Tabela 3.

**Tabela 3** - Condições cromatográficas empregadas para a separação de diferentes classes de metabólitos descritas por Wagner e colaboradores (1984).

Classe de Metabólitos	Fase Móvel (v/v)	Padrão	Revelador
<b>Secundários</b>			
<b>Cumarinas</b>	Éter etílico-tolueno 1:1	Venalot	Hidróxido de potássio 5% em etanol
<b>Alcaloides</b>	Acetato de etila-metanol-água 100:14:10 ou clorofórmio-metanol 85:15	Quinina	Reagente de Dragendorff
<b>Antraquinonas</b>	Acetato de etila-metanol-água 100:17:13	1,8 diidroxiantraquinona	Hidróxido de potássio 5% em etanol
<b>Esteroides e Triterpenos</b>	Acetato de etila-metanol-água 77:15:8 ou hexano-acetato de etila 1:1	$\beta$ -sitosterol	Reagente de Lieberman-Burchard
<b>Flavonoides</b>	Acetato de etila-ácido fórmico-ácido acético-água 55:5:5:12	Rutina	Cloreto de alumínio 5% em metanol
<b>Óleos Essenciais</b>	Clorofórmio ou tolueno-acetato de etila 93:7	Eugenol	Ácido sulfúrico 5% em água
<b>Saponinas</b>	Clorofórmio-metanol 95:5 ou clorofórmio-metanol-água 65:50:10	18- $\beta$ -glicirretínico	Anisaldeído sulfúrico
<b>Taninos</b>	Tolueno-butanol-ácido acético-água 50:25:25:5	Ácido Pirogálico	Reagente de Barton

### *Perfil metabólico por GC-MS*

Amostras do extrato bruto etanólico da folha e do galho de dez espécies do gênero *Ficus* foram analisadas utilizando um sistema GC-MS pertencente ao Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol) do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCB) da UFV, com as seguintes especificações: GC Cromatógrafo Agilent, 7890A e Espectrômetro

TruTOF® HT TOFMS, Leco, equipado com uma coluna capilar de 30 mm (MDN-35) operado de acordo com Lisec e colaboradores (2006). Amostras de 1 µL foram injetadas no modo splitless a 230°C e carregadas pelo fluxo de gás (fluxo contínuo de hélio) de 2 mL/min. A temperatura do forno foi inicialmente mantida constante a 80°C e, em seguida, aumentou-se 15°C/min até alcançar 330°C, sendo essa temperatura mantida durante 5 min. Os cromatogramas gerados tiveram a linha de base corrigida e alinhada pelo programa ChromaTof (Agilent). Neste processamento foi também gerado uma lista contendo os tempos de retenção cromatográfico dos padrões internos (n-alcenos) utilizados para cálculo dos índices de retenção de cada íon fragmentado. Os espectros de GC-MS foram exportados e os perfis foram analisados automaticamente pelo programa TargetSearch (Cuadros-Inostroza et al. 2009). Um script para identificação e quantificação de metabólitos foi utilizado no software R com parâmetros de processamento e alinhamento otimizados para a plataforma GC/TOF. Os parâmetros utilizados foram os seguintes: massRange (faixa de massas) de 85-500 Da; IntThreshold (intensidade mínima) de 50; TopMasses (10 massas mais intensas) de 10; r thresh (correlação acima) de 0,05. Para a identificação dos metabólitos foi utilizada a biblioteca de fragmentação por impacto eletrônico (EI) e de índices de retenção (RI) GMDb\_FAMELib\_TS\_20110228\_IS.txt, geradas pela GMD Mass Spectrum Reference Library (<http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/download/>).

### ***Perfil de flavonoides por LC-MS***

Alíquotas de 100 mg do extrato bruto etanólico da folha e do galho de seis espécies do gênero *Ficus* foram adicionadas a 200 µL de solução extratora (metanol 20% / Isopropanol 79% / ácido acético 1%), submetidas a ultrassom por 30 min e centrifugadas a 14.000 g por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado, e o procedimento repetido. As amostras resultantes foram armazenadas a -80°C até a análise no LC-MS do tipo UHPLC QqQ. Aproximadamente 300 µL das amostras extraídas foram colocadas em vials e 5,0 µL dos extratos foram injetados no sistema LC-MS pertencente ao NuBioMol do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCB) da UFV. Utilizou-se uma coluna cromatográfica (Agilent Eclipse Plus, RRHD, 1.8 µm, 2.1x50 mm) com fluxo de 0,3 mL/min acoplada online a um espectrômetro de massa do tipo triplo quadrupolo QqQ (Agilent). Os perfis de flavonoides foram gerados por três estratégias consecutivas segundo Gómez et al., 2018. Para o primeiro método “target” foram utilizados os seguintes padrões: flavonols (Kaempferol, Quercetin, Myricetin, Catechin, Epicatechin, Rutin and Morin), flavones (Luteolin, Apigenin, Oerientin, Isoorientin, Vitexin, Isovitexin), flavanones (Naringin, Hesperetin, Naringenin and

Hesperidin), chalcones (Chalcone and Phloretin) and isoflavones (Daidzein, and Genistein), todos obtidos da Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, USA). Curvas padrões foram obtidas para cada aglicona variando de 1 a 20,000 ng/mL, e foram usadas para converter as áreas do XICs em valores em ng/g.. Nesta estratégia, os tempos de retenção e as transições MRM (multiple reaction monitoring), geradas para cada padrão, foram tabulados para formatar a lista de transição e foram utilizados como entrada no pacote Skyline, possibilitando análises quantitativas dos compostos específicos. Na segunda estratégia foi aplicada uma abordagem baseada em MS para perfis de ampla faixa para avaliar glicoconjugados, este método designado “non target” também foi efetuado de acordo com (Gómez et al. 2018). Por fim, os flavonoides foram caracterizados a partir da diferença entre a massa total da molécula glicoconjugada e a massa do núcleo da aglicona. Com os valores obtidos de m/z, foi possível pesquisar no banco de dados de espectros de massa Mass Bank (<http://www.massbank.jp>) ou outras fontes na literatura, os flavonoides que compartilham a mesma massa observada de acordo com a varredura dos íons precursores.

#### ***Partição líquido – líquido do extrato bruto de Ficus carica***

Os fracionamentos dos extratos etanólicos da folha e do galho de *Ficus carica* foram efetuados por meio do método de partição líquido-líquido. Para o preparo da fase aquosa, 5g dos extratos foram homogeneizados em 100 mL de água ultra-pura (MiliQ) e submetidos a banho ultrassônico à temperatura de 30°C por 30min. Após, em um funil de separação de 500 mL foram adicionados 100 mL da fase aquosa mais 100mL das fases orgânicas, de maneira subsequente na seguinte ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol (Sigma®). A homogeneização das fases ocorreu pela leve agitação do funil (movimentos em forma de 8). Subsequentemente, aguardou-se até que as fases estivessem novamente distintas, e só então foram recolhidas (escoadas) separadamente. Todo o processo foi repetido três vezes para cada solvente utilizado. Todas as frações orgânicas foram concentradas em evaporador rotatório à vácuo e submetidas ao processo de liofilização (ScanVac – CoolSafe 55-4 Labogene). Após, foi realizada a prospecção fitoquímica das frações orgânicas obtidas, conforme a metodologia descrita anteriormente para o extrato bruto etanólico.

### ***Extração em fase sólida (SPE – fase reversa)***

As frações aquosas da folha e do galho de *Ficus carica* também foram submetidas à extração em fase sólida reversa, assim como as frações de acetato de etila. Para a fração aquosa o cartucho foi equilibrado três vezes com 500 µL de acetonitrila e mais três vezes com 500 µL de H<sub>2</sub>O + ácido acético 0,02% (v/v). Em seguida, as frações aquosas previamente secas e concentradas foram solubilizadas em H<sub>2</sub>O + Ácido acético 0,02% (v/v) na concentração de 100 mg/mL e aplicadas três vezes para retenção de compostos de baixa e média polaridade. Logo após, foi efetuada uma lavagem com ácido acético 0,02% (v/v) para eliminar compostos que interagiram parcialmente com a fase estacionária. Já para a fração de acetato de etila o cartucho foi equilibrado com 500 µL de acetonitrila por três vezes e mais três com 500 µL de acetato de etila. As frações foram solubilizadas em acetato de etila na concentração de 100 mg/mL e aplicadas três vezes com a finalidade de reter compostos mais apolares. Posteriormente, iniciou-se o processo de eluição com gradiente crescente de acetonitrila. Para ambas as frações, os compostos foram eluídos inicialmente com 20% acetonitrila e 80% de água até a quarta amostra que foi eluída apenas com acetonitrila. Após a eluição, a partir da amostra de folhas foram obtidas as amostras F20, F40, F60 e F100 (o número corresponde à porcentagem de acetonitrila) e para galho: G20, G40, G60 e G100. Todas as amostras foram secas no SpeedVac e ressuspensas com 100 µL de água para serem utilizadas no teste *in vitro*.

### ***Extração em fase sólida (SPE – fase normal)***

Amostras da folha e do galho de *Ficus carica* referentes aos compostos que não foram retidos na SPE-fase reversa da fração aquosa, foram submetidos à extração em fase normal utilizando cartuchos de sílica. Para o preparo do cartucho, foi necessário equilibra-lo três vezes com 500 µL de acetonitrila. Em seguida, as frações a serem contidas na coluna foram solubilizadas em acetonitrila + metanol 40% (v/v) na concentração de 100 mg/mL e aplicadas três vezes para retenção de compostos mais polares. Logo após, foi efetuada uma lavagem com acetonitrila para eliminar compostos que interagiram parcialmente com a fase estacionária. Posteriormente, iniciou-se o processo de eluição com gradiente crescente de água. Os compostos foram eluídos inicialmente com 100% acetonitrila e 0% de água até a sexta amostra que foi eluída apenas com água. Após a eluição foram obtidas as seguintes amostras para folha: F100, F80, F60, F40, F20 e F0 (o número corresponde à porcentagem de acetonitrila) e para galho: G100, G80, G60, G40, G20 e GF0. Todas as amostras foram

secas no SpeedVac e ressuspensas com 100 µL de água para serem utilizadas no teste *in vitro* com os nematoides.

### ***Obtenção de juvenis do segundo estágio de Meloidogyne javanica***

Ovos de *M. javanica* foram obtidos no Laboratório de Controle Biológico de Fitonematoides (BIOAGRO/UFV) e colocados a uma proporção de aproximadamente 5000 ovos para cada 15 ml de água. Em seguida foram inoculados nas raízes de plantas de tomate (*Solanum lycopersum*) variedade Santa Cruz “Kada” com 20 dias de idade. As plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação por 60 dias e os ovos produzidos foram extraídos das raízes de acordo com o método de extração pela flotação centrífuga em solução de sacarose (2,5%) conforme Jenkins (1964). Para a obtenção dos J2, uma solução contendo ovos foi cuidadosamente vertida em um sistema de papel filtro ajustado ao fundo de uma peneira sobre uma bacia com água filtrada (câmara de eclosão). A câmara de eclosão foi então mantida em estufa à temperatura controlada de 25°C por 48h horas, sendo a água filtrada substituída nas primeiras 6-8 horas. Os juvenis que migraram para a água filtrada foram retidos em peneira de 500 mesh e recolhidos em água destilada autoclavada com o auxílio de uma pisseta.

### ***Teste in vitro***

Os efeitos das amostras de *Ficus carica* resultantes das extrações em SPE normal e SPE reversa sobre a eclosão de ovos e a motilidade de juvenis foram determinados *in vitro* utilizando-se placas de Elisa de 96 poços individuais. Para cada poço foram adicionados 100µL de água destilada aultoclavada contendo 30 J2. Em seguida foram adicionados 100 µL de cada solução teste contendo as amostras a serem avaliadas, bem como os controles para cada tratamento. As placas foram envolvidas em filme PVC e papel alumínio e mantidas em incubadora com controle de temperatura a 25°C pelos períodos de avaliação de 24, 48 e 72 horas após a montagem dos experimentos. Foram utilizadas 4 repetições para cada tratamento e o delineamento experimental considerado para fins de análises estatística dos dados foi o inteiramente casualizado. As contagens dos nematoides foram realizadas em microscópio óptico invertido em aumento de 40X e de modo acumulativo nos períodos de avaliação considerados anteriormente. Em 24 e 48 horas os nematoides foram classificados em duas categorias distintas: móveis (M) e imóveis (I). E em 72 horas foram classificados como móveis (M) e mortos (MT). Para isto, o protocolo para a distinção entre J2 imóveis e mortos foi adotado conforme o descrito por (Xiang & Lawrence, 2016). Estes autores

comprovaram que a adição de 1µl de NaOH, a pH=10, a 100 µl de solução causa significativo aumento nos movimentos de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*, sendo possível a distinção entre vivos e mortos pela morfologia do corpo. As porcentagens de J2 (mortos ou imóveis) observados em cada tratamento, foram determinadas pela seguinte

$$\text{equação: \% de J2} = \frac{J2 * 100}{J2M + J2}$$

## RESULTADOS

### *Prospecção fitoquímica*

Os resultados do estudo fitoquímico do extrato bruto e das frações obtidas por partição líquido-líquido de *Ficus carica* estão dispostos na Tabela 4 e Tabela 5. No extrato bruto, detectou-se a presença de antraquinonas, cumarinas, esteroides, triterpenos, flavonoides, óleos essenciais, saponinas e taninos, tanto a folha quanto o galho apresentaram similaridade entre os compostos. Já a fração aquosa e acetato de etila que foram consideradas biologicamente ativas conforme os estudos de (Alves et al. 2020), apresentaram algumas diferenças entre si. Na fração de acetato de etila foi verificada a presença das classes vistas anteriormente para o extrato bruto, já na fração aquosa da folha e do galho foram identificadas as classes de triterpenos, esteroides e flavonoides. Além disso, ressaltamos que através do método de investigação adotado (CCD) não foram encontrados compostos pertencentes às classes dos alcaloides.

**Tabela 4** - Prospecção fitoquímica dos extratos etanólicos fracionados de *Ficus carica*.

Metabólitos secundários	Parte da planta*	
	F	G
Alcalóides	-	-
Antraquinonas	+	+
Cumarinas	+	+
Esteroides/triterpenos	+	+
Flavonoides	+	+
Óleos essenciais	+	+
Saponinas	+	+
Taninos	+	+

\* Folha (F); Galho (G)

**Tabela 5** - Prospecção fitoquímica das frações obtidas por partição líquido-líquido da folha e do galho de *Ficus carica*.

Metabólitos secundários	Parte da planta*	Fração				
		Hexano	Diclorometano	Acetato de etila	Butanol	Aquosa
Alcalóides	F	-	-	-	-	-
	G	-	-	-	-	-
Antraquinonas	F	+	+	+	+	+
	G	+	+	+	+	-
Cumarinas	F	+	+	+	-	-
	G	+	+	+	-	-
Esteroides/triterpenos	F	+	+	+	+	+
	G	+	+	+	+	+
Flavonoides	F	+	+	+	+	+
	G	+	+	+	+	+
Óleos essenciais	F	+	+	+	+	-
	G	+	+	+	+	-
Saponinas	F	+	+	+	+	-
	G	+	+	+	+	-
Taninos	F	-	-	+	+	-
	G	-	-	+	+	-

\* Folha (F); Galho (G)

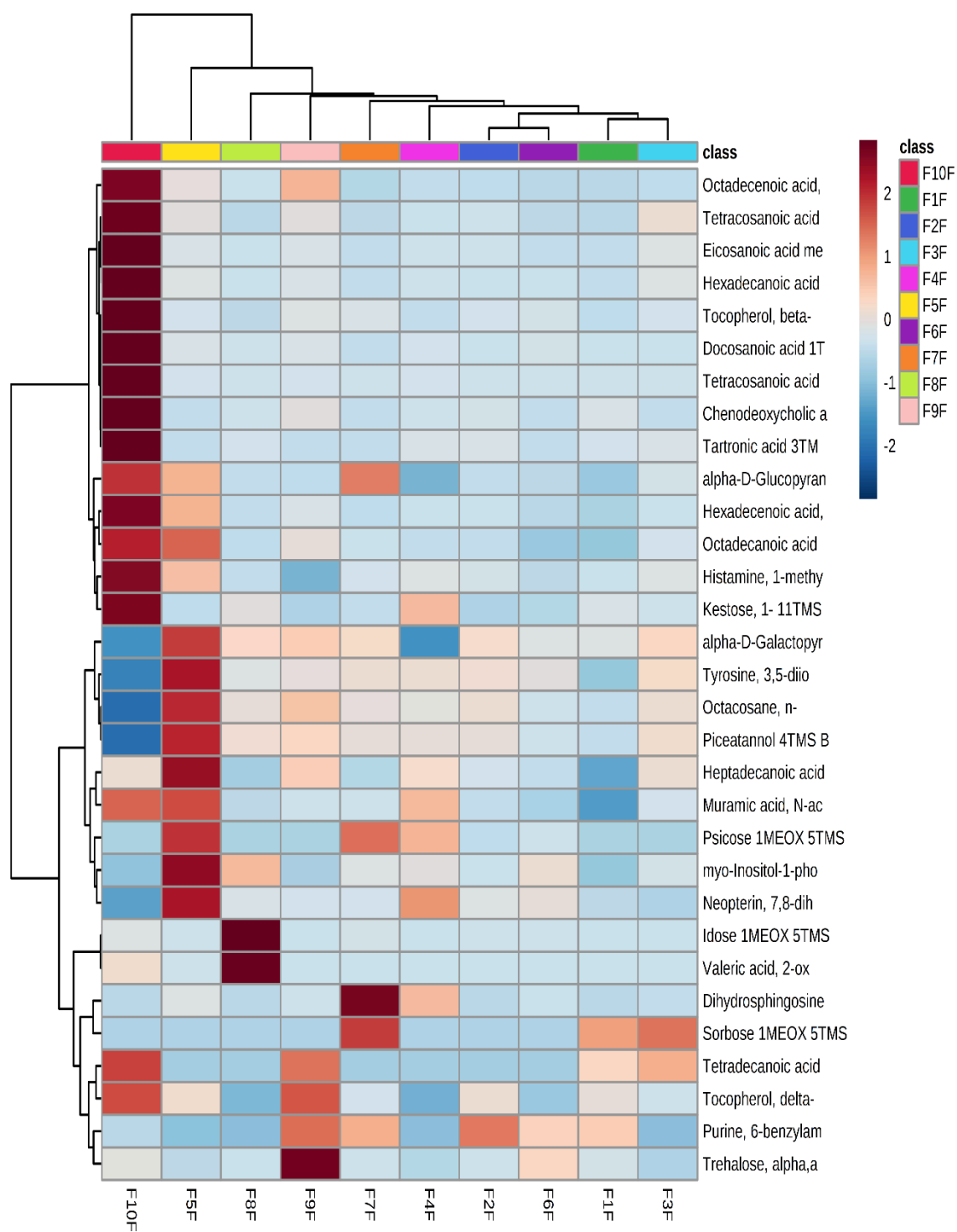
### ***Perfil metabólico por GC-MS***

Para apresentação dos resultados do perfil metabólico das 10 espécies do género *Ficus*, o preparo de amostras ocorreu de acordo com o protocolo adotado por (Lisec et al. 2006), e submetidos a análise por GC-MS para identificação de compostos similares ou dissimilares que possam estar relacionados ao efeito inibitório de *Ficus carica* sobre os nematoides. Como resultado, foi gerado um *heatmap* (mapa de calor) dos metabólitos, utilizando o software online “Metaboanalyst” (<http://www.metaboanalyst.ca>). Neste software as intensidades de cada metabólito identificado foram utilizadas para análises de variância (ANOVA) para verificação de metabólitos presentes em alta abundância.

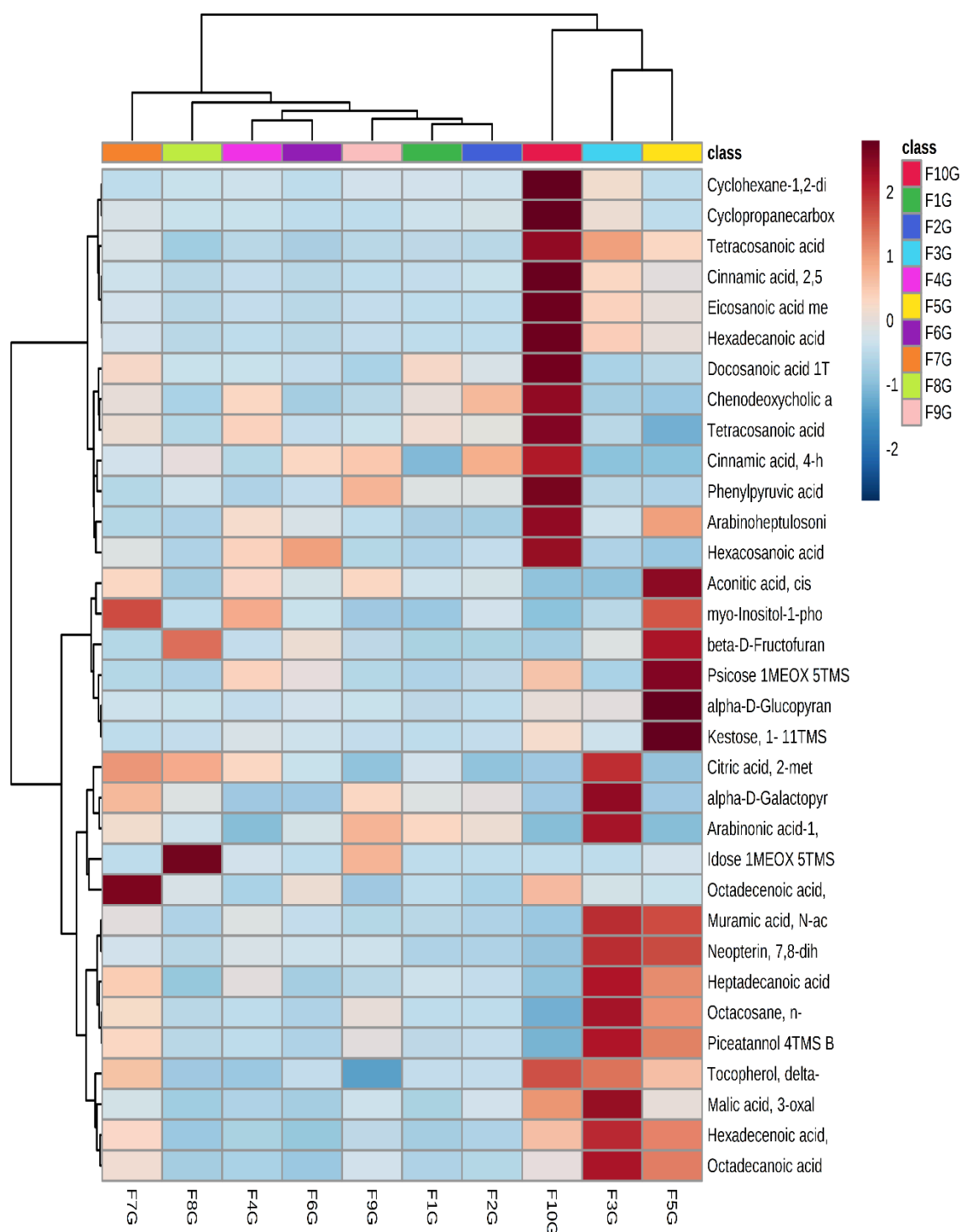
Pela análise dos *heatmaps* notamos que a distribuição dos metabólitos identificados foi bastante heterogênea entre as espécies, este comportamento também foi observado entre folha e galho dentro de uma mesma espécie. Os perfis que se destacaram pela maior abundância de metabólitos identificados foram os referentes à folha e galho de *Ficus microcarpa* (F10) e *Ficus elastica* (F5) conforme está ilustrado na Figura 1A e 1B. Em ambos os perfis foi observada a presença de ácidos graxos como o ácido tetradecanoico, eicosanoico

e palmítico, bem como a presença de delta-tocoferol. Também foram identificados monossacarídeos como a  $\alpha$ -D-glicopiranosose. Outro perfil contrastante em termos de abundância foi o do galho de *Ficus benjamina* (F3) como visto na Figura 1B, onde se detectou principalmente a presença do ácido arabinônico, ácido málico e compostos derivados do ácido cítrico. Contudo, o perfil metabólico da folha de F3 (Figura 1A), apresentou algumas dissimilaridades, sendo os ácidos graxos tetradecanoico, heptadecanóico e o monossacarídeo  $\alpha$ -D-glicopiranosose, os compostos que exibiram maior abundância. Já as espécies *Ficus adhatodifolia* (F1) e *Ficus gomelleira* (F8) foram as que apresentaram os perfis com menores abundâncias de compostos em comparação aos demais, verificando-se apenas o maior contraste do ácido valérico na folha de *Ficus gomelleira* (Figura 1A). Com relação ao perfil metabólico da espécie *Ficus carica*, observamos na folha (Figura 1A) a presença de ácidos graxos como o ácido heptadecanóico, de oligossacarídeos como 1-kestose e produtos catabólicos do trifosfato de guanósina (GTP) como a neopterina. No galho (Figura 1B), foi verificada a presença do ácido tetracosanóico, ácido hexacosanoico e compostos derivados do ácido cítrico como o ácido 2-metilcítrico.

(A)



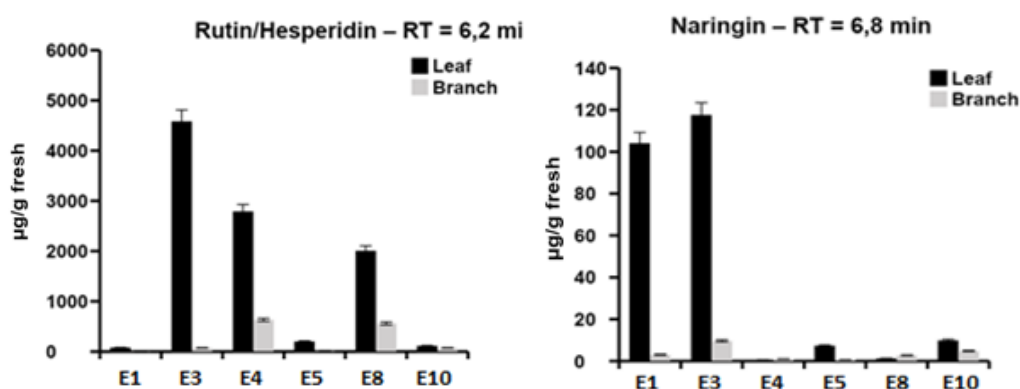
(B)

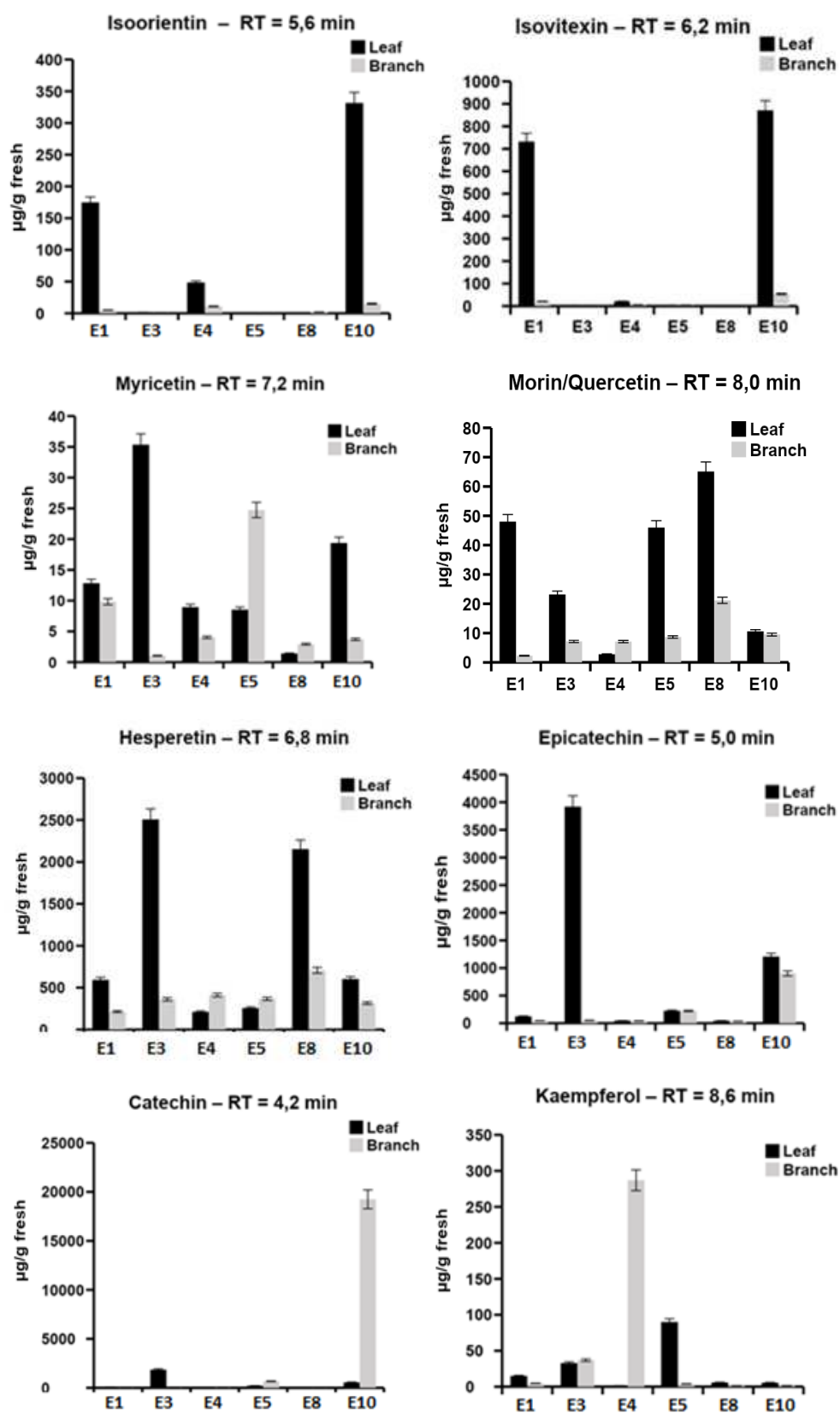


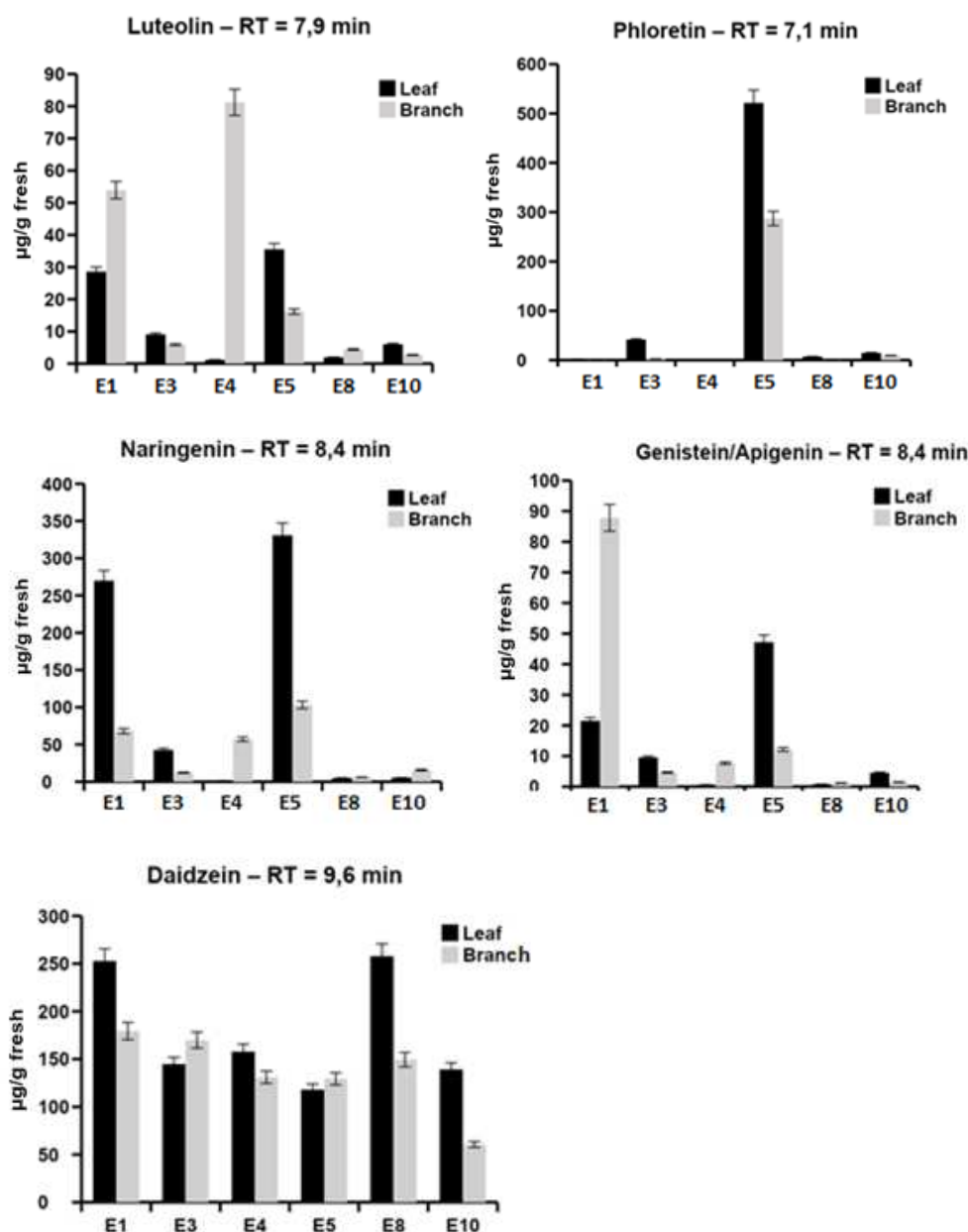
**Figura 1** – Heatmap (mapa de calor) dos metabólitos estatisticamente mais relevantes de acordo com a análise de abundância relativa dos metabólitos presentes na folha e no galho das diferentes espécies de Ficus. A cor vermelha está associada a compostos que apresentaram maior abundância e a cor azul associada aos que tiveram menor abundância.

### Perfil de flavonoides por LC-MS

Os dados gerados por LC-MS e analisados no software Skyline resultaram em valores de áreas que foram convertidos em  $\mu\text{g/g}$  (metabólito/tecido vegetal fresco) utilizando o programa Excel (Figura 2). Por meio da análise das concentrações dos flavonoides alvos em cada espécie, notamos que a distribuição das classes monitoradas foi bastante diversificada. Dentre as classes monitoradas, foi destacada a presença de rutina e hesperidina nas folhas de *Ficus benjamina* (E3), *Ficus carica* (E4) e *Ficus gomelleira* (E8). A naringina apresentou níveis mais elevados de concentração nas folhas das espécies *Ficus adhatodifolia* (E1) e *F. benjamina* (E3). O mesmo foi visto para isoorientina e isovitexina nas folhas de *F. adhatodifolia* (E1) e *Ficus microcarpa* (E10). Para miricetina, as maiores concentrações foram observadas na folha de *F. benjamina* (E3) e também no galho de *Ficus elastica* (E5). Com relação a morina e quercetina, verificou-se maior concentração na folha de *F. gomelleira* (E8) e quantidades similares nas folhas de *F. adhatodifolia* (E1) e *F. elástica* (E5). Já os flavonoides hesperetina e a epicatequina foram detectados em concentrações aproximadas na folha de *F. benjamina* (E3). Foi observada também a concentração contrastante de catequina no galho de *F. microcarpa* (E10) quando comparada com as demais espécies. O mesmo contraste foi observado no galho de *Ficus carica* (E4) referente a concentrações de kaempferol e luteolina. Concentrações superiores de floretina e naringenina foram verificadas na folha de *F. elástica* (E5), bem como concentrações superiores de genisteina e apigenina no galho de *F. adhatodifolia* (E1). Quantidades similares de daidzeina foram observadas em generalidade tanto na folha quanto no galho das seis espécies, dando-se destaque para os níveis mais acentuados nas folhas de *F. adhatodifolia* (E1) e *F. gomelleira* (E8).



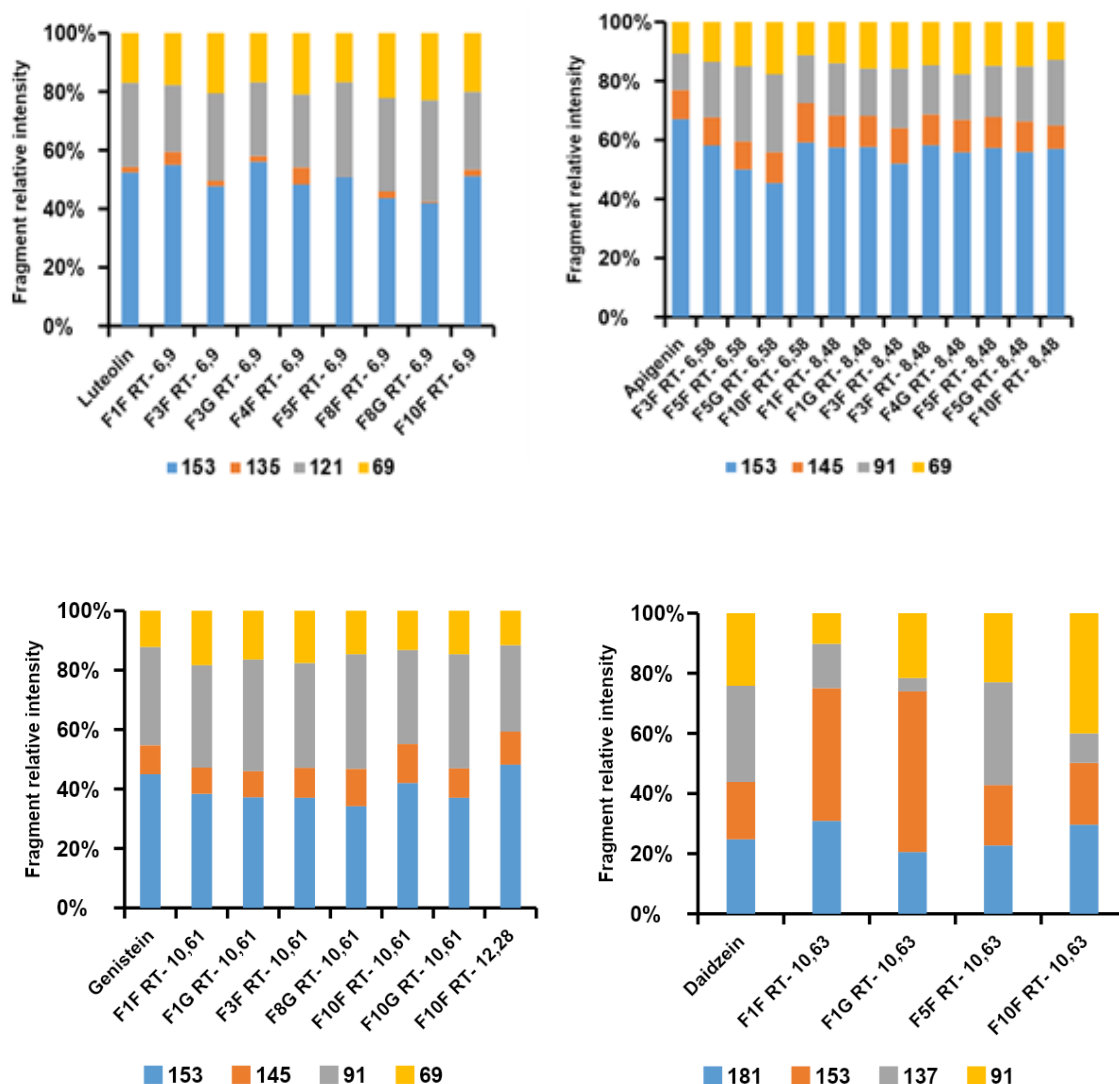




**Figura 2-** Quantificação absoluta em  $\mu\text{g/g}$  de cada flavonoide detectado pelo método alvo (target) nas folhas e nos galhos de seis espécies (E) do gênero *Ficus*.

As intensidades relativas dos fragmentos (FRI) foram medidas de acordo com a abundância dos íons, para confirmar qualitativamente a presença dos flavonoides monitorados e distinguir as agliconas que possuem a mesma massa nominal, como por exemplo, morina/quercetina e genisteína/apigenina (Figura 3). Para isso, foi necessário injetar no sistema LC/MS os padrões para cada aglicona pertencentes às classes flavonoides (como dadzeína, apigenina, genisteína etc.). Dessa forma, apesar de genisteína/apigenina apresentarem a mesma massa nominal de 271 m/z e o mesmo tempo de retenção (RT), as % de FRI dos íons fragmentos (153, 145, 91 e 69) permitem a



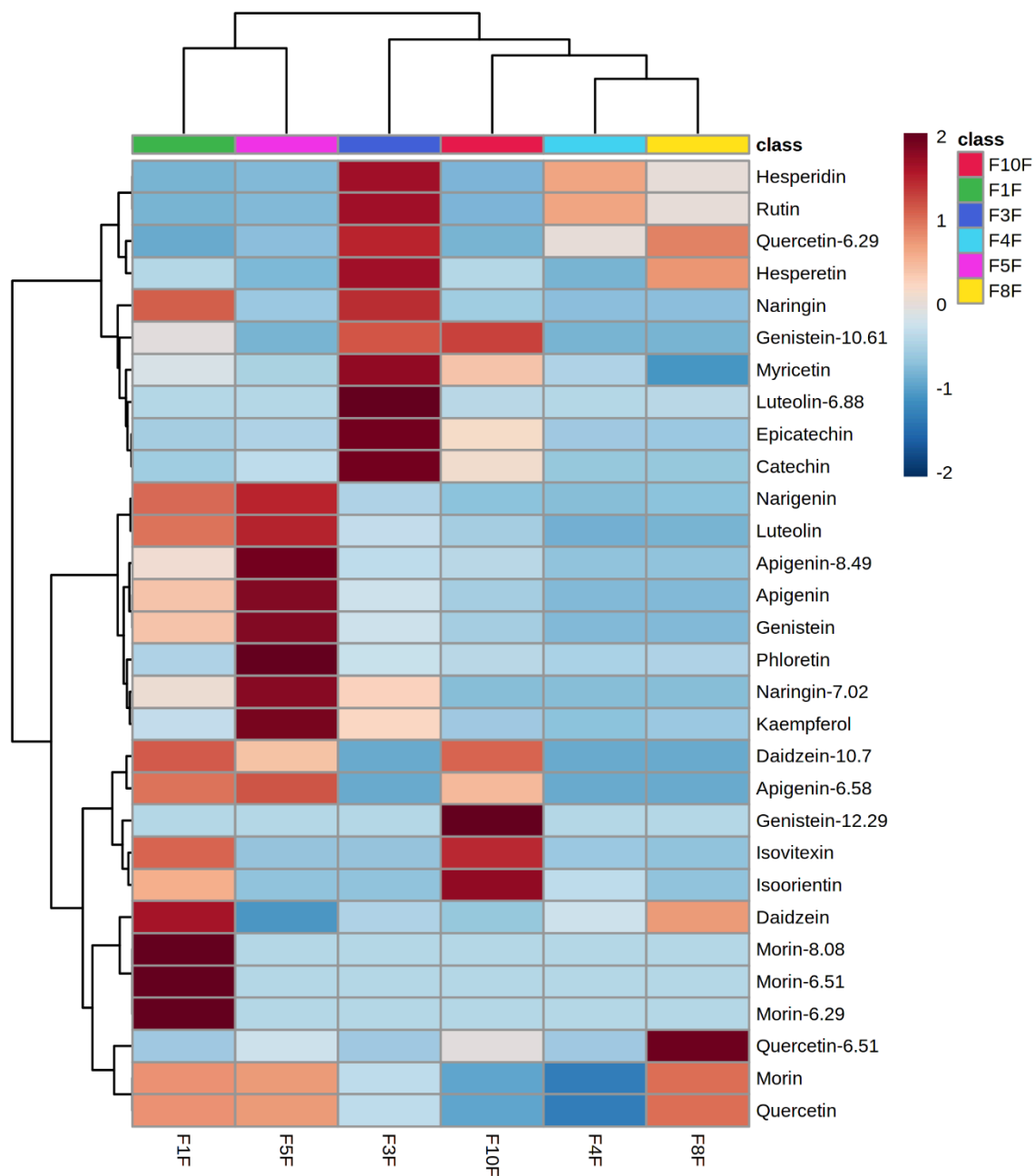


**Figura 3** – Detecção referente as intensidades relativas dos fragmentos (% FRI) para confirmar qualitativamente a presença dos flavonoides monitorados e distinguir agliconas que possuem a mesma massa nominal ( $m/z$ ) e mesmo tempo de retenção (RT) em diferentes espécies de *Ficus* spp.

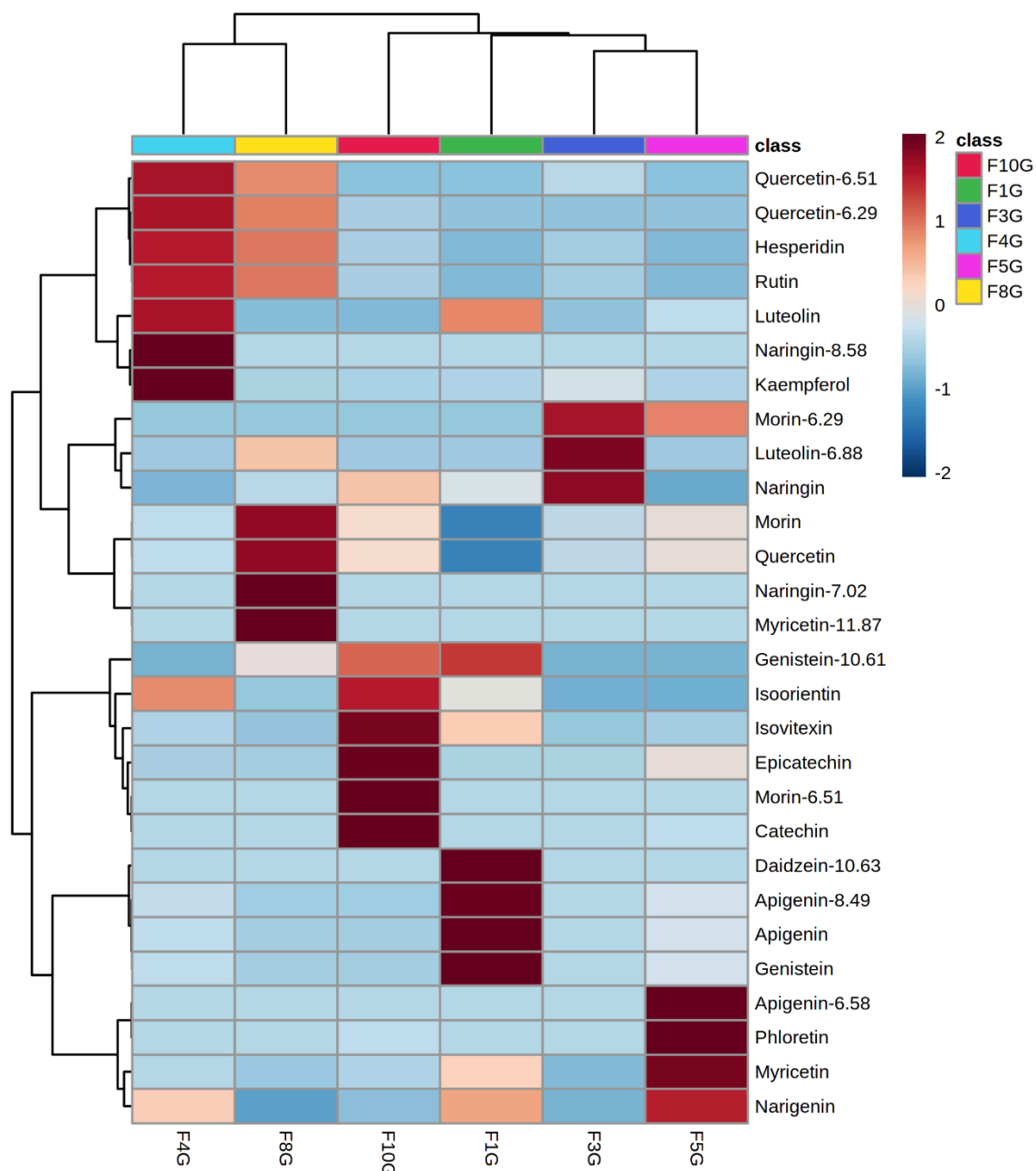
Os flavonoides e glicoconjugados identificados, que apresentaram picos mais intensos nas análises pelo pacote Skyline, para os extratos de folhas e galhos das seis espécies, foram também utilizados para análises de agrupamento. Foi utilizado o *heatmap* para verificação das classes presentes em alta abundância (Figura 4A e 4B) e também a análise dos componentes principais (PCA) para visualização geral das similaridades dos perfis (Figura 5A e 5B). Essas análises foram realizadas utilizando a plataforma MetaboAnalyst. Tanto para galho quanto para folhas, a espécie *F. carica* (F4) apresentou perfis diferenciados em relação as demais espécies conforme vistas na Figura 4A e 4B,

com maior proximidade para a espécie *F. gomelleira* (F8) em se tratando das amostras de folhas (Figura 5A) e galhos principalmente (Figura 5B).

(A)

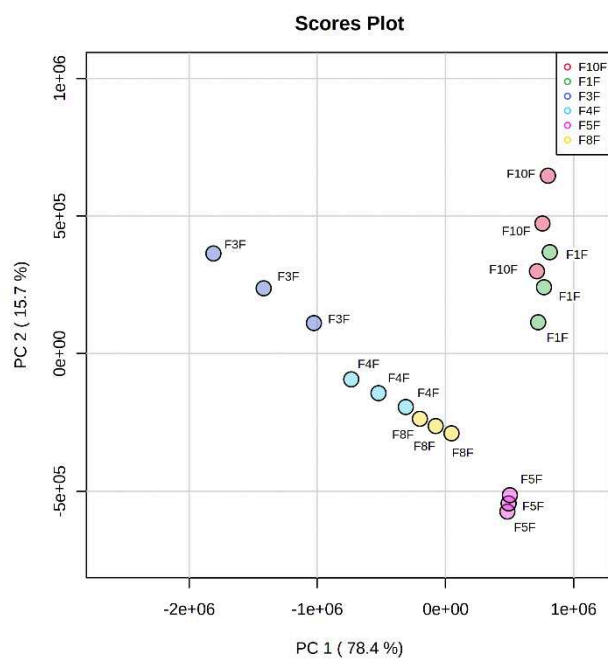


(B)

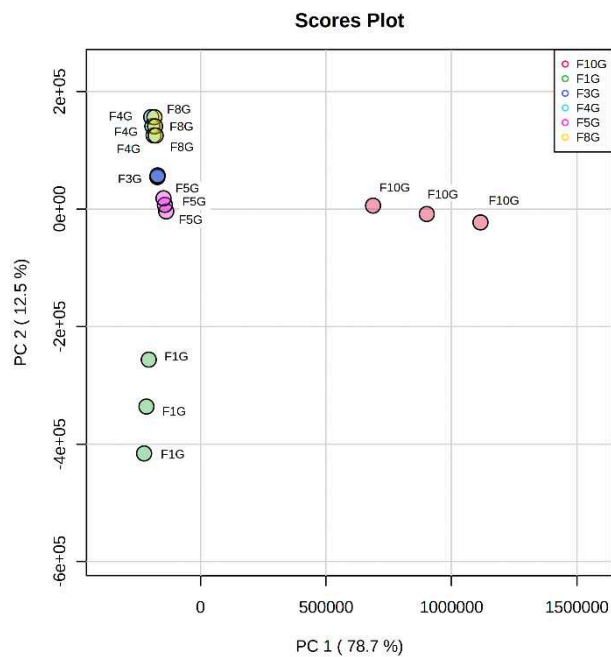


**Figura 4 - Heatmap** dos flavonoides mais abundantes estatisticamente presentes na folha (A) e no galho (B) de *Ficus* spp. A cor vermelha está associada aos compostos que apresentaram maior abundância e a cor azul associada aos que tiveram menor abundância.

(A)



(B)



**Figura 5** - Análise de agrupamento por componentes principais (PCA) dos flavonoides identificados para espécies de *Ficus* por LC-MS. (A) Scores plot amostras de extratos da folha (B) Score plots amostras de extratos de galhos.

Por último, os flavonoides monitorados nas seis espécies *Ficus* foram caracterizados a partir da diferença entre a massa total da molécula glicoconjugada e a massa do núcleo da aglicona. Utilizando os valores obtidos de m/z para cada classe, foi possível pesquisar no banco de dados de espectros de massa Mass Bank (<http://www.massbank.jp>) e outras fontes na literatura, os flavonoides que compartilham a mesma massa observada de acordo com a varredura dos íons precursores. Com relação aos extratos provenientes das folhas, os flavonoides identificados foram: Daidzein diacetate, Apigenin 8-C-glucoside, Apigenin-7-O-glucoside, Luteolin 7-O-glucoside, Luteolin O-glucoside, isoquercetina e Rutina (Tabela 6). Nestes extratos, a presença de Rutina foi detectada em todas as espécies. Nos extratos resultantes dos galhos, detectou-se também a presença de Daidzein diacetate, Luteolin O-glucoside, Isoquercetina e Rutina (Tabela 7).

**Tabela 6** - Flavonoides identificados pelo método de varredura dos íons precursores a partir do extrato bruto etanólico das folhas de *Ficus* spp.

Flavonoid Class	Precursor (m/z)	RT (min)	Conjugate (m/z)	Sugar Moiety (mass)	<i>Ficus</i> spp						FRI% Match	Mass Bank Database/Literature
					F1	F3	F4	F5	F8	F10		
Daidzein	255	10,63	338,3	84,3	+	-	-	-	-	+	+/-	Daidzein diacetate
	255	10,63	353,2	98,2	-	-	-	+	-	-	+/-	NH
	271	6,58	432,4	161,4	-	+	-	-	-	-	+/-	Apigenin 8-C-Glucoside
Genistein-Apigenin	271	6,58	433,0	162,0	-	-	-	+	-	+	+/-	Apigenin-7-O-glucoside
	271	10,61	338,9	67,9	+	-	-	-	-	-	+/-	NH
	271	10,61	339,3	68,3	-	+	-	-	-	+	+/-	NH
	271	12,28	407,5	136,5	-	-	-	-	-	+	+/-	NH
Naringin	273	7,03	369,3	96,3	+	-	-	-	-	-	+/-	NH
	273	7,03	425,2	152,2	-	+	-	-	-	-	+/-	NH
	273	7,03	435,5	162,5	-	-	-	+	-	-	+/-	NH
Luteolin	273	7,03	819,5	546,5	-	-	-	-	-	+	+/-	NH
	287	6,9	448,4	161,4	+	-	-	-	-	-	+/-	Luteolin 7-O-glucoside
	287	6,9	449,0	162,0	-	+	+	+	+	-	+/-	Luteolin O-glucoside
Morin-Quercetin	287	6,9	548,6	261,6	-	-	-	-	-	+	+/-	NH
	303	6,28	611,2	308,2	+	+	+	+	+	+	+/-	Rutina
	303	6,51	465,0	162,0	+	-	-	+	+	+	+/-	Isoquercetina

\* NH – Não identificado na literatura

**Tabela 7** - Flavonoides identificados pelo método de varredura dos íons precursores a partir do extrato bruto etanólico dos galhos de *Ficus* spp.

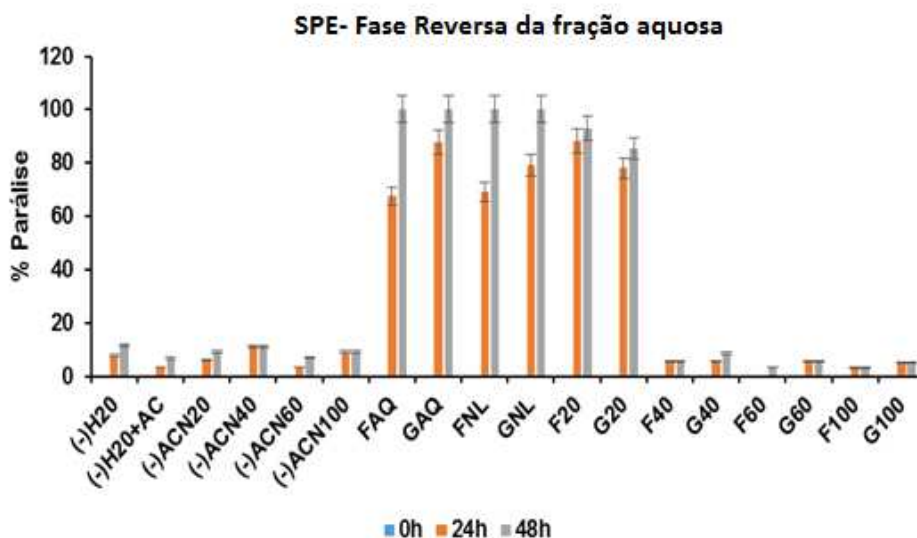
Flavonoid Class	Precursor (m/z)	RT (min)	Conjugate (m/z)	Sugar Moiety (mass)	<i>Ficus</i> spp						FRI% Match	Mass Bank Database/Literature
					G1	G3	G4	G5	G8	G10		
Daidzein	255	10,63	338,3	83,3	+	-	-	-	-	-	+/-	Daidzein diacetate
	271	6,58	434,9	163,9	-	-	-	+	-	-	+/-	NH
Genistein-Apigenin	271	10,61	339,1	68,1	+	-	-	-	-	-	+/-	NH
	271	10,61	338,7	67,7	-	-	-	-	+	-	+/-	NH
Naringin	273	7,03	511,5	238,5	-	-	-	-	+	-	+/-	NH
	273	8,58	330,8	57,8	-	-	+	-	-	-	+/-	NH
Myricetin	275	11,85	335,2	60,2	-	-	-	-	+	-	+/-	NH
Luteolin	287	6,9	449,0	162,0	-	+	-	-	-	-	+/-	Luteolin O-glucoside
	287	6,9	364,9	77,9	-	-	-	-	+	-	+/-	NH
Morin-Quercetin	303	6,28	611,2	308,2	-	+	+	+	+	+	+/-	Rutin
	303	6,51	465,0	162,0	-	+	+	-	+	+	+/-	Isoquercetin

\* NH – Não identificado na literatura

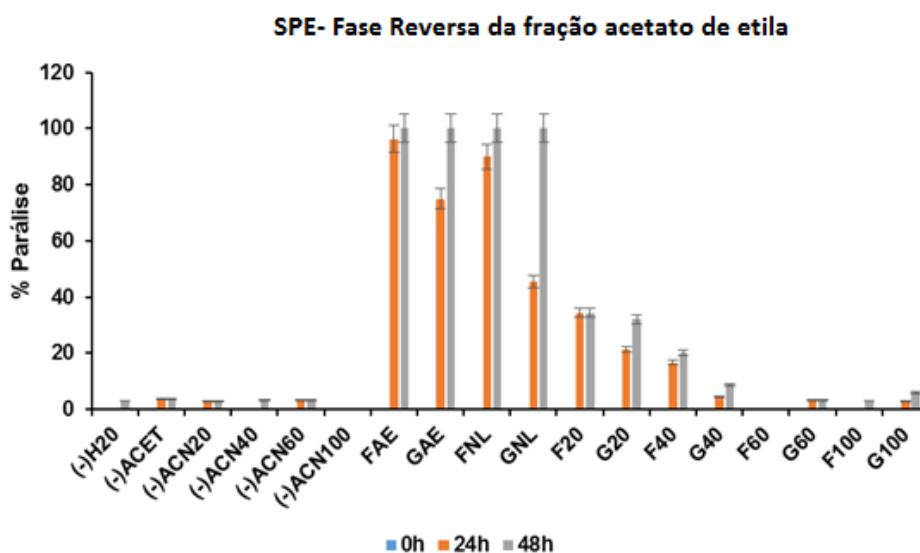
#### ***Efeito das subfrações dos extratos de F. carica sobre a motilidade de J2 de M. javanica***

O efeito fitotóxico das subfrações foi avaliado em placas para os juvenis J2 (Figura 6). Com relação aos percentuais de J2 imóveis nos tratamentos referentes a SPE-fase reversa da fração aquosa, notamos que após 24 horas, dentre os tratamentos que exibiram os maiores percentuais de paralise estão F20 e G20, os quais exibiram respectivamente 88,37% e 78,04% em relação aos controles H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O + Ácido acético 0,02% (H<sub>2</sub>O + AC) e ACN 20, 40, 60 e 100 (Figura 6A). Os percentuais de paralise das subfrações também foram comparados com os tratamentos referentes à fração aquosa obtida por partição líquido-líquido da folha (FAQ) e do galho (GAQ) e aos compostos não ligados na coluna no momento da eluição tanto para folha (FNL) quanto para galho (GNL). Após 48 horas, verificamos que os percentuais de paralise de F20 (93,02%) e G20 (85,36%) foram superiores em relação aos controles negativos e inferiores aos tratamentos referentes ao extrato aquoso e compostos não ligados que apresentaram J2 totalmente paralisados. Segundo os percentuais de J2 imóveis nos tratamentos referentes a SPE-fase reversa da fração acetato de etila (Figura 6B), observamos que nos dois tempos de avaliação os tratamentos não exibiram valores significativos de paralise em relação aos controles H<sub>2</sub>O, Acetato de etila (ACET) e ACN 20, 40, 60 e 100, sendo os maiores percentuais verificados em F20 (34,37%) após 24 horas e em G20 (32,14%) após 48 horas.

(A)

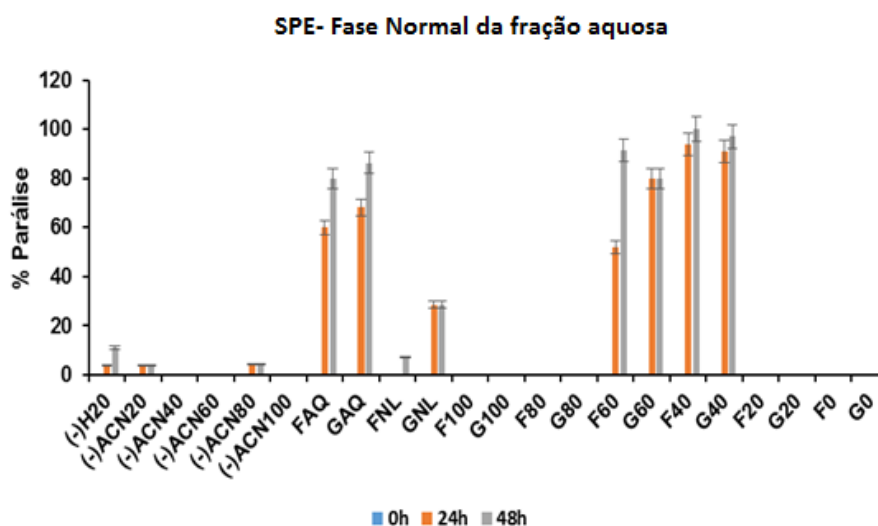


(B)



**Figura 6** - Dados percentuais de J2 imóveis de *M. javanica* após a imersão nos tratamentos resultantes da SPE- fase reversa (A) da fração aquosa e da fração acetato de etila (B) de *F. carica*. Controles negativos: (-) H<sub>2</sub>O: água; (-) H<sub>2</sub>O + AC: água e ácido acético 0,02%; (-) ACET: acetato de etila; (-); ACN20: acetonitrila 20%; (-) ACN40: acetonitrila 40%; (-) ACN 60: acetonitrila 60%; (-) ACN80: acetonitrila 80%; (-) ACN100: acetonitrila 100. Os percentuais de paralise das subfrações também foram comparados com os tratamentos referentes à fração aquosa obtida por partição líquido-líquido da folha (FAQ) e do galho (GAQ), bem como à fração acetato de etila da folha (FAE) e do galho (GAE). Percentuais de compostos não ligados na coluna no momento da eluição tanto para folha (FNL) quanto para galho (GNL) também foram analisados.

Dados percentuais de J2 imóveis após a imersão nos tratamentos resultantes da SPE- fase normal dos compostos não retidos na SPE-fase reversa da fração aquosa, mostraram que após 24 horas na presença de F60 e F40, bem como G60 e G40, os juvenis apresentaram mais de 50% na redução da capacidade de locomoção. Em 48 horas, foram observados valores de J2 totalmente paralisados em G40, enquanto que os maiores percentuais de paralise verificados para os controles negativos H<sub>2</sub>O e ACN 20, 40, 60, 80 e 100, foram de 4,16% e 11,11% (Figura 6C). Ressaltamos que de todos os tratamentos, este foi o único que apresentou percentual de paralise superior ao extrato aquoso da folha (FAQ) e do galho (GAQ) que não foram submetidos a SPE-fase normal. Esses valores também foram comparados com os tratamentos referentes aos compostos não ligados na coluna no momento da eluição tanto para folha (FNL) quanto para galho (GNL), onde o percentual de paralise tanto em 24 e 48 horas, foi considerado não significativo (inferior a 50%).



**Figura 7** - Dados percentuais de J2 imóveis de *M. javanica* após a imersão nos tratamentos resultantes da SPE- fase normal dos compostos não retidos na SPE-fase reversa da fração aquosa de *F. carica*. Controles negativos: (-) H<sub>2</sub>O: água; (-) H<sub>2</sub>O + AC: água e ácido acético 0,02%; (-) ACN20: acetoneitrila 20%; (-) ACN40: acetoneitrila 40%; (-) ACN 60: acetoneitrila 60%; (-) ACN80: acetoneitrila 80%; (-) ACN100: acetoneitrila 100. Os percentuais de paralise das subfrações também foram comparados com os tratamentos referentes à fração aquosa obtida por partição líquido-líquido da folha (FAQ) e do galho (GAQ) e aos compostos não ligados na coluna no momento da eluição tanto para folha (FNL) quanto para galho (GNL).

### *Efeito nematocida das frações dos extratos de F. carica sobre J2 de M. javanica*

Valores significativos de mortalidade de J2 em solução foram considerados após a adição de 1µl de NaOH em 72 horas. Em ambos tratamentos referentes a SPE-fase reversa (Figura 7A) e SPE-fase normal (Figura 7C) de *Ficus carica*, observou-se maior percentual de mortalidade em F40 (100%) para SPE-fase normal e em F20 (93,02%) para SPE-fase reversa com relação aos controles e aos extratos aquosos que não foram submetidos a SPE. Segundo os percentuais de J2 mortos nos tratamentos referentes a SPE-fase reversa da fração acetato de etila (Figura 7B), observamos que após 72 horas os tratamentos não exibiram valores significativos de mortalidade em relação aos controles H<sub>2</sub>O, Acetato de etila (ACET) e ACN 20, 40, 60 e 100, sendo os maiores percentuais verificados em F20 (31,25%) e em G20 (21,42%).

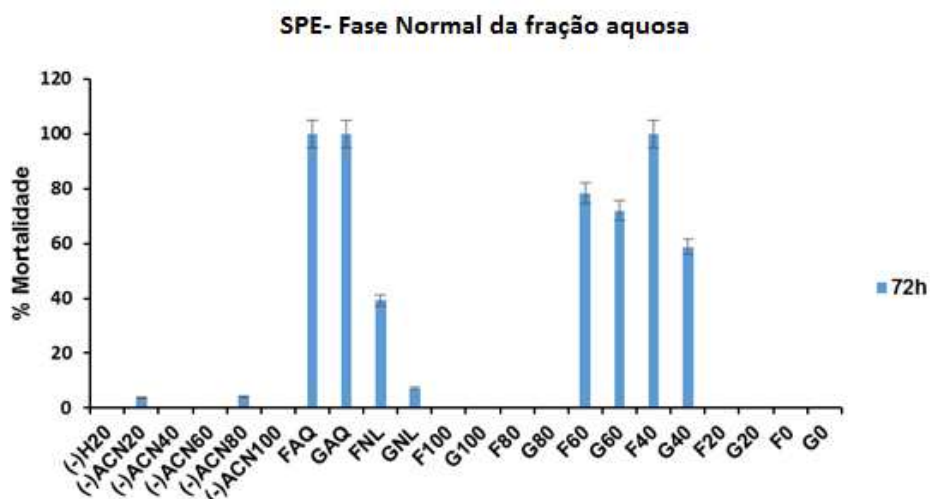
(A)



(B)



(C)



**Figura 8** - Dados percentuais de J2 mortos de *M. javanica* após a imersão nos tratamentos resultantes da SPE- fase reversa (A) da fração aquosa; da fração acetato de etila (B); e da SPE- fase normal dos compostos não retidos na SPE-fase reversa da fração aquosa de *F. carica* (C). Controles negativos: (-) H<sub>2</sub>O: água; (-) H<sub>2</sub>O + AC: água e ácido acético 0,02%; (-) ACET: acetato de etila; (-); ACN20: acetonitrila 20%; (-) ACN40: acetonitrila 40%; (-) ACN 60: cetonitrila 60%; (-) ACN80: acetonitrila 80%; (-) ACN100: acetonitrila 100. Os percentuais de mortalidade das subfrações também foram comparados com os tratamentos referentes à fração aquosa obtida por partição líquido-líquido da folha (FAQ) e do galho (GAQ), bem como à fração acetato de etila da folha (FAE) e do galho (GAE). Percentuais de compostos não ligados na coluna no momento da eluição tanto para folha (FNL) quanto para galho (GNL) também foram analisados.

## DISCUSSÃO

*Ficus*, um gênero da família das plantas Moraceae, inclui cerca de 850 espécies. A maioria das espécies de *Ficus* é usada como fonte de nutrição para os seres humanos. As raízes, raízes aéreas, caule, casca, folhas, látex, frutas e polpa das plantas de *Ficus* são medicinalmente importantes devido à presença de uma variedade de compostos fitoquímicos bioativos (Nawaz et al. 2019). As plantas das espécies de *Ficus* são bem conhecidas no campo da medicina tradicional, sendo uma rica fonte de ácido fenólico e flavonoides, o que as torna capazes de proteger contra distúrbios do estresse oxidativo. Foi relatado que extrato dessas plantas é eficaz no tratamento de diabetes, dor de estômago, estacas, úlcera, disenteria, inflamação, estresse oxidativo e câncer, além de

suas atividades anticancerígenas, anti-inflamatórias e antidiabéticas (Nawaz et al. 2019). Outra aplicação importante destas plantas tem sido relacionada ao seu efeito antimicrobiano e citotóxico para o controle de nematoides, especialmente distado para a *Ficus carica* (Alves et al. 2020). Dessa forma, neste estudo tem sido avaliado o efeito dos extratos para inibição de nematoides de interesse agrícola

Os perfis fitoquímicos qualitativos das amostras de folhas e galhos de *Ficus carica* revelaram a presença de diferentes classes de metabólitos secundários. As frações aquosas e acetato de etila, consideradas biologicamente ativas conforme os estudos de Alves et al. (2020), ilustraram a distribuição de antraquinonas, cumarinas, esteroides, triterpenos, flavonoides, óleos essenciais, saponinas e taninos. Na literatura, os metabólitos mais associados a ação antagonista sobre fitonematoides são os alcaloides, cumarinas, terpenos e flavonoides (Sharapov, 2015), além de ácidos orgânicos (Seo & Kim, 2014; Fleming et al. 2017; Alves et al. 2020). Dentre estes compostos, as cumarinas são as mais relacionadas à ação nematicida em *F. carica* e segundo Liu et al. (2011), o psoraleno que é um composto pertencente a esta classe em *F. carica*, mostrou-se altamente ativo sobre a mortalidade e a inibição da eclosão de ovos de *Bursaphelencus*. Entretanto, nossos perfis fitoquímicos, das subfrações aquosas apresentando atividade nematicida, indicaram não serem enriquecidas para a presença de cumarinas, indicando a presença de compostos mais polares com agentes ativos na paralise e morte dos juvenis. Por outro, lado as subfrações de acetato de etila, que apresentaram atividade nematicida inferiores às subfrações aquosas, indicaram a presença de cumarinas no perfil fitoquímico.

Além da atividade nematicida de moléculas da classe das cumarinas, já foi relatado na literatura que alguns compostos da classe dos flavonoides se mostraram tóxicos para os nematoides. Em Chin et al. (2018) foi observado que os flavonóis kaempferol, quercetina e miricetina repeliram e retardaram os juvenis de *Meloidogyne incognita* em concentrações micromolares. Em outro estudo, Atolani et al. (2014) demonstraram que a isovitexina foi eficaz na inibição da eclosão de ovos de *M. incognita*. Interessantemente, através da análise do perfil de flavonoides das espécies *Ficus* neste estudo, observou-se o contraste nas concentrações de kaempferol no galho de *F. carica* em comparação a outras espécies. Ressaltamos que o extrato do galho de *F. carica* foi o que apresentou nível mais elevado em relação à disponibilidade de substâncias nematicidas no estudo feito por Alves et al. (2020).

Com relação aos flavonoides caracterizados neste estudo que foram Daidzein diacetate, Apigenin 8-C-glucoside, Apigenin-7-O-glucoside, Luteolin 7-O-glucoside, Luteolin O-glucoside, Isoquercetina e Rutina. Dois deles, já foram relatados na literatura por demonstrarem efeito nematicida. Conforme visto em Bano et al. (2020), tratamentos contendo 1 mg/ml de Apigenin-7-O-glucoside e a Rutina exibiram percentuais de 100 % na mortalidade de *M. incognita* após 24 e 48 horas. Salientamos que neste estudo, a Rutina foi identificada em todas as espécies *Ficus* monitoradas, especialmente na folha e no galho de *F. carica*. Em adição, as frações mais polares eluidas obtidas por partição fase sólida (SPE) apresentaram as maiores atividades, entretanto, não foram enriquecidas para flavonóides. Uma alternativa seria a presença destes compostos fenólicos nas frações de acetato de etila, flavonoides glicoconjugados também apresentem boa solubilidade em solveste aquosos, possivelmente eluidos nas subfrações SPE-C18 20% ACN.

Nos perfis de GC-MS obtidos, notou-se que a distribuição dos metabólitos identificados foi bastante heterogênea entre as espécies; esse comportamento também foi observado entre folha e galho dentro de uma mesma espécie. Pela análise dos heatmaps, observamos que os metabólitos que se destacaram pela maior abundância foram ácidos graxos e carboidratos constituintes da parede celular vegetal como o ácido hexacosanoico e a  $\alpha$ -D-glicopiranosose. Neste caso, as comparações entre as abundâncias desses metabólitos identificados presentes nos perfis das seis espécies não sugeriram uma relação direta entre estes e as atividades inibitórias observadas nos ensaios *in vitro*.

Resultados percentuais de J2 imóveis, sob diferentes períodos de avaliação, revelaram que a ação sobre a motilidade de J2 de *M. javanica* na subfração (G40), resultantes dos compostos que não foram retidos na SPE-fase reversa da fração aquosa dos galhos de *F. carica*, foi observada desde as primeiras 24 horas de contato, visto que foram observados valores de J2 totalmente paralisados após 48 horas. Dentre os demais tratamentos, alguns já apresentaram atividade após 24 horas, mas a maioria mostrou maior efetividade apenas após 48 horas. Segundo Ntalii et al. (2016), a habilidade de penetrar a raiz de um hospedeiro é determinante para a sobrevivência de nematoides do gênero *Meloidogyne*. Portanto, a motilidade é um comportamento físico chave para a garantia do ciclo parasitário. Desse modo, a paralise de juvenis do segundo estágio (J2), assim como a inibição da eclosão de ovos, limitam a infecção no hospedeiro. Portanto, são bons indicativos do efeito nematotóxico de extratos de plantas.

Embora o efeito de paralise contribua no controle dos nematoides das galhas, interferindo no deslocamento do J2 até a raiz do hospedeiro, o efeito nematicida é

desejável. Em circunstâncias de reestabelecimento de condições favoráveis parte dos juvenis, sob o tratamento com substâncias tóxicas, antes considerados paralisados podem voltar aos movimentos (Julio et al. 2017). Desta forma, é importante que extratos, ou compostos purificados, tenham também atividade nematicida. Neste trabalho, os resultados mostraram que a atividade nematicida da subfração (F20), proveniente da extração em fase reversa da fração aquosa das folhas de *F. carica* foi bastante eficiente, observou-se 100% dos J2 mortos em solução após 72 horas. Nos levando a concluir que esses compostos se apresentaram fracamente apolares, pois tiveram baixa retenção no cartucho C18 e alta afinidade e retenção no cartucho de fase direta (sílica).

Deste modo, é possível inferir que os compostos presentes nas subfrações tanto da folha quanto do galho de *F. carica*, apresentaram um perfil de compostos bioativos que são altamente eficazes para a ação nematicida sobre o fitonematoide *M. javanica*. Além disso, estudos de (Alves et al. 2020) envolvendo a não toxicidade dos extratos de *F. carica* frente a células de linhagem animais demonstraram um bom indicativo para o uso desta espécie como fonte de moléculas componentes de formulações ambientalmente seguras que contribuam para o manejo sustentável de fitonematoides. Portanto, em análises futuras, serão adotadas metodologias de purificação e isolamento dos compostos putativos descritos neste trabalho, afim de verificar a atividade destas substâncias de maneira isolada sobre *M. javanica* que ainda não foram descritas na literatura.

## CONCLUSÃO

Os perfis fitoquímicos qualitativos das amostras de folhas e galhos de *Ficus carica* revelaram a presença de diferentes classes de metabólitos secundários, sendo elas antraquinonas, cumarinas, esteroides, triterpenos, flavonoides, óleos essenciais, saponinas e taninos. Com relação aos flavonoides caracterizados neste estudo, observou-se o contraste nas concentrações de kaempferol e rutina na folha e no galho de *Ficus carica* quando comparadas as demais espécies monitoradas neste estudo. De acordo com a literatura, estes compostos já foram descritos como sendo altamente eficazes para a ação nematicida sobre *Meloidogyne incognita*. Percentuais de J2 totalmente imóveis, confirmaram a eficiência da subfração-G40 resultante dos compostos que não foram retidos na SPE-fase reversa da fração aquosa dos galhos de *F. carica*, sobre a motilidade de J2 de *Meloidogyne javanica*. Também neste trabalho, foi verificada a atividade nematicida da subfração-F20, proveniente da extração em fase reversa da fração aquosa das folhas de *F. carica*. Deste modo, é possível inferir que as subfrações tanto da folha

quanto do galho de *F. carica*, contêm um perfil de compostos bioativos que potencialmente sejam utilizados em formulações ambientalmente seguras que contribuam para o manejo sustentável de fitonematoides.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves, J. R. et al. Phytochemical potential of *Ficus* species for the control of the phytonematode *Meloidogyne javanica*. *Journal of Plant Protection Research*, p. 193-206, 2020.

Atolani O, Fabiyi AO, Olatunji GA. Isovitexin from *Kigelia pinnata*, a potential eco-friendly nematicidal agente. *Tropical Agriculture*, p. 67-74, 2014.

Azad MAK, Yesmin MN, Islam MS. Effect of Botanical Extract on Pest Control in Brinjal Field. *J. Environ. Sci. Nat. Resour.* 2013; 5:173–176.

Balbino HM, Oliveira RDDDL, Leite JPV, Coelho VPDM. Sensibilidade de *Meloidogyne javanica* a extratos etanólicos de folhas de *Ficus* spp. in XLVI Congresso Brasileiro de Fitopatologia, *Tropical Plant Pathology*. 2013; 38: 707.

Bano, Samina et al. Nematicidal activity of flavonoids with structure activity relationship (SAR) studies against root knot nematode *Meloidogyne incognita*. *European journal of plant pathology*, 2020.

Carneiro, F. F. Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro: *EPSJV*, p. 624, 2015.

Castro, J. M. da C. *Meloidogyne enterolobii* e sua evolução nos cultivos brasileiros. Embrapa Semiárido-Artigo em periódico indexado, 2019.

Čepulytė, Rasa et al. Potent attractant for root-knot nematodes in exudates from seedling root tips of two host species. *Scientific reports*, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2018.

Chin, Sabrina; Behm, Carolyn A.; Mathesius, Ulrike. Functions of flavonoids in plant–nematode interactions. *Plants*, v. 7, n. 4, p. 85, 2018.

Embrapa. Visão 2030: o futuro da agricultura brasileira. – Brasília, DF : *Embrapa*, 2018

Ferraz, L. C.; Monteiro, A. R. Nematoides. Manual de Fitopatologia. Piracicaba: *Agronômica Ceres*, ed. 4, p. 277-305, 2011.

Gómez, J. D.; Vital, C. E.; Vidigal, P.M.; Barros, E.; Pontes, C. S.; Vieira, N. M.; et al. Flavonoid profiling by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC/MS). *Protocol.io*, p. 1–1, 2018.

Guerriero G, Berni R, Muñoz-Sanchez JA, et al. Production of Plant Secondary Metabolites: Examples, Tips and Suggestions for Biotechnologists. *Genes (Basel)*, v. 6, p. 309, 2018.

- Haydoc PJ, Woods SR, Groove G, Hare MC. Chemical control of nematodes. In: *Perry RN, Moens M.*eds. *Plant Nematology*. Wallingford, Cambridge: CAB International, p. 392-408, 2006.
- Jenkins WR. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter*, p. 692, 1964.
- Jones, J. T.; Haegeman, A.; Danchin, E. G.; Gaur, H. S.; Helder, J.; Jones M. G. et al., Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol*, p. 946–961, 2013.
- Julio LF, González-Coloma A, Burillo J, Diaz CE, Andrés MF. Nematicidal activity of the hydrolate byproduct from the semi industrial vapor pressure extraction of domesticated *Artemisia absinthium* against *Meloidogyne javanica*. *Crop Prot*, p. 33–37, 2017.
- Lansky, Ephraim Philip et al. *Ficus* spp.: Ethnobotany and potential as anticancer and anti-inflammatory agents. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 119, n. 2, p. 195-213, 2008.
- Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR. Gas chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants. *Nature protocols*, v. 1, p. 387-396, 2006.
- Liu, Fangfang et al. Nematicidal coumarin from *Ficus carica* L. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, v. 14, n. 1, p. 79-81, 2011.
- Mawa S, Husain K, Jantan I. *Ficus carica* L. (Moraceae): phytochemistry, traditional uses and biological activities. Evidence-Based Complement. *Altern. Med.* 2013.
- Nawaz, H., Waheed, R., & Nawaz, M. Phytochemical Composition, Antioxidant Potential, and Medicinal Significance of *Ficus*. In *Modern Fruit Industry*. IntechOpen, 2019.
- Ntalli N, Oplos C, Michailidis M. Strong synergistic activity and egg hatch inhibition by (E,E)-2,4-decadienal and (E)-2-decenal in *Meloidogyne* species. *J Pest Sci. Springer Berlin Heidelberg*, p. 565–579, 2016.
- Pignati WA, Souza e Lima FAN, Lara SS, Correa MLM, Barbosa JR; Costa Leão LH, Pignati MG. Distribuição Espacial Do Uso de Agrotóxicos No Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva*, v.10, p. 22, 2017.
- Pinheiro, J. B.; Melo, R. D. C.; Ragassi, C. Manejo de nematoides em hortaliças sob plantio direto. *Embrapa Hortaliças-Circular Técnica (INFOTECA-E)*, 2019.
- Sikora, R. A.; Fernandez, E. Nematode parasites of vegetables. *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*, v. 2, p. 319-392, 2005.
- Sharopov, F. Phytochemistry and bioactivities of selected plant species with volatile secondary metabolites. *Ruperto-Carola University of Heidelberg*, 2015.
- Tiwari, R. & Rana, C. S. Plant secondary metabolites: a review. *Int. J. Engin. Res. Gen. Sci.* 3, p.661–670, 2015.
- Xiang N, Lawrence KS. Optimization of In Vitro Techniques for Distinguishing between Live and Dead Second Stage Juveniles of Heterodera Glycines and Meloidogyne Incognita. *Plos One*, p. 1–13, 2016.

Wagner, H.; Bladt, S. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. *Springer Science & Business Media*, 1984.