

PARTE III

BIOPROSPECÇÃO E BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL

*"A natureza não faz
nada em vão"*
Aristóteles

BIOINSUMOS DE ORIGEM VEGETAL PARA USO NA AGRICULTURA

Sonia Claudia do Nascimento de Queiroz, Vera Lúcia Ferracini, Jeanne Scardini Marinho-Prado, Marcia Regina Assalin, Debora Renata Cassoli de Souza Dutra, Ana Lúcia Penteado, Claudio Martín Jonsson, Daniel Terao, Antonio Luiz Cerdeira, Wagner Bettiol, André May e Fernanda Garcia Sampaio

INTRODUÇÃO

Grande parte do sucesso atribuído às modernas práticas agrícolas é decorrente da descoberta e da adoção de substâncias químicas para o controle fitossanitário das espécies cultivadas. Assim, a elevação da produtividade, associada à “revolução verde”, não teria ocorrido sem a contribuição desses compostos sintéticos para o fornecimento abundante de alimentos de alta qualidade, principalmente em nações com maior nível de desenvolvimento tecnológico, reduzindo, assim, a preocupação constante com a distribuição de alimentos para sua população (Dayan et al., 2009).

O Brasil tem grande destaque no cenário agrícola mundial, pelo fato de ser um dos maiores produtores das commodities soja, açúcar, café, milho, entre outras, colocando-o também como um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo. Em decorrência desse processo a que o Brasil está submetido, muitas preocupações têm sido recorrentes, principalmente com relação ao potencial impacto dessas moléculas no ambiente e na saúde humana. Incluem-se entre os danos potencialmente causados: i) a poluição de águas, do solo e do ar, que transfere os resíduos químicos ao longo da cadeia produtiva; ii) redução da biodiversidade e fixadores de nitrogênio; iii) destruição da vida marinha e/ou alterações genéticas nas futuras gerações; iv) mudanças nos balanços biológicos naturais, por meio da redução de insetos benéficos e dos inimigos naturais, de abelhas e de pássaros, v) impacto negativo em organismos não alvo, incluindo os seres humanos; vi) comprometimento da sustentabilidade da vida selvagem (Stoytcheva, 2011; Benelli et al., 2017). Além disso, como agravante da situação exposta, muitos agricultores ainda utilizam esses insumos agrícolas de maneira irregular e sem treinamento adequado, potencializando os impactos advindos de sua utilização.

Em razão do risco causado pela utilização desenfreada de agrotóxicos e aos potenciais danos causados ao ecossistema, bem como pela falta de produtos alternativos no mercado, os produtores rurais vêm demandando a oferta de novos produtos e insumos de menor impacto econômico, ambiental e social.

Considerando que ainda há muito espaço para inovação nas práticas agropecuárias, a Embrapa vem, nos últimos anos, investindo em projetos de pesquisas, infraestrutura e na capacitação de equipes multidisciplinares que atuam nessa área. Nesse sentido, destaca-se uma parceria de grande importância que foi estabelecida com a Natural Products Utilization Research (NPURU-USDA-ARS), localizada no Mississippi (Estados Unidos), considerada uma unidade referência nesse tipo de estudo, onde alguns pesquisadores da Embrapa foram treinados.

Mais recentemente, uma iniciativa efetiva para enfrentamento do problema dos agrotóxicos, pela viabilização de alternativas de baixo impacto toxicológico e ecotoxicológico, foi a publicação do Decreto nº 10.375, de 26 de maio de 2020, instituído pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Mapa), o Programa Nacional de Bioinsumos e o Conselho Estratégico do Programa Nacional de Bioinsumos, cujo foco principal é aproveitar o potencial da biodiversidade brasileira para reduzir a dependência de insumos importados e ampliar a oferta de matéria-prima para o setor. De acordo com o decreto, considera-se bioinsumo o produto, o processo ou a tecnologia de origem vegetal, animal ou microbiana destinado ao uso na produção, no armazenamento e no beneficiamento de produtos agropecuários, nos sistemas de produção aquáticos ou de florestas plantadas, que interfiram positivamente no crescimento, no desenvolvimento e no mecanismo de resposta de animais, plantas, microrganismos e substâncias derivadas e que interajam com os produtos e os processos físico-químicos e biológicos.

A cartela de bioinsumos é ampla e abrange desde inoculantes; promotores de crescimento de plantas; biofertilizantes; produtos para nutrição vegetal e animal; extratos vegetais; defensivos produzidos a partir de microrganismos benéficos para o controle de pragas, parasitas e doenças; produtos fitoterápicos ou tecnologias que contêm biológicos na composição, seja para plantas ou animais, como para processamento e pós-colheita.

Nesse capítulo, será realizada uma revisão sobre as principais estratégias utilizadas na descoberta de moléculas bioativas de origem vegetal com potencial de uso na formulação de bioinsumos. Abrange também uma revisão sobre os produtos comerciais existentes no Brasil, resultados de pesquisas realizadas pela equipe da Embrapa Meio Ambiente, bem como avanços e perspectivas sobre o tema.

PLANTAS COMO FONTE DE NOVOS BIOINSUMOS

Produtos naturais têm sido utilizados para o controle de pragas desde o início da agricultura. Entretanto, com o avanço de novas tecnologias ao longo dos últimos 60 anos, moléculas isoladas a partir de plantas têm sido objeto de investigações contínuas, principalmente em virtude de sua variabilidade estrutural e de potentes atividades biológicas. A complexidade das moléculas é resultado de um *screen* natural que seleciona compostos derivados das vias biossintéticas associadas ao metabolismo secundário, com atividades biológicas contra outros organismos, muitas vezes por meio de novos mecanismos de ação. Compostos fenólicos, estilbenos, cumarinas e poliflavonoides são metabólitos secundários com importância na defesa de plantas contra ataques (Swanton et al., 2011). Assim, as plantas são excelentes fontes de moléculas bioativas, com potencial para utilização na formulação de bioinsumos, sendo particularmente importantes no combate à evolução da resistência de pragas e doenças aos produtos existentes no mercado, em razão dos mecanismos de ação diferenciados, que, muitas vezes, ainda são desconhecidos. Além disso, o fato de essas moléculas naturais conterem poucos átomos de halogênios pode gerar produtos com persistências relativamente curtas no ambiente, baixas toxicidades para organismos não alvo. Quando utilizadas na forma de extrato, o risco de desenvolvimento de resistência devida ao uso contínuo diminui. Além disso, são biodegradáveis e, portanto, promovem a agricultura sustentável (Dayan et al., 2009; Seiber et al., 2014).

Esses produtos podem ser aplicados diretamente na forma de extratos, óleos essenciais ou como substâncias purificadas. No entanto, para evitar a degradação rápida e melhorar a eficiência, estratégias envolvendo a nanotecnologia são utilizadas durante a formulação. As substâncias bioativas que apresentam estruturas simples e eficácia comprovada podem servir de protótipo para a síntese química na fase posterior, que é o desenvolvimento de novos pesticidas.

No Brasil, ainda não existe uma instrução normativa conjunta (INC) que normalize diferenciadamente o registro de produtos agrotóxicos derivados de vegetais. Alguns óleos essenciais, que evocam respostas específicas em alguns insetos, podem ser enquadrados na Instrução Normativa Conjunta nº 1, de 23 de janeiro de 2006 (Brasil, 2006). Também existe a possibilidade de enquadrar alguns produtos à base de vegetais como bioquímicos, conforme descrito na Instrução Normativa Conjunta nº 32, de 26 de outubro de 2005 (Brasil, 2005).

ESTRATÉGIAS UTILIZADAS NO DESCOBRIMENTO DE NOVOS PESTICIDAS NATURAIS

Compostos conhecidos e avaliação de novas atividades

Geralmente, os compostos naturais conhecidos que têm as estruturas elucidadas já foram testados em algum bioensaio anteriormente. No entanto, poucos desses compostos foram submetidos a testes para avaliar o potencial de suas atividades como pesticidas naturais (herbicidas, fungicidas, inseticidas, algicidas, entre outros). Portanto, em vez de testar todos os compostos já isolados aleatoriamente, recomenda-se uma seleção prévia baseada nas estruturas químicas e nas atividades biológicas já descritas. Têm prioridade para os bioensaios agronômicos os compostos com estruturas semelhantes à das fitotoxinas conhecidas, estruturas parecidas com a dos inibidores enzimáticos ou de compostos com determinadas funções nas plantas. Isso é o chamado descobrimento guiado por estruturas semelhantes (Morales et al., 2016).

Descobrimto de novos compostos bioativos

Embora as plantas forneçam um número enorme de compostos naturais com alguma atividade biológica, mas que ainda não foram testados para uso como pesticida, a seleção para testes em bioensaios pode, em tese, ser aleatória. A química combinatorial e o *high throughput screening* têm sido a maneira como as companhias de agroquímicos conduzem suas descobertas (Lindell et al., 2009). Entretanto, os custos desse tipo de abordagem são elevados, além do fato de a diversidade de moléculas ser enorme. Desse modo, a seleção de espécies baseada nas abordagens etnobotânicas, relações ecológicas e relatórios etnobotânicos tem mostrado ser também uma boa alternativa (Morales et al., 2016). Assim, com base nessas informações, são selecionadas as espécies de plantas a serem testadas.

Isolamento guiado por bioensaio

Para a descoberta de moléculas bioativas, o *screening* de extratos de plantas seguido de isolamento guiado por bioensaios é considerado uma das melhores estratégias (Khan et al., 2019). Um esquema ilustrativo das etapas utilizadas nesse tipo de abordagem está ilustrado na Figura 20.1.

Na etapa denominada *screening*, extratos de diferentes plantas obtidos com o mesmo solvente ou a mesma planta extraída com solventes de diferentes polaridades (p.

ex., hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol) são preparados e testados nos bioensaios selecionados. Esses bioensaios devem ser preferencialmente simples, rápidos, sensíveis e de baixo custo, e podem ser utilizados para avaliar a atividade biológica desejada (p. ex., antifúngica, antibacteriana, inseticida, herbicida, entre outras). Após o término dos bioensaios, os extratos que apresentarem melhores respostas quanto à atividade biológica são selecionados para a etapa seguinte, denominada isolamento guiado por bioensaio.

Como as plantas produzem compostos a partir de seu metabolismo primário e secundário, durante a extração uma mistura complexa de moléculas é extraída, e não é possível atribuir a atividade a uma molécula específica, tornando impossível uma relação causa-efeito inequívoca. Assim, para conhecer a molécula (ou grupo de moléculas) que tem o efeito biológico, é necessário realizar o fracionamento dos extratos. Para isso, podem ser utilizadas partições com solventes imiscíveis que separam grupos de substâncias com diferentes polaridades ou por meio de técnicas cromatográficas, como a flash preparativa. A cada fracionamento, repete-se o bioensaio e seleciona-se a nova fração ativa (com menor quantidade de moléculas diferentes) para posteriores fracionamentos/bioensaios, até a obtenção da fração purificada (com poucos compostos) ou o completo isolamento da molécula (pura).

Após a obtenção da molécula purificada, é possível identificá-la e, assim, atribuir a atividade biológica. Para a elucidação estrutural, utilizam-se a espectrometria de massas de alta resolução (*mass spectrometry* – MS), a ressonância magnética nuclear (RMN) e o infravermelho (IV). As diferentes informações são interpretadas em conjunto até a atribuição da estrutura. Apesar de o isolamento guiado por bioensaio ser uma técnica ainda pouco utilizada no descobrimento de pesticidas, alguns trabalhos podem ser citados como referências a esse tipo de isolamento, como o do tabanone a partir da Cogongrass (*Imperata cylindrica* (L.) (Cerdeira et al., 2012) e de alguns acetilenos da *Conyza canadensis* (L.) Cronquist (Queiroz et al., 2012).

Desreplicação e elucidação estrutural por cromatografia acoplada à espectrometria de massas

Durante o processo de fracionamento guiado por bioensaio é possível acompanhar o perfil cromatográfico das frações obtidas a fim de evitar o isolamento de substâncias conhecidas, evitando, muitas vezes, um enorme e desnecessário esforço na etapa de isolamento. Com isso, é possível focar a descoberta de substâncias inéditas. Esse tipo de abordagem é denominado desreplicação. As técnicas utilizadas para essa finalidade devem ser rápidas e sensíveis, tais como a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), que é utilizada para moléculas voláteis e estáveis termicamente, e a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espec-

trometria de massas (LC-MS/MS), utilizada para moléculas instáveis termicamente, mais polares e com massas moleculares maiores. Geralmente, um espectrômetro de massas tipo Q-ToF é utilizado no (LC-MS/MS), que, por ser de alta resolução, fornece informação estrutural dos compostos e a possível fórmula molecular, e no GC-MS geralmente apresenta uma biblioteca de espectros de massas, tal como a NIST. Com as informações obtidas nas análises por LC-MS/MS e/ou GC-MS dos compostos (tais como massa e fórmula molecular, padrão isotópico, perfil de fragmentação, modo de ionização), pesquisas na literatura e nas últimas versões do *Dictionary of Natural Products*, *Antibase* e *SciFinder*, entre outras, são realizadas.

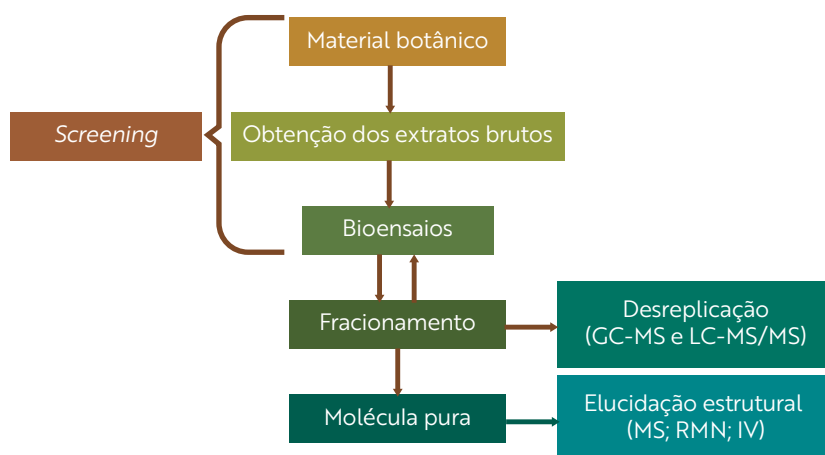


Figura 20.1. Esquema da estratégia a ser utilizada para descoberta de substâncias bioativas.

NANOENCAPSULAMENTO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS VEGETAIS

Embora o uso de óleos essenciais possa ser interessante para reduzir o uso de pesticidas sintéticos, sua utilização maciça na agricultura tem sido limitada pelo fato de serem rapidamente degradáveis nas condições ambientais, apresentarem alta volatilidade, pouca atividade residual, baixa persistência e baixa solubilidade, podendo, ainda, apresentar fitotoxicidade (Wang et al., 2019). Entretanto, o crescente interesse no uso desses compostos bioativos na agricultura tem levado ao desenvolvimento de soluções utilizando técnicas e ferramentas inovadoras, como a nanotecnologia.

As nanoformulações obtidas por meio do encapsulamento dos compostos ativos de interesse agrícola constituem sistemas de liberação controlada capazes de proteger

os compostos bioativos da degradação prematura no campo, melhorar a sua forma de dispersão no meio, além de contribuir para um aumento de eficácia, com menores doses e números de aplicações. Os materiais encapsulantes devem ser biocompatíveis, biodegradáveis e apresentarem baixas toxicidades, o que, em associação com os bioativos de origem natural, resultam em formulações pesticidas mais seguras tanto para seres humanos como para organismos não alvo, além de diminuir o risco de contaminação ambiental, sendo consideradas formulações ambientalmente amigáveis. Vários materiais têm sido utilizados para encapsular tais compostos, como nanomateriais poliméricos (de origem natural e sintética), nanopartículas lipídicas sólidas, nanomateriais inorgânicos porosos, nanoargilas etc., dando origem a diferentes tipos de nanomateriais, por exemplo, nanocápsulas, nanoesferas, micelas, lipossomas, entre outros, obtidos por diferentes métodos de obtenção.

Embora muitos avanços tenham sido obtidos no desenvolvimento de formulações à base de produtos de origem natural, alguns fatores ainda podem restringir seu amplo uso na agricultura. Um deles é a obtenção do composto bioativo, cujas dificuldades estão relacionadas à variação de sua composição, custos e dificuldades de otimização relacionados com a obtenção, extração e purificação, bem como as dificuldades visando à qualidade e à quantidade dos compostos bioativos. Além disso, a determinação da concentração dos compostos bioativos a ser aplicada é um fator bastante crítico no efeito biológico desejado, principalmente quando em sistemas de liberação controlada. Adicionalmente, as nanopartículas podem ser facilmente internalizadas, translocadas e acumuladas em diferentes compartimentos das células das plantas, resultando em efeitos adversos e inesperados. Por esse motivo, deve-se estudar o destino dessas nanopartículas nos diversos compartimentos nos quais estas serão utilizadas. O uso de sistemas nanoestruturados na agricultura, embora recente, apresenta forte tendência de crescimento, o que implica o desenvolvimento de formulações eficazes e sustentáveis, com amplo conhecimento de possíveis efeitos tóxicos e fitotóxicos.

Métodos analíticos para determinação da concentração dos princípios ativos na formulação

Os métodos utilizados na caracterização de nanoformulações representam uma importante ferramenta para saber sobre a aplicação, a absorção e a toxicidade desse sistema, e os critérios para escolha da técnica analítica são baseados no tipo de matriz, concentração esperada dos ativos, complexidade da amostra e propriedades inerentes. Vários métodos de caracterização têm sido reportados e amplamente utilizados (Singh et al., 2021). A determinação da concentração dos ativos em nanoformulações em suspensão geralmente utiliza como técnica inicial a ultrafiltração/centrifugação para nanopartículas maiores que 10 nm. Um filtro de celulose regenerada com corte

molecular de 10 KDa é ajustado ao tubo de centrífuga (tipo Eppendorf), em que uma alíquota da suspensão da nanoformulação recentemente preparada é adicionada. Somente o material não encapsulado passa através do filtro. A quantificação do ativo encapsulado baseia-se no cálculo da diferença entre o ativo presente no sobrenadante e a quantidade do ativo que foi adicionada. Esse cálculo também é utilizado quando se quer determinar a eficiência de encapsulamento (Kumar et al., 2014). A quantificação dos compostos não encapsulados é realizada pelas ferramentas disponíveis para análises de moléculas orgânicas. Para isso, utilizam-se diversas metodologias, e na literatura há vários estudos. Nanopartículas de zeína contendo os compostos botânicos limoneno e carvacrol foram estudadas por Monteiro et al. (2021), que analisaram esses ativos no sobrenadante por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta (HPLC-UV). A quantidade de compostos encapsulados foi calculada indiretamente pela diferença entre a quantidade adicionada ao sistema e a quantidade não encapsulada. Forim et al. (2013) utilizaram a mesma técnica, cromatografia líquida com detector ultravioleta para determinação de azadiractina em nano/micropartículas poliméricas e, também, para calcular a eficiência de encapsulamento. Curcumina, em nanopartículas de ácido poli-L-lático foi analisada utilizando HPLC-UV, com preparo prévio envolvendo secagem de 1 mL da emulsão da nanopartícula e resuspensão em diclorometano:metanol (Silva-Buzanello et al., 2015). Para avaliar atividade inseticida, nanopartículas formadas do encapsulamento de óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* e *Zataria multiflora* foram preparadas utilizando policaprolactona e quitosana. A quantidade de óleo não encapsulado, obtida após ultrafiltração/centrifugação, foi determinada pela medida da absorbância dos óleos utilizando espectrômetro de UV/VIS de 319 e 274 nm (*Rosemary* e *Zataria*, respectivamente) (Ahsaei et al., 2020). A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa também é utilizada, principalmente na análise da abundância e porcentagem dos componentes em óleos essenciais submetidos a encapsulamentos. Yang et al. (2009) avaliaram a atividade inseticida de nanopartículas de polietilenoglicol carregada com óleo essencial de alho. Nesse estudo, avaliou-se a variação na composição desse óleo antes e após o encapsulamento. Com essas ferramentas de análise, é possível acompanhar a eficiência com que a nanopartícula foi encapsulada e o tempo de liberação dos ativos para uma melhor compreensão de todo o sistema.

Avaliação da estabilidade das nanoformulações

Para que se possa conhecer a estabilidade das nanoformulações em médio e longo prazo, é necessário realizar alguns estudos. Existem várias publicações sobre esse assunto, e um protocolo para avaliação da estabilidade das nanoformulações está descrito a seguir.

Estabilidade termodinâmica

Segundo Benelli et al. (2020), para avaliar a estabilidade termodinâmica, as amostras das nanoformulações devem ser estocadas em temperatura ambiente em 12:12 h (luz:escuro) por seis meses. A estabilidade físico-química deve ser avaliada repetindo análises de DLS (*dynamic light scattering*) nos tempos: zero dias (t₀), um mês (t₁), três meses (t₃) e seis meses (t₆).

Estabilidade acelerada

A estabilidade das nanoformulações deve ser avaliada em três fases (centrifugação, ciclos de aquecimento e resfriamentos e ciclos de congelamento e descongelamento), de acordo com a metodologia descrita por Alkilani et al. (2018). Inicialmente, as nanoemulsões são centrifugadas a 3,500 rpm por 15 minutos. Se nenhuma separação de fases for observada, as nanoemulsões são sujeitas a seis ciclos de aquecimento (45 °C) e resfriamento (4 °C), com um período de estocagem para cada temperatura de 48 horas. Se as nanoemulsões permanecerem estáveis, são sujeitas a três ciclos de congelamento (-21 °C) e descongelamento (25 °C) por 48 horas para cada temperatura. No final de cada fase, as amostras são analisadas por meio de inspeção visual e de DSL.

Produtos de origem vegetal para controle de plantas daninhas

O controle químico das plantas daninhas tem sido um campo dinâmico de pesquisa. O uso rotacional de herbicidas de acordo com seus modos de ação (*modes of action* – MoAs) e a busca por herbicidas que apresentem amplo espectro de controle, comportamento ambiental seguro e baixa toxicidade fazem parte dos esforços para conter a disseminação das plantas daninhas resistentes aos herbicidas atuais. Embora o processo sintético gere uma grande quantidade de moléculas com potencial tóxico às plantas, estas afetam um número relativamente pequeno de mecanismos de ação, e nos últimos 30 anos nenhum herbicida tem sido comercializado contendo um novo modo de ação (Umetsu; Shirai, 2020).

Moléculas naturais com potencial tóxico às plantas, chamadas de fitotoxinas, são produtos do metabolismo secundário em resposta às interações bióticas e abióticas do organismo com o meio em que vive (Dayan; Duke, 2020; Zhou et al., 2020; Yu et al., 2021). As fitotoxinas caracterizam-se por apresentar peso molecular maior, fortes ligações entre os átomos de carbono e halogênios, estrutura complexa e quantidades maiores de oxigênio e nitrogênio quando comparadas com a estrutura dos herbicidas sintéticos, que, pelo processo industrial de síntese, limitam a construção da estrutura final da molécula, dado o custo da síntese (Henkel et al., 1999). Além disso, Dayan et al. (1999) reportam que há pouca sobreposição de mecanismos de ação entre fitotoxinas e moléculas sintéticas. As fitotoxinas tendem a ser mais complexas estruturalmen-

te que os herbicidas sintéticos. Entretanto, há, muitas vezes, uma similaridade entre algumas fitotoxinas e certos herbicidas sintéticos comerciais (Dayan; Duke, 2020; Taban et al., 2020).

A alelopatia oferece um novo caminho para a descoberta de compostos que podem ser empregados como pesticidas. O termo “alelopatia” tem sofrido várias alterações durante o tempo (Molish, 1937; Rice, 1974, 1984). A definição adotada pela Sociedade Internacional de Alelopatia (SIA) em 1996 é “A ciência que estuda qualquer processo envolvendo metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias, e fungos que influenciam o crescimento e desenvolvimento dos sistemas biológicos e agrícolas”.

Entre as fitotoxinas, os aleloquímicos têm sido utilizados como alternativa ao uso de defensivos agrícolas sintéticos. Fitotoxinas em baixas concentrações são capazes de apresentar maior toxicidade às plantas que as moléculas sintéticas e, na maioria das vezes, afetam mecanismos de ação ainda inexplorados (Duke et al., 1998). A identificação correta do local primário de ação da fitotoxina com propriedade herbicida é uma tarefa desafiadora, pois esta interfere em muitas rotas metabólicas na planta.

Assim, programas de desenvolvimento de novos pesticidas que utilizam como fonte de moléculas os produtos naturais devem ser explorados. A diversidade das fitotoxinas presente nas plantas e microrganismos possibilitam a descoberta de novos pesticidas com diferentes mecanismos de ação.

Em pesquisa promovida em parceria entre a Embrapa Meio Ambiente e o NPU-RU-USDA-ARS, foi realizado um estudo com a planta *Conyza canadensis* (L) Cronquist syn. (conhecida como buva), que é uma planta daninha problemática e invasiva, com propriedades alelopáticas. Para identificar os constituintes fitotóxicos da parte aérea, procedeu-se a um fracionamento guiado por bioensaio do extrato feito com diclorometano. Três componentes ativos foram isolados e identificados, sendo (2Z,-8Z)-matricaria acid methyl ester, (4Z,8Z)-matricaria lactone e (4Z)-lachnophyllum lactone, conforme Figura 20.2. As lactonas inibiram o crescimento da monocotiledônea *Agrostis stolonifera* (bentgrass) e da dicotiledônia *Lactuca sativa* (alface) a 1 mg mL⁻¹, ao passo que a (2Z,8Z)-matricaria acid methyl ester foi menos ativa. Em um ensaio de dose-resposta para avaliação do crescimento da *Lemna paucicostata*, a (4Z)-lachnophyllum lactone foi mais ativa com uma IC₅₀ de 104 µM, ao passo que a (4Z,8Z)-matricaria lactone foi menos ativa (IC₅₀ de 220 µM) (Queiroz et al., 2012).

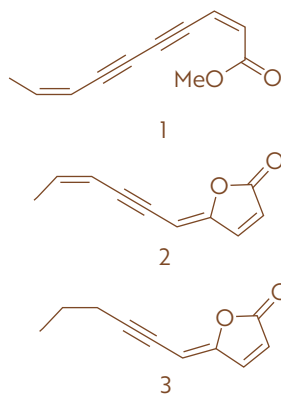


Figura 20.2. Estruturas químicas *(2Z,8Z)*-matricaria acid methyl ester (1), *(4Z,8Z)*-matricaria lactone (2) e *(4Z)*-lachnophyllum lactone (3).

Outro estudo envolvendo a mesma parceria avaliou a atividade fitotóxica da Cogongrass, que é uma espécie invasora e tem propriedades alelopáticas relatadas. A fitotoxicidade de diferentes dos constituintes isolados de raízes e partes aéreas dessa espécie foi avaliada, e não se observou atividade fitotóxica significativa. No entanto, o óleo essencial das partes aéreas foi ativo. Isolamento guiado por bioensaio desse extrato, usando cromatografia em coluna de sílica gel, levou à identificação de megastigmatrienona, 4-(2-butenilideno) – 3,5,5-trimetil-2-ciclohexen-1-ona (também chamada de tabanone), como uma mistura de quatro estereoisômeros responsáveis pela maioria da atividade. O modo de ação desse composto resulta em rápida perda da integridade da membrana e subsequente redução na taxa de fluxo de elétrons fotossintéticos (Cerdeira et al., 2012).

Oršolić et al. (2021) propõem uma modelagem baseada em relação estrutura-atividade (*structure-activity relationship* – SAR), que tem como pressuposto as classificações de herbicidas de acordo com seus MoAs e a seletividade das plantas daninhas. Combinando os modelos preditivos com regras de semelhança a herbicidas, definidas por características, a plataforma de *screening* virtual é proposta para a seleção de pequenas moléculas por suas propriedades. Em outro trabalho recente, Abd-ElGawad et al. (2021) publicaram uma revisão sobre óleos essenciais fitotóxicos, e uma análise quimiométrica foi realizada na tentativa de construir uma relação estrutura-atividade entre a fitotoxicidade e a composição química dos óleos essenciais. A análise dos dados revelou que os terpenos oxigenados e mono- e sesquiterpenos, em particular, desempenham o papel principal na fitotoxicidade de OE. Assim, o uso de SAR tem mostrado ser uma alternativa moderna e eficiente para a descoberta de novos herbicidas.

PRODUTOS DE ORIGEM VEGETAL PARA CONTROLE DE INSETOS

A pesquisa de novos ativos biológicos com ação inseticida tem seu início em laboratório, onde ocorre a extração dos óleos essenciais ou obtenção dos extratos das plantas em diversos solventes. Em seguida, são preparadas soluções para posterior avaliação da bioatividade sobre os insetos-alvo por meio da ingestão, do contato direto (avaliação tóxica) ou com odores. A partir desses bioensaios, avalia-se a bioatividade dos compostos sobre os insetos, que foi resumidamente categorizada por Isman (2017) como comportamental (causando repelência, impedimento/deterrência alimentar ou impedimento/deterrência de oviposição) ou fisiológica (provocando toxicidade aguda, interrupção do desenvolvimento ou inibição do crescimento).

Algumas substâncias de origem botânica desempenham atividades inseticidas bastante conhecidas, tais como piretrinas, rotenona, nicotina, cevadina, veratrídina, rianodina, quassinoides e biopesticidas voláteis (Isman, 2020). Estes últimos são, normalmente, óleos essenciais presentes nas plantas aromáticas (Isman, 2020). Uma das plantas mais conhecidas é o “nim” (*Azadirachta indica*), uma *Meliaceae* de origem asiática, disseminada por outros continentes, cujo princípio ativo é a azadiractina. No Brasil, já existem plantações dessa árvore nas regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sul. Como seu princípio ativo é uma molécula complexa, de difícil síntese, os extratos das folhas ou frutos são aplicados diretamente como inseticidas (Dequech et al., 2008). Várias revisões sobre atividade inseticida das plantas e aplicações têm sido publicadas (Duke; Copping, 2007; Kanaak; Fiuza, 2010; Correa; Salgado, 2011; Miresmailli; Isman, 2014; Khan et al., 2017; Isman, 2020; Spletozer et al., 2021).

Pesquisas realizadas em projeto liderado pela Embrapa Meio Ambiente envolveram um *screening* de extratos de plantas e óleos essenciais com ação inseticida. Para isso, foram realizados bioensaios em laboratório com as espécies *Anticarsia gemmatalis* Hubner, 1818 (*Lepidoptera: Erebidae*) e *Helicoverpa armigera* (Hubner) (*Lepidoptera: Noctuidae*), duas importantes pragas de cultivos agrícolas no Brasil (Marinho-Prado et al., 2018, 2019).

A avaliação de extratos vegetais foi iniciada utilizando apenas uma concentração ($2,5 \text{ mg mL}^{-1}$) do extrato em quatro diferentes solventes (hexano, diclorometano, metanol e água). As espécies vegetais utilizadas para a obtenção dos extratos foram *Clerodendrum splendens*, *Conyza canadensis*, *Lantana camara*, *Tithonia diversifolia* e *Vernonanthura westiniana*, e as soluções foram oferecidas às lagartas por ingestão, para avaliação da biologia e do comportamento dos insetos (Marinho-Prado et al., 2018). Os extratos vegetais de *C. splendens* em diclorometano e hexano e de *V. westiniana* em metanol avaliados sobre *A. gemmatalis* causaram as maiores taxas de mortalidade nas lagartas, sendo que o extrato de *C. splendens* em diclorometano causou também redução no tempo de vida e peso larval de pupas. Quando oferecido a lagartas de *H. armigera*, o extrato

metanólico de *V. westiniana* causou aumento no consumo foliar e redução no peso de pupas, sendo observada mortalidade de apenas 20% da população avaliada (Marinho-Prado et al., 2018). Posteriormente, uma segunda etapa foi realizada somente com as soluções que apresentaram bioatividade sobre os insetos no bioensaio anterior, sendo agora oferecidas em diferentes concentrações às lagartas (0, 5, 10, 15, 20 mg mL⁻¹), para cálculo da concentração letal a 50% da população (CL50), sendo avaliada a mortalidade após 24 e 48 horas, além do consumo diário (dados ainda não publicados).

A avaliação com óleos essenciais seguiu a mesma estrutura em etapas. Em uma primeira etapa, óleos essenciais originados de nove diferentes espécies vegetais, a saber, laranja doce (*Citrus aurantium dulce*), gengibre (*Zingiber officinale Roscoe*), melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), canela cássia (*Cinnamomum cassia*), citronela (*Cymbopogon sp.*), menta (*Mentha arvensis*), orégano (*Origanum vulgare*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e basilicão (*Ocimum basilicum L.*), foram oferecidos às lagartas na concentração de 2 µL mL⁻¹ para avaliações biológicas e comportamentais dos insetos (Marinho-Prado et al., 2019). A resposta de *A. gemmatalis* aos nove óleos essenciais avaliados foi diferente em relação à de *H. armigera*, em ambas as espécies, porém, observou-se bioatividade do óleo de basilicão, a qual pode ser devida à ação de seus compostos majoritários, também identificados no trabalho (linalol, 1,8-cineol, cânfora e eugenol). Posteriormente, somente as soluções com melhores resultados foram avaliadas em diferentes concentrações sobre as lagartas (0, 2, 4, 6, 8 e 10 µL mL⁻¹), para cálculo da concentração letal a 50% da população (CL50), sendo avaliada a mortalidade após 24 e 48 horas, além do consumo diário (dados ainda não publicados).

PRODUTOS DE ORIGEM VEGETAL PARA CONTROLE DE FUNGOS

Pesquisas *in vitro* vêm demonstrando que diversos fungos fitopatogênicos podem ser controlados com eficiência por meio de extratos vegetais, como o controle de *Fusarium proliferatum* por extratos de alho e capim-santo (Souza et al., 2007), *Colletotrichum gloeosporioides*, por extratos de melão-de-são-caetano e eucalipto (Celoto et al., 2008) e *Bipolaris sorokiniana*, por extrato de cânfora (Franzener et al., 2003), entre outros.

Pesquisa realizada em parceria entre a Embrapa e o NPURU-USDA-ARS envolveu a planta *Conyza canadensis* (L.) Cronquist, da família Asteraceae, que é uma planta daninha conhecida como buva. Após terem sido isoladas da planta, duas lactonas puras foram submetidas a ensaios de bioautografia, usando 10 e 100 µg por ponto, contra os fungos fitopatogênicos *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum fragariae* e *Colletotrichum gloeosporioides*, e apresentaram resultados positivos. No estudo de dose-resposta contra seis fungos fitopatogênicos, (4Z,8Z)-*matricaria lactona* foi mais ativa que o fungicida co-

mercial azoxystrobina contra os fungos *C. acutatum*, *C. fragariae* e *C. gloeosporioides* na dose de 30 μ M e com atividade próxima do fungicida comercial captan contra *C. gloeosporioides*, ao passo que a (4Z)-*lactonophyllum lactona* foi menos ativa (Queiroz et al., 2012).

A brusone e a giberela são doenças do trigo provocadas pelos fungos *Pyricularia grisea* (telemorfo *Magnaporthe grisea*) e *Fusarium graminearum* (telemorfo *Gibberella zeae*), respectivamente. Embora substâncias químicas sintéticas venham sendo aplicadas na prevenção e controle desses patógenos, pouco sucesso tem sido alcançado. Em um projeto liderado pela Embrapa Meio Ambiente, testou-se a atividade antifúngica de quatro óleos essenciais: *Ocimum gratissimum* (alfavaca cravo), *Lippia sidoides* (alecrim pimenta), *Lippia alba* (cidreira) e *Danthus caryophyllus* L. (cravo), por ensaio de disco-difusão em ágar, contra dois isolados de *M. grisea* (Py 5003 e Py 36.I) e um de *F. graminearum*. Os óleos de alecrim pimenta, alfavaca cravo e cravo foram os melhores contra Py 5003, com inibição de 95,79 \pm 1,84%, 83,77 \pm 2,88% e 81,38 \pm 1,56%, respectivamente, em concentração de 100%, e promoveram inibições estatisticamente semelhantes a 50%. Na concentração máxima, o alecrim pimenta e a alfavaca cravo induziram as maiores inibições contra Py 36.I, que foram de 92,70 \pm 1,01% e 84,20 \pm 6,24%, respectivamente, ao passo que, para uma concentração de 50% de óleo, o cravo se destacou, com inibição média de 75,80 \pm 1,99%, e o alecrim pimenta, de 57,14 \pm 14,92%. Contra *F. graminearum*, o alecrim pimenta foi o óleo que provocou a maior inibição (64,28 \pm 9,68%). Assim, concluiu-se que os óleos de alfavaca cravo, alecrim pimenta e cravo são potenciais substituintes dos atuais fungicidas comerciais para o controle da brusone e giberela (Mizobuchi et al., 2017).

Em um longo estudo envolvendo os Laboratórios de Produtos Naturais e de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente, Stadnik et al. (2003) avaliaram extratos obtidos de 71 plantas e cinco basidiomicetos (fungos) no controle de oídio do pepino. A partir de folhas, flores, frutos, raízes, rizomas, caules e bulbos de plantas invasoras, plantas medicinais, plantas aromáticas e plantas originárias da região do Pantanal Brasileiro, bem como dos corpos de frutificação dos basidiomicetos, foram obtidos látex, óleos essenciais, extratos por maceração e por percolação das seguintes espécies: 1) *Euphorbia tirucallii*; 2) *Poinsettia pulcherrima*; 3) *Plumeria* sp.; 4) *Eucalyptus citridora*; 5) extrato pirolenhoso; 6) *Allamanda cathartica*; 7) *Allium sativum*; 8) *Aloe vera*; 9) *Altherrantera brasiliiana*; 10) *Arnica montana*; 11) *Atropa belladonna*; 12) *Azadirachta indica*; 13) *Baccharis trimera*; 14) *Bidens pilosa*; 15) *Bouganvillea spectabilis*; 16) *Cajanus cajan*; 17) *Calendula officinalis*; 18) *Clavaria* sp.; 19) *Cocos nucifera*; 20) *Coriandrum sativum*; 21) *Cupressus* sp.; 22) *Cymbopogum citratus*; 23) *Cynara scolymus*; 24) *Desmodium tortuosum*; 25) *Euphorbia heterophylla*; 26) *Euphorbia splendens*; 27) *Feijoa sellowiana*; 28) *Ganoderma* sp.; 29) *Ilex paraguariensis*; 30) *Ipomea* sp.; 31) *Lentinula edodes*; 32) *Matricaria chamomilla*; 33) *Mentha piperita*; 34) *Mikania cordifolia*; 35) *Murraya paniculata*; 36) *Oudemansiella canarii*; 37) *Paullinia cupana*; 38) *Peumus boldus*; 39) *Phyllanthus tenellus*;

40) *Pimpinella anisum*; 41) *Pinus taeda*; 42) *Pisolithus tinctorius*; 43) *Psidium guajava*; 44) *Pteridium aquilinum*; 45) *Ricinus communis*; 46) *Sansevieria zeylanica*; 47) *Sonchus oleraceus*; 48) *Symphitium officinalis*; 49) *Vernonia polyanthes*; 50) *Wedelia padulosa*; 51) *Zingiber officinale*; 52) *Lagenaria* sp.; 53) *Agonandra brasiliensis*; 54) *Alchornea discolor*; 55) *Annona cornifolia*; 56) *Bauhinia bauhinioides*; 57) *Bunchosia paraguayensis*; 58) *Couepia uiti*; 59) *Copaifera martii*; 60) *Curatella americana*; 61) *Davilla elliptica*; 62) *Diopyros hispida*; 63) *Erytroxylum anguifugum*; 64) *Fagara hassleriana*; 65) *Gomphrena elegans*; 66) *Hyptis crenata*; 67) *Licania parvifolia*; 68) *Machaerium hirtum*; 69) *Mascaغانيا bethamiana*; 70) *Melia azedarach*; 71) *Mimosa chaetosphaera*; 72) *Ocotea suaveolens*; 73) *Rhamnidium elaeocarpum*; 74) *Richardia grandiflora*; 75) *Tocoyena formosa*; e 76) *Unonopsis lindimani*.

Os extratos foram pulverizados em plantas de pepino, e avaliou-se a indução de resistência sistêmica ao oídio. *Aloe vera*, *Bidens pilosa*, *Ganoderma* sp. (basidiomiceto), *Hyptis crenata*, *Mascaغانيا bethamiana*, *Ocotea suaveolens*, *Oudemansiella canarii* (basidiomiceto), *Pinus taeda*, *Richardia grandiflora* e *Vernonia polyanthes* apresentaram, inicialmente, potencial de induzir a resistência de pepino ao oídio. Em estudos mais detalhados, observou-se que os extratos de *Oudemansiella*, *Ganoderma*, *Pinus taeda* e *Aloe vera* reduziram o número de colônias de oídio em 79, 65, 30 e 21%, respectivamente, nas folhas de pepino não tratadas com os extratos, indicando claramente a indução de resistência. Além disso, os extratos de *Oudemansiella* inibiram a germinação dos conídios do patógeno.

Na sequência, Stadnik e Bettiol (2007) estudaram mais detalhadamente o potencial de extratos de *Oudemansiella canarii* em induzir a resistência de pepino a oídio por meio da ativação das enzimas lipoxigenase e peroxidase. Resumidamente, os resultados obtidos no estudo sugerem que compostos apolares de *O. canarii*, apesar da ação fungitóxica, também podem induzir a resistência sistêmica de plantas de pepino contra *Podosphaera xanthii*.

Pós-colheita

Consideráveis perdas são ocasionadas por doenças pós-colheita causadas por fungos. Estima-se que, anualmente, 1,3 bilhões de toneladas de produtos frescos colhidos não chegam à mesa do consumidor, e entre as principais causas dessas perdas estão as doenças em pós-colheita, que reduzem tanto a quantidade como a qualidade dos produtos comercializados (Munhuweyi et al., 2017; Terao et al., 2020).

Para controlar essas infecções fúngicas no pós-colheita, têm-se utilizado, predominantemente, fungicidas comerciais. O uso continuado do mesmo princípio ativo tem contribuído para o desenvolvimento de populações de raças resistentes de patógenos, que demanda a aplicação de doses ainda maiores desses produtos, o que, consequentemente, acaba por aumentar o nível de resíduos químicos tóxicos nos produtos frescos. A conscientização do consumidor para consumo de frutas e hortaliças saudáveis,

sem resíduos químicos, além do impacto negativo causado pelos agroquímicos ao meio ambiente, tem aumentado a demanda de pesquisa por alternativas mais seguras e efetivas para minimizar as perdas pós-colheita e para manutenção da qualidade do produto (Maltrose et al., 2021).

Entre essas alternativas, destaca-se como bastante promissor o uso de bioinsumos à base de extrato de plantas e óleos essenciais (Abdolahi et al., 2010). Embora cerca de 10.000 metabólitos vegetais secundários já tenham sido quimicamente definidos como compostos que apresentam atividades antimicrobianas, poucos deles foram explorados para uso prático, e existe, ainda, um grande potencial não identificado disponível na natureza (Duke et al., 2002). Esses metabólitos secundários são considerados alternativas promissoras para controle de doenças pós-colheita de frutas, como aqueles presentes no extrato de *Conyza canadensis* (Queiroz et al., 2012; Terao et al., 2020).

Elshafie e Camele (2016) e Elshafie et al. (2015) observaram atividade de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) no controle de fungos causadores de doenças pós-colheita de pêssego, *Monilia laxa*, *M. fructigena* e *M. fructicola*, e Mancini et al. (2014) identificaram que os compostos ativos majoritários presentes nesse óleo são: carvacrol, timol, linalol, citral e trans-caryophyllene. O óleo de magnólia (*Magnolia liliflora*) apresenta elevado potencial no controle de *Botrytis cinerea* e *C. capsici*, e o óleo de tomilho (*Thymus* spp.), no controle de *Aspergillus* spp. e de *Penicillium* spp. O efeito antifúngico desses compostos é atribuído tanto à inibição do crescimento micelial quanto à germinação de esporos, impedindo, assim, a infecção inicial e o subsequente desenvolvendo do micélio para além do local de infecção (Rahman; Gul, 2003; Lazar-Baker et al., 2011; Bajapi; Kang, 2012).

Em pesquisa realizada na Embrapa Meio Ambiente, Porto et al. (2017), verificaram que a substância (*4Z*)-*lachnophyllum lactone* (LACH), isolada da *C. canadensis*, exerce atividade inibitória significativa contra o fungo *Penicillium digitatum*, causador da doença do bolor verde na laranja. Nesse trabalho, os autores apresentam um método de extração dos compostos bioativos da planta com água, utilizando um processo em consonância com a química verde, gerando extratos que podem ser aplicados diretamente nas frutas em tratamentos pós-colheita.

Em continuação dessa pesquisa, Terao et al. (2020) avaliaram, em ensaios in vivo, a eficiência dessa substância em controlar o bolor verde em laranja cv. Valência. Observou-se que a eficiência de controle aumenta gradativamente com o aumento da dose, elevando de 23% na dose de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para 43% na dose de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Quando a substância LACH na dose de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi aplicada em combinação com a radiação UV-C na dose de 1,5 kJ m^2 , constatou-se uma elevação significativa no nível de controle da doença ao redor de 70%, não diferindo do tratamento com o fungicida, e retardou em sete dias a manifestação de sintomas da doença. Esses resultados indicam que a integração de medidas alternativas de controle apresenta efeitos aditivos na diminui-

ção da intensidade de doenças, por causa dos efeitos sinérgicos que ocorrem entre os tratamentos e a compensação das limitações particulares de cada método. Portanto, a substância LACH, isolada de *C. canadenses*, apresenta potencial para ser explorada comercialmente, como alternativa ao uso de fungicidas no controle de doenças pós-colheita de frutas, principalmente no manejo integrado, combinado com métodos físicos de controle.

Outras pesquisas conduzidas na Embrapa Meio Ambiente relevaram elevada atividade dos óleos essenciais de alecrim pimenta (*Lippia sidoides*), alfavaca cravo (*Ocimum gratissimum*), orégano (*O. vulgare*) e canela casca (*Cinnamomum cassia*) no controle de fungos causadores de doenças pós-colheita de manga (*C. siamense*, *Alternaria alternata*, *Lasiodiplodia theobromae* e *Botryosphaeria dothidea*), de melão (*Fusarium pallidoroseum* e *Alternaria alternata*), de mamão (*A. alternata*, *L. theobromae*, *F. solani*, *C. gloeosporioides* e *Phoma caricae-papayae*) e de laranja (*P. digitatum*) (dados ainda não publicados).

Verificou-se, também, o efeito antifúngico de dois monoterpenos isolados de *Cheopodium ambrosioides* sobre *Sclerotium roffsii* (Paré et al., 1993).

Esses resultados comprovaram a eficiência e o amplo espectro de ação desses óleos essenciais e a grande potencialidade de uso no controle de podridões em frutas, que têm causado grandes prejuízos ao produtor e exportador de frutas e para as quais não existe método de controle eficiente, nem mesmo com a aplicação de fungicidas.

Estudos demonstraram que a combinação de quitosana com óleos essenciais pode ser empregada como revestimento natural no tratamento pós-colheita de frutas, visando ao controle de fungos. A combinação de quitosana com o óleo de orégano ou de canela na concentração de 10 g mL⁻¹ inibiram completamente o desenvolvimento de *Botrytis* spp., *Penicillium* spp. e *Pilidiella granati*, fungos causadores de doenças pós-colheita em romã. Por outro lado, o efeito inibitório da combinação de quitosana e óleo de capim-limão mostrou-se dependente da concentração do óleo essencial, observando-se completa inibição de *P. granati* na concentração de 10 g mL⁻¹, ao passo que a inibição de *Botrytis* spp. e *Penicillium* spp. ocorreu na concentração de 50 g mL⁻¹ (Munhuweyi et al., 2017).

Portanto, o revestimento natural à base de quitosana e óleos essenciais apresenta-se como uma alternativa limpa e viável ao uso de agroquímicos no controle de doenças pós-colheita de frutas.

Os óleos fixos de *Allium sativum*, *Copaifera langsdorffii* e *Azadirachta indica* e os óleos essenciais de *Pogostemon cablin*, *Mentha arvensis*, *Eucalyptus* spp., *Cymbopogon citratus*, *Ocimum basilicum* var. *Maria bonita*, *Romarinus officinalis*, *Lippia sidoides*, *Zingiber officinale*, *Citrus aurantifolia*, *Piper aduncum* e *Ocimum basilicum* foram avaliados no controle de *P. digitatum* tanto in vitro, como em frutos de laranja pera em pós-colheita utilizando concentrações de 1, 10, 100, 1.000, 10.000 e 100.000 ppm. In vitro, em concentrações superiores a 1%, os óleos inibiram totalmente a germinação dos esporos e o crescimento micelial de *P. digitatum*, bem como controlaram o bolor verde nos frutos.

Entretanto, os óleos nas maiores concentrações causaram fitotoxicidade aos frutos e alteraram seu sabor (Mattos, 2010). Assim, apesar do potencial em controlar a doença em pós-colheita, o uso dos óleos necessita ser integrado com outras técnicas para reduzir a concentração utilizada e não causar problemas aos frutos.

Controle da ferrugem asiática da soja com óleos de café

A ferrugem asiática da soja, causada por *Phakopsora pachyrhizi*, atualmente a mais importante doença foliar da cultura, é controlada, basicamente, por meio da pulverização de fungicidas (Godoy et al., 2015, 2016). Em razão dos problemas ambientais e da seleção de isolados resistentes aos fungicidas (Godoy, 2012), é de extrema importância o desenvolvimento de produtos alternativos. Nesse sentido, Dorighello et al. (2015), trabalhando com o controle da ferrugem asiática da soja, causada por *Phakopsora pachyrhizi*, verificaram que os óleos de café, obtidos por meio da prensagem fria de grãos de café cru e torrado, além de inibir a germinação dos uredosporos do patógeno, controlaram a ferrugem em ensaios conduzidos em folhas destacadas, casas-de-vegetação e campo.

PRODUTOS NATURAIS PARA USO COMO ANTIBACTERIANOS

O surgimento e a disseminação de patógenos resistentes a medicamentos, que adquiriram novos mecanismos de resistência, continuam sendo uma ameaça global à saúde. Esses microrganismos multirresistentes são conhecidos como “superbactérias” e causam infecções não tratáveis com os antimicrobianos existentes, como os antibióticos (Organização Mundial de Saúde, 2021).

A descoberta de novos agentes antibacterianos foi baseada, principalmente, em produtos naturais que podem ser obtidos de diferentes fontes, como plantas, bactérias, algas, fungos e animais, entre eles, compostos bioativos de óleos essenciais, que têm sido de grande interesse. A atividade antibacteriana dos óleos essenciais está relacionada à estrutura química de seus constituintes, às quantidades em que estão presentes e às associações entre eles.

Na Embrapa Meio Ambiente, foram desenvolvidos projetos envolvendo diversos óleos essenciais, seus componentes isolados ou em associação com ácidos orgânicos, para avaliação da atividade antimicrobiana, in vitro, contra as linhagens patogênicas *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 e *Staphylococcus aureus* ATCC 13565. Para isso, foram testados ao todo 41 óleos essenciais e as combinações em pares dos óleos de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* Stapf.), tomilho (*Thymus vulgaris* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e canela (*Cinnamomum cassia* (L.) D. Don. para observar efeitos adicionais ou não na inibição dos microrganismos.

Os melhores resultados de atividades antimicrobianas foram obtidos utilizando os óleos de tomilho, orégano e alecrim pimenta. As combinações de cada par dos óleos de alecrim pimenta, capim-limão, tomilho, orégano e canela não apresentaram melhora adicional no efeito para os patógenos estudados quando comparados com seus óleos testados isoladamente, os compostos majoritários, obtidos por GC-MS, do óleo de orégano foram carvacrol (69,1%) e p-cimeno (18,8%), do óleo essencial de tomilho foram timol (45,5%) e p-cimeno (35,6%), e do alecrim pimenta foram timol (77,2%) e p-cimeno (14,2%). A aplicabilidade dos óleos selecionados ou das substâncias presentes isoladas seria diretamente nos alimentos, com a finalidade de inibir ou controlar o crescimento desses patógenos, ou em embalagens bioativas, contribuindo, assim, para a segurança dos alimentos (Penteado et al., 2021).

Em outra pesquisa, resultado do projeto BRS-AQUA (parceria entre Embrapa e BNDES), avaliou-se o efeito da mistura das substâncias timol e terpinoleno, isoladas de óleos essenciais, com os ácidos orgânicos láctico e cítrico na inibição do *Streptococcus agalactiae*. Para tanto, aplicou-se o método de microdiluição para avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) das misturas entre as substâncias e os ácidos. O timol isolado apresentou valores de CIM 1,5625 mg mL⁻¹ e CBM 6,25 mg mL⁻¹; na presença de ácido cítrico a 1,625 mg mL⁻¹, CIM e CBM foram de 0,391 mg mL⁻¹. Para o terpinoleno isolado, CIM foi de 6,25 mg mL⁻¹, e CBM, 12,5 mg mL⁻¹; na presença do ácido láctico a 3,25 mg mL⁻¹, CIM e CBM foram iguais a 0,78125 mg mL⁻¹; na presença do ácido cítrico a 13,0 mg mL⁻¹, foi necessária uma concentração de 3,125 mg mL⁻¹ para ambos os testes (CIM e CBM). Como os ácidos orgânicos já vêm sendo utilizados como aditivos zootécnicos na aquicultura, a adição de pequenas quantidades de timol e terpinoleno pode contribuir significativamente para controlar infecções, melhorando a saúde e o bem-estar dos animais (Bonin et al., 2021).

O extrato alcoólico da *Artemisia Annuua* apresentou atividade antimicrobiana contra patógenos de peixes (Soares et al., 2020a). Esse extrato foi incorporado em ração e utilizado na alimentação de tilápia-do-nylo. Os resultados foram muito promissores, pois houve uma melhora significativa no sistema imunológico, minimizando a resposta ao estresse e aumentando a resistência dos peixes quando desafiados contra *Aeromonas hydrophila* (Soares et al., 2020b). Essa formulação foi patenteada (BR10201902707), e recentemente (2021) a Embrapa Meio Ambiente firmou um contrato de inovação aberta com a empresa Terpenia Bioinsumos para testar a produção da ração em maior escala, a fim de avaliar sua viabilidade comercial.

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DOS PRODUTOS NATURAIS

A avaliação ecotoxicológica mede o potencial de efeitos adversos dos bioinsumos para a biota dos compartimentos ambientais. Com relação ao compartimento

aquático, um parâmetro útil é a concentração de risco 5% (HC_5). Esta é a concentração estimada que protege 95% das espécies em uma comunidade e pode ser prevista a partir de um pequeno número de dados toxicológicos (Traas; Van Leeuwen, 2007; Arambawatta-Lekamge et al., 2021). Nesse contexto, a distribuição de sensibilidade das espécies (SSD) considera a variação na sensibilidade à substância testada entre as espécies. Portanto, a SSD é uma ferramenta relevante na definição de padrões de qualidade no que diz respeito aos valores máximos de substâncias potencialmente tóxicas permitidas no ambiente, a fim de proteger a diversidade de espécies (Traas; Van Leeuwen, 2007; Jonsson et al., 2015).

Pesquisa realizada na Embrapa Meio Ambiente avaliou o risco ecotoxicológico para o compartimento aquático do óleo essencial de *Piper aduncum* L. (*Piperaceae*), planta conhecida popularmente como pimenta-de-macaco, sobre a qual se tem relatado ação terapêutica contra fungos, protozoários e infecções em geral, além de atuar como repelente (Dal Picolo et al., 2014; Mamood et al., 2017; Miura et al., 2021). O maior componente de seu óleo essencial é o dilapiol, composto que deve contribuir, em grande parte, para as atividades terapêuticas (Gáinza et al., 2016).

O óleo essencial das folhas de *P. aduncum* tem sido utilizado para tratar doenças de peixes (Queiroz, 2012; Corral et al., 2018), entretanto, há carência de informações quanto à sensibilidade de organismos aquáticos não visados (não alvo) a esse material. Tais organismos podem, eventualmente, entrar em contato com o óleo essencial quando utilizado para fins terapêuticos em produção da aquicultura ou quando os efluentes da aquicultura atingirem os corpos d'água nas áreas circundantes. Portanto, a avaliação ecotoxicológica é necessária para determinar os parâmetros para uso seguro do óleo essencial de *P. aduncum* (Bártíková et al., 2016).

A composição química da amostra de óleo essencial foi analisada, e seu HC_5 foi determinado com base na toxicidade em seis organismos não alvo: uma microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*), sementes de alface (*Lactuca sativa* L.), um nematoide (*Panagrolaimus* sp.), dois microcrustáceos (*Daphnia magna* e *Artemia salina*) e um peixe (*Arapaima gigas*). Fatores de segurança foram aplicados ao HC_5 a fim de estabelecer níveis de proteção para comunidades do meio aquático (Miura et al., 2021).

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS) permitiu a identificação de 18 compostos. O pico principal do cromatograma correspondeu ao dilapiol, que representou 75,5% da composição do óleo essencial, seguido por (E)-cariofileno (4,7%) e miristicina (4,2%).

O organismo mais sensível ao material-teste foi o microcrustáceo *D. magna*, com uma concentração efetiva média (CE_{50-48} h) de $6,8 \text{ mg L}^{-1}$, seguido por *A. salina*, *Panagrolaimus* sp., *P. subcapitata* e *L. sativa*. Estas duas últimas espécies apresentaram valores superiores a 100 mg L^{-1} , indicando que o óleo essencial é “praticamente não tóxico” para ambos os organismos.

Uma curva referente a uma função logística foi plotada de acordo com dados de toxicidade e a frequência acumulada, o que permitiu calcular um valor de HC_5 equivalente a $0,47 \text{ mg L}^{-1}$. Entretanto, aplicando o fator de segurança, $0,09 \text{ mg L}^{-1}$ de óleo essencial de *P. aduncum*, seria a concentração-limite segura no corpo d'água a ser adotada para a preservação da biota aquática.

Essa concentração pode ser considerada um resultado preliminar, pendente de posterior avaliação ecotoxicológica de outros organismos-alvo e uma gama mais ampla de composição química do óleo essencial de *P. aduncum* para melhorar a estimativa de risco (Miura et al., 2021).

BIOINSUMOS DE ORIGEM VEGETAL DISPONÍVEIS NO BRASIL

O Brasil é um dos países que mais publica sobre propriedades bioativas de plantas e derivados, entretanto, esse sucesso não se reflete no registro de produtos botânicos no Brasil. Pelo contrário, o país destaca-se mundialmente pela morosidade e pelo alto custo do sistema regulatório para pesticidas (Isman, 2015, 2020).

O aplicativo Bioinsumos, resultado do Programa Nacional de Bioinsumos, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), que busca consolidar um catálogo nacional de bioinsumos para facilitar e promover o acesso a informações sobre os produtos disponíveis para uso e onde encontrá-los, foi desenvolvido em parceria com a Embrapa Informática Agropecuária. Por meio desse aplicativo, é possível encontrar apenas informações sobre os inoculantes e os produtos para controle de pragas registrados, que estão em conformidade com o conceito de bioinsumos para a agricultura orgânica e outros sistemas produtivos. A seguir, na Tabela 20.1, estão descritos os produtos à base de plantas contidos no aplicativo, além daqueles classificados como para agricultura orgânica no Agrofit (2021).

Além desses produtos já listados, ao realizar uma busca no Agrofit (2021) por inseticidas de classificação ambiental IV (produto pouco perigoso ao meio ambiente), é possível recuperar outros 12 inseticidas de origem vegetal: azadiractina (dois produtos), extrato de sementes de *Sophora flavescens* (um produto) e óleos vegetais (nove produtos). Esses produtos estão registrados para diferentes espécies de insetos e ácaros de diversas culturas (AGROFIT, 2021).

Tabela 20.1. Bioinsumos de origem vegetal para uso na agricultura orgânica registrados no Mapa (Agrofit, 2021)

Classe do produto	Marca	Empresa	Defensivo biológico	Registro no Mapa	Praga	
					Nome científico	Nome(s) comum(ns)
Inseticida (formicida)	Bioisca	Cooperativa dos cafeicultores e agropecuaristas (Cocapec)	Tefrósia (flavonas saponínicas do tipo rotenoides)	4712	<i>Atta laevigata</i>	Saúva cabeça de vidro; saúva de vidro
					<i>Atta sexdens rubropilosa</i>	Saúva limão; saúva vermelha
Inseticida e fungicida	Agroneem	Agrovant Comércio de Produtos Agrícolas Ltda.	Azadiractina (tetranortriterpenoide)	25118	<i>Bemisia argentifolli</i>	Mosca branca
					<i>Erysiphe polygoni</i>	Oídio do cajueiro; oídio do feijoeiro
Inseticida e fungicida	Azact CE	Luiz Arthur Curi e Silva Agronegócios – EPP	Azadiractina (tetranortriterpenoide)	8015	<i>Bemisia argentifolli</i>	Mosca branca
					<i>Bemisia tabaci</i>	Mosca branca
					<i>Erysiphe polygoni</i>	Oídio do cajueiro; oídio do feijoeiro
Inseticida e fungicida	Fitoneem	Dalneen Brasil Comércio de Produtos Agropecuários Ltda	Azadiractina (tetranortriterpenoide)	6718	<i>Bemisia argentifolli</i>	Mosca-branca
					<i>Bemisia tabaci</i>	Mosca-branca
					<i>Erysiphe polygoni</i>	Oídio do cajueiro; oídio do feijoeiro
Inseticida e fungicida	Bioexos	Biotrop Soluções Biológicas e Participações	Azadiractina (tetranortriterpenoide)	13820	<i>Erysiphe polygoni</i>	Oídio do cajueiro; oídio do feijoeiro
					<i>Bemisia tabaci</i>	Mosca branca
					<i>Bemisia argentifolli</i>	Mosca branca

Apesar da pouca quantidade de ingredientes ativos registrados, diversas recomendações utilizando preparações botânicas simples podem ser encontradas em páginas governamentais (Brasil, 2021), o que ressalta a necessidade de se trabalhar a questão do sistema regulatório para pesticidas de origem vegetal no país.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em razão dos problemas acarretados à saúde humana e ao meio ambiente pelo uso intensivo de agrotóxicos sintéticos, a busca por produtos alternativos e tecnologias mais saudáveis vem sendo fortemente demandada.

Embora existam inúmeros trabalhos na literatura reportando o uso de produtos de origem botânica como potentes bioinseticidas, pouquíssimos produtos de origem vegetal estão disponíveis comercialmente. Informações para registrar agrotóxicos classificados como produtos biológicos, bioquímicos e semioquímicos para uso na agricultura estão disponíveis em página do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento na internet¹. Entre vários outros documentos, os seguintes são necessários: i) avaliação qualitativa e quantitativa da composição do produto, indicando a concentração do ingrediente ativo biológico e os limites máximos e mínimos dos demais componentes e suas funções específicas; e ii) informações sobre o modo de ação do produto sobre os organismos alvo. Como os princípios ativos dos produtos de origem botânica são normalmente compostos por um complexo conjunto de substâncias, o registro de produtos preparados a partir de plantas torna-se custoso, sendo um empecilho para as pequenas e médias empresas. Além disso, há necessidade de elaboração de uma nova instrução normativa conjunta (INC) (Mapa/Ibama/Anvisa) para normatizar diferenciadamente e simplificar o registro de produtos agrotóxicos de derivados vegetais.

Adicionalmente, muitos desses produtos de origem botânica apresentam alta suscetibilidade a fotodegradação, oxidação abiótica ou perda por volatilização e, portanto, apresentam pouca estabilidade quando aplicados em condições de campo. Para solucionar esse problema, a nanotecnologia vem sendo empregada como alternativa para aumentar a eficiência e a persistência desses produtos. Assim, pesquisas nesse sentido devem ser incentivadas e apoiadas.

Outro impedimento para a adoção de produtos à base de plantas é a necessidade de realizar o cultivo em larga escala dessas espécies vegetais para a obtenção dos compostos necessários. Nesse sentido, uma alternativa seria a utilização de compostos originados de partes vegetais descartadas de outras cadeias, como o óleo essencial obtido da casca dos frutos de citros. Outra opção é por meio do apoio aos pequenos e médios produtores para que cultivem as espécies de interesse de maneira sustentável, pois, assim, haverá maior renda para os produtores e menor dependência de insumos importados.

¹ Disponível em: <https://www.gov.br/pt-br/servicos/registrar-agrotoxicos-classificados-como-produtos-biologicos-microbiologicos-bioquimicos-e-semioquimicos-para-uso-na-agricultura>

Contudo, o Brasil tem um enorme potencial de crescimento no desenvolvimento de bioinsumos, pois abriga a maior biodiversidade do planeta e é, ao mesmo tempo, um dos maiores produtores de commodities do mundo.

Desde o lançamento do Programa Nacional de Bioinsumos em 2020, houve um significativo avanço no desenvolvimento e registro de novos bioinsumos, embora a maioria seja à base de produtos microbiológicos. Também se observou, no Brasil, grande avanço no volume de startups ligadas ao agronegócio. Assim, a solução para atender à demanda por novos bioinsumos é a partir da inovação aberta, que envolve não apenas startups, mas também parcerias em rede entre o setor privado com centros de pesquisa e universidades.

Com isso, espera-se contribuir para a inovação do agronegócio, agregando valor e aumento da produtividade; por meio da inovação aberta, aumentar o volume de startups e parcerias com empresas; agregar valor aos produtos de base científica, gerados pelos projetos de pesquisas desenvolvidas pela Embrapa, mas que precisam de validação e finalização antes de entrar para o mercado; por apresentar baixa toxicidade e ser biodegradável, esse tipo de produto promove a agricultura sustentável quando comparado com os defensivos agrícolas convencionais e não biológicos, aumentando a aceitação pela sociedade dos produtos agrícolas; por meio dos conceitos da bioeconomia, agregar valor sobre a exploração sustentável da biodiversidade brasileira, por meio do desenvolvimento e da oferta aos produtores de novos ativos de base biológica, reduzir os custos dos sistemas de produção, aumentar as margens de lucro, principalmente dos pequenos e médios produtores, desenvolver tecnologias cada vez mais sustentáveis em cima de um modelo cada vez mais local, regional do território e do bioma.

REFERÊNCIAS

- ABD-ELGAWAD, A. M.; GENDY, A. E-N. G. E.; ASSAEED, A. M.; ROWAILY, S. L.; ALHARTHI, A. S.; MOHAMMED, T. A.; NASSAR, M. I.; DEWIR, Y.; ELSHAMY, A. I. Phytotoxic Effects of Plant Essential Oils: A Systematic Review and Structure-Activity Relationship Based on Chemometric Analyses. *Plants*, v.10(1), 2021. DOI: <https://dx.doi.org/10.3390/plants10010036>.
- ABDOLAHY, A.; HASSANI, A.; GHOSTA, Y.; JAVADI, T.; MEKSHKATALSADAT, M. H. Essential oils as control agents of postharvest *Alternaria* and *Penicillium* rots on tomato fruits. *Journal of Food Safety*, v.30, p. 341-352, 2010.
- AGROFIT – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitário, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2021. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/primeira_pagina/extranet/AGROFIT.html. Acesso em: 12 ago. 2021.
- AHSAEI, S. MOHAMMAD; TALEBI-JAHROMI, K.; AMOABEDINY, G. Insecticidal activity of polycaprolactone nanoparticles decorated with chitosan containing two essential oils against *Tribolium confusum*, *International Journal of Pest Management*, 2020. DOI: <https://dx.doi.org/10.1080/09670874.2020.1825875>.
- ALKILANI, A. Z.; HAMED, R.; AL-MARABEH, S.; KAMAL, A.; ABU-HUWAIJ, R.; HAMAD, I. Nanoemulsion-based film formulation for transdermal delivery of carvedilol. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 46, p. 122-128, 2018. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2018.05.015>.
- ARAMBAWATTA-LEKAMGE, S. H.; PATHIRATNE, A.; RATHNAYAKE, V. N. Sensitivity of freshwater organisms to cadmium and copper at tropical temperature exposures: derivation of tropical freshwater ecotoxicity thresholds using species sensitivity distribution analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 211. 2021. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.111891>.
- BAJAPI, V. K.; KANG, S. C. In vitro and In vivo inhibition of plant pathogenic fungi by essential oil and extracts of *Magnolia liliflora* Desr. *Journal of Agriculture and Science Technology*, v. 14, p. 845-856, 2012.
- BÁRTÍKOVÁ, H.; PODLIPNÁ, R.; SKÁLOVÁ, L. Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants. *Chemosphere* v. 144, p. 2290–2301, 2016. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.137>.
- BENELLI, G.; PAVELA, R.; MAGGI, F.; PATRELLI, R.; NICOLETTI, M. J. Commentary: Making Green Pesticides Greener? The Potential of Plant Products for Nanosynthesis and Pest Control. *Journal of Cluster Science*, v. 28, p. 3-10, 2017. DOI: <https://dx.doi.org/10.1007/s10876-016-1131-7>.
- BENELLI, G.; PAVONI, L.; ZENI, V.; RICCIARDI, R.; COSCI, F.; CACOPARDO, G.; GENDUSA, S.; SPINOZZI, E.; PETRELLI, R.; CAPPELLACCI, L.; MAGGI, F.; PAVELA, R.; BONACUCINA, G. Developing a Highly Stable *Carlina acaulis* Essential Oil Nanoemulsion for Managing *Lobesia botrana*. *Nanomaterials*, v. 10, p. 1867, 2020. DOI: <https://dx.doi.org/10.3390/nano10091867>.
- BONIN, M. C. B.; PENTEADO, A. L.; QUEIROZ, S. C. N. Avaliação da atividade de misturas de ácidos orgânicos e substâncias isoladas de óleos essenciais frente à *Streptococcus agalactiae* In: 15º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC, 2021, Campinas, *Anais...Campinas: Embrapa Meio Ambiente*, 2021. p. 1-2.

- CELOTO, M. I. B.; PAPA, M. F. S.; SACRAMENTO, L. V. S.; CELOTO, F. J. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 30, n. 1, p. 1-5, 2008.
- CERDEIRA, A. L.; CANTRELL, C. L.; DAYAN, F. E.; BYRD, J. D.; DUKE, S. O. Tabanone, a New Phytotoxic Constituent of Cogongrass (*Imperata cylindrica*). *Weed Science*, v. 60, n. 2, p. 212-218, 2012.
- CORRAL, A. C. T.; DE QUEIROZ, M. N.; DE ANDRADE-PORTO, S. M.; MOREY, G. A. M.; CHAVES, F. C. M.; FERNANDES, V. L. A.; ONO, E. A.; AFFONSO, E. G. Control of *Hysterothylacium* sp. (Nematoda: Anisakidae) in juvenile pirarucu (*Arapaima gigas*) by the oral application of essential oil of *Piper aduncum*. *Aquaculture*, v. 494, p. 37-44, 2018. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.062>.
- CORREA, J. C. R.; SALGADO, H. R. N. Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 13, p. 500-506, 2011.
- DAL PICOLO, C.R., BEZERRA, M.P., GOMES, K.S.; PASSERO, L.F.D.; LAURENTI, M.D.; MARTINS, E.G.A.; SARTORELLI, P.; LAGO, J.H.G. Antileishmanial activity evaluation of adunchalcone, a new prenylated dihydrochalcone from *Piper aduncum* L. *Fitoterapia*, v. 97, p. 28-33, 2014. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2014.05.009>.
- DAYAN, F. E.; CANTRELL, C. L.; DUKE, S. O. Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 17, p. 4022-4034, 2009. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2009.01.046>.
- DAYAN, F. E.; DUKE, S. O. Discovery for New Herbicide Sites of Action by Quantification of Plant Primary Metabolite and Enzyme Pools. *Engineering*, v. 6, n. 5, p. 509-514, 2020. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.eng.2020.03.004>.
- DAYAN, F. E.; HERNANDEZ, A.; ALLEN, S. N.; MORAES, R. M.; VROMAN, J. A.; AVERY, M. A.; DUKE, S. O. Comparative phytotoxicity of artemisinin and several sesquiterpene analogues. *Phytochemistry*, v. 50, p. 607-614, 1999. DOI: [https://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00568-8](https://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00568-8).
- DEQUECH, S. T. B.; SAUSEN, C. D.; LIMA, C.G.; EGEWARTH, R. Efeito de extratos de plantas com atividade inseticida no controle de Stal (Col.: Chrysomelidae), em laboratório. *Revista Biotemas*, Santa Maria, p. 22-31, 2008.
- DORIGHELLO, D.V.; BETTIOL, W.; MAÍÁ, N.B.; LEITE, R.M.V.B.C. Controlling Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) with *Bacillus* spp. and coffee oil. *Crop Protection*, v. 67, p. 59-65, 2015. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2014.09.017>.
- DUKE, S. O.; COPPING, L. G. Natural products that have been used commercially as crop protection agents. *Pest Management Science*, v. 63, p. 524-554, 2007. DOI: <https://dx.doi.org/10.1002/ps.1378>.
- DUKE, S. O.; DAYAN, F. E.; RIMANDO, A. M. Natural products as tools for weed management. *Proceedings of the Japanese Weed Science Society*, suppl. 1, p. 1-11, 1998.
- DUKE, S. O.; DAYAN, F. E.; RIMANDO, A. M. SCHRADER, K. K.; ALIOTTA, G.; OLIVA, A.; ROMAGNI, J. G. Chemicals from nature for weed management. *Weed Science*, v.50, 138-151, 2002. DOI: [https://dx.doi.org/10.1614/0043-1745\(2002\)050\[0138:IPCFNF\]2.0.CO;2](https://dx.doi.org/10.1614/0043-1745(2002)050[0138:IPCFNF]2.0.CO;2).

ELSHAFIE, H. S.; CAMELE, I. Investigating the effects of plant essential oils on postharvest fruit decay. In: Sultan, Sadia. **Fungal pathogenicity**. IntechOpen, 2016. Cap. 5. DOI: <https://dx.doi.org/10.5772/62568>.

ELSHAFIE, H.S.; MANCINI, E.; DE MARTINO, L.; PELLEGRINO, C.; DE FEO, V.; CAMELE, I. Antifungal activity of some constituents of *Origanum vulgare* L. essential against post-harvest disease of peach fruit. **Journal of Mediterranean Food**, v.18, n.8, p. 929-934, 2015.

FORIM, M. R.; COSTA, E. S.; SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; MONDEGO, J. M.; BOIÇA JUNIOR, A. L. Development of a New Method To Prepare Nano-/microparticles Loaded with Extracts of *Azadirachta indica*, Their Characterization and Use in Controlling *Plutella xylostella* J. **Agric. Food Chem.**, v. 61, p. 9131-9139, 2013. DOI: <https://dx.doi.org/10.1021/jf403187y>.

FRANZENER, G.; STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S. Atividade antifúngica e indução de resistência em trigo a *Bipolaris sorokiniana* por *Artemisia camphorata*. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 25, n. 2, p. 503-507, 2003. DOI: <https://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v25i2.2124>.

GAÍNZA, Y.A.; FANTATTO, R.R.; CHAVES, F.C.L.; BIZZO, H.R.; ESTEVES, S.N.; CHAGAS, A.C.S. *Piper aduncum* against *Haemonchus contortus* isolates: cross resistance and the research of natural bioactive compounds. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 25, p. 383-393, 2016. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612016073>.

GODOY, C. V. Risk and management of fungicide resistance in the Asian soybean rust fungus *Phakopsora pachyrhizi* In: THIND, T.S. (Ed.). **Fungicide resistance in crop protection: risk and management**. London: CABI, 2012. p. 87-95. DOI: <https://dx.doi.org/10.1079/9781845939052.0087>.

GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D. S.; SOARES, R. M.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; MEYER, M. C.; COSTAMILAN, L. M. Asian soybean rust in Brazil: past, present, and future. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, p. 407-421, 2016. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2016000500002>.

GODOY, C. V.; UTIAMADA, C. M.; MEYER, M. C.; CAMPOS, H. D.; FORCELINI, C. A.; PIMENTA, C. B.; CASSETARI NETO, D.; JACCOUD FILHO, D. S.; BORGES, E. P.; ANDRADE JUNIOR, E. R. de; SIQUERI, F. V.; JULIATTI, F. C.; FEKSA, H. R.; GRIGOLLI, J. F. J.; NUNES JUNIOR, J.; CARNEIRO, L. C.; SILVA, L. H. C. P. da; SATO, L. N.; CANTERI, M. G.; MADALOSSO, M.; GOUSSAIN, M.; MARTINS, M. C.; BALARDIN, R. S.; FURLAN, S. H.; MONTECELLI, T. D. N.; CARLIN, V. J.; VENANCIO, W. S. **Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem asiática da soja, Phakopsora pachyrhizi**, na safra 2014/15: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Embrapa Soja: Londrina, 2015. 6 p. (Embrapa Soja. Circular técnica, III).

HENKEL, T; BRUNNE, R. M.; MULLER, H.; REICHEL, F. Statistical investigation into the structural complementarity of natural products and synthetic compounds. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 38, p. 643-647, 1999. DOI: [https://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19990301\)38:5<643::AID-ANIE643>3.0.CO;2-G](https://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19990301)38:5<643::AID-ANIE643>3.0.CO;2-G).

ISMAN, M. B. A renaissance for botanical insecticides? **Pest Management Science**, v. 71, p. 1587-1590, 2015. DOI: <https://dx.doi.org/10.1002/ps.4088>.

ISMAN, M. B. Bridging the gap: Moving botanical insecticides from the laboratory to the farm. **Industrial Crops & Products**, v. 110, p. 10-14, 2017. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.07.012>.

ISMAN, M. B. 2020. Botanical Insecticides in the Twenty-First Century—Fulfilling Their Promise? **Annual Review of Entomology** 65:233-249. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011019-025010>. Acesso em: 11 ago. 2021.

JONSSON, C. M.; SILVA, M. S. G. M.; MACEDO, V. S.; DANTZGER, D. D.; VALLIM, J. H.; MARIGO, A. L. S.; AOYAMA, H. Prediction of a low-risk concentration of diflubenzuron to aquatic organisms and evaluation of clay and gravel in reducing the toxicity. **Pan American Journal of Aquatic Sciences**, v. 10, p. 259-272, 2015.

KANAOK, N.; FIUZA, L. M. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 5, p. 120-132, 2010. DOI: <https://dx.doi.org/10.4013/nbc.2010.52.08>.

KHAN, S.; TANING, C. N. T.; BONNEURE, E.; MANGELINCKX, S.; SMAGGHE, G.; SHAH, M. M. Insecticidal activity of plant-derived extracts against different economically important pest insects. **Phytoparasitica**, v. 45, p. 113-124, 2017.

KHAN, S.; TANING, C. N. T.; BONNEURE, E.; MANGELINCKX, S.; SMAGGHE, G.; AHMAD, R.; FATIMA, N. ASIF, M.; SHAH, M. M. Bioactivity-guided isolation of rosmarinic acid as the principle bioactive compound from the butanol extract of *Isodon rugosus* against the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. **Plos One**, 24 Junho, p. 1-10, 2019. DOI: <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0215048>.

KUMAR, S.; BHANJANA, G.; SHARMA, A.; SIDHU, M. C.; DILBAGHI, N. Synthesis, characterization and on field evaluation of pesticide loaded sodium alginate nanoparticles, **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 1061-1067, 2014. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.025>.

LAZAR-BAKER, E. E.; HETHERINGTON, S. D.; KU, V. V.; NEWMAN, S. W. Evaluation of commercial essential oil samples on the growth of post-harvest pathogen *Monilinia fructicola* (G. Winter) Honey. **Lett. Applied Microbiology**, v. 52, p. 227-232, 2011. DOI: <https://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02996.x>.

LINDEL, S. D.; PATTENDEN, L. C.; SHANNON, J. Combinatorial chemistry in agrosociences. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 4035-4046. 2009. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2009.03.027>.

MALTROSE, N.A.; OBIKEZE, K.; BELAY, A.A.; CLAEB, O.J. Plant extracts and other natural products and other natural compounds as alternatives for post-harvest management of fruit fungal pathogens: A review. **Food Bioscience**, v. 41, p. 1-15, 2021. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100840>.

MAMOOD, S. N.; HIDAYATULFATHI, O.; BUDIN, S. B.; AHMAD ROHI, G.; ZULFAKAR, M. H. The formulation of the essential oil of *Piper aduncum* Linnaeus (Piperales: Piperaceae) increases its efficacy as an insect repellent. **Bulletin of the Entomological Research**, v. 107, p. 49-57, 2017. DOI: <https://dx.doi.org/10.1017/S0007485316000614>.

MANCINI, E.; CAMELE, I.; ELSHAFIE, H.S.; DE MARTINO, L.; PELEGRINO, C.; GRULOVA, D.; DE FEO, V. Chemical composition and biological activity of essential oil of *Origanum vulgare* spp. hirtum from different areas in the southern Apennines (Italy). **Chemistry & Biodiversity**, v. 11, n.4, p. 639-651, 2014. DOI: <https://dx.doi.org/10.1002/cbdv.201300326>.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Fichas Agrecológicas, Sanidade Vegetal. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sustentabilidade/organicos/fichas-agroecologicas/sanidade-vegetal>. Acesso em: 13 ago. 2021.

- MARINHO-PRADO, J.S.; MORAIS, L.A.S.; PAZIANOTTO, R.A.A. 2019. Efeito deletério de óleos essenciais sobre *Anticarsia gemmatalis* e *Helicoverpa armigera*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 87, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP. 26 p. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1115015/efeito-deleterio-de-oleos-essenciais-sobre-anticarsia-gemmatalis-e-helicoverpa-armigera>. Acesso em: 26 jul. 2021.
- MARINHO-PRADO, J.S.; QUEIROZ, S.C.N.; PRADO, S.S.; ASSIS, M.C. 2018. Bioatividade de extratos de plantas sobre lagartas de *Anticarsia gemmatalis* e *Helicoverpa armigera*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 78, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP. 26 p. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1095015/bioatividade-de-extratos-de-plantas-sobre-lagartas-de-anticarsia-gemmatalis-e-helicoverpa-armigera>. Acesso em: 26 jul. 2021.
- MIRESMALLI, S.; ISMAN, M. B. Botanical insecticides inspired by plant-herbivore chemical interactions. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 1, p. 29-35, 2014. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2013.10.002>.
- MIURA, P. T.; JONSSON, C. M. ; QUEIROZ, S. C. N. ; CHAGAS, E. C. ; CHAVES, F. C. M. ; REYES, F. G. R. Ecological risk assessment of *Piper aduncum* essential oil in non-target organisms. **Acta Amazonica**, v. 51, p. 71-78, 2021. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/1809-4392202002691>.
- MIZOBUCHI, A. L.; DA SILVA, D. R.; DE ASSIS, M. C.; MELO, I. S.; QUEIROZ, S. C. N. Avaliação da atividade antifúngica de óleos essenciais contra Magnaporthe grisea e Fusarium graminearum. In: 11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC, 2017, Campinas, **Anais...Campinas: Embrapa Meio Ambiente**, 2017, p. 1-10.
- MOLISH, H. **Der einfluss einer Pflanze auf die andere-Allelopathic**. Jena: Gustav Fisher Verlag, 1937.
- MONTEIRO, R. A.; CAMARA, M. C.; OLIVEIRA, J. L.; CAMPOS, E. V. R.; CARVALHO, L. B.; PROENÇA, P. L. F.; GUILGER-CASAGRANDE, M.; LIMA, R.; NASCIMENTO; J.; GONÇALVES, K. C.; POLANCZYK, R. A.; FRACETO, L. F., Zein based-nanoparticles loaded botanical pesticides in pest control: An enzyme stimuli-responsive approach aiming sustainable agriculture. **Journal of Hazardous Materials**, v. 417, p. 126004, 2021. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126004>.
- MORAES, R. M.; CERDEIRA, A. L.; DUKE, S. O.; CANTRELL, C. L.; QUEIROZ, SONIA C. N. **Pesticidas Naturais Derivados de Plantas: Descoberta e Usos. Defensivos Agrícolas Naturais - Uso e Perspectivas**. ed. Jaguariúna: Embrapa, 2016, p. 505-541.
- MUNHUWEYI, K., CALEB, O.J., LENOXX, C. L., VAN REENEN, A. J., OPARA, U. L. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of chitosan-essential oils against pomegranate fruit pathogens. **Postharvest Biology and Technology**, v. 129, p. 9-22, 2017. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.03.002>.
- ORŠOLIĆ, D.; PEHAR, V.; ŠMUC, T.; STEPANIĆ, V. Comprehensive machine learning based study of the chemical space of herbicides. **Scientific Reports**, v. 11, p. 11479, 2021. DOI: <https://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-90690-w>.
- PARÉ, P. W.; ZAJICEK, J.; FERRACINI, V. L.; MELO, I. S. Antifungal terpenoids from *Chenopodium ambrosioides*. **BIOCHEMICAL SYSTEMATICS AND ECOLOGY**, v. 21, n. 617, p. 649-653, 1993.
- PENTEADO, A. L.; ESCHIONATO, R. A.; DE SOUZA, D. R. C.; QUEIROZ, S. C. N. Avaliação *in vitro* de atividade antimicrobiana de óleos essenciais contra *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*. **Revista Higiene Alimentar**. 2021.

- PORTO, R. S.; RATH, S.; QUEIROZ, S. C. N. *Conyza canadensis*: Green Extraction Methods of Bioactive Compounds and Evaluation of Their Antifungal Activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, p. 1-7, 2016. DOI: <https://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20160228>.
- QUEIROZ, M. N. 2012. Efeito do extrato aquoso da *Piper aduncum* L no controle de parasitas monogenéticos (*Platyhelminthes: Monogenoidea*) e parâmetros fisiológicos do pirarucu *Arapaima gigas* (SCHINZ 1822). **Dissertação de Mestrado em Agricultura**, INPA/Uninilton, Manaus, Amazonas, 2012. 84p.
- QUEIROZ, S. C. N.; CANTRELL, C. L.; DUKE, S. O.; WEDGE, D. E.; NANDULA, V. K.; MORAES, R. M.; CERDEIRA, A. L. Bioassay-Directed Isolation and Identification of Phytotoxic and Fungitoxic Acetylenes from *Conyza canadensis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 5893-5898, 2012. DOI: <https://dx.doi.org/10.1021/jf3010367>.
- RAHMAN, M. U.; GUL, S. *Mycotoxic Effects of Thymus serpyllum* oil on the asexual reproduction of *Aspergillus* species. **Journal of Essential Oils**, v. 15, 166-171, 2003. DOI: <https://dx.doi.org/10.1080/10412905.2003.9712104>.
- RICE, E. L. Allelopathy. New York: **Academic Press**, 1974. 353 p.
- RICE, E. L. Allelopathy. 2. ed. Orlando: **Academic Press**, 1984. 422 p.
- SEIBER, J. N.; COATS, J.; DUKE, S. O.; GROSS, A. D. Biopesticides: State of Art and Future Opportunities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 62, p. 11613-11619, 2014. DOI: <https://dx.doi.org/10.1021/jf504252n>.
- SILVA-BUZANELLO, R. A.; FERRO, A. C.; BONA, E.; CARDOSO-FILHO, L.; ARAÚJO, P. H. H.; LEIMANN, F. V.; GONÇALVES, O. H. Validation of an Ultraviolet-visible (UV-Vis) technique for the quantitative determination of curcumin in poly(L-lactic acid) nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 172, p. 99-104, 2015. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.016>.
- SINGH, R. P.; HANDA, R.; MANCHANDA, G. Nanoparticles in sustainable agriculture: An emerging opportunity. **Journal of Controlled Release**, v. 329, p. 1234-1248. 2021. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.10.051>.
- SOARES, M. P.; CARDOSO, I. L.; ISHIKAWA, M. M.; OLIVEIRA, A. S. S.; SARTORATTO, A.; JONSSON, C. M.; QUEIROZ, S. C. N.; DUARTE, M. C.; RANTIN, F. T.; SAMPAIO, F. G. Effects of *Artemisia annua* alcohol extract on physiological and innate immunity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to improve health status. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 105, p. 369-377, 2020. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2020.07.035>.
- SOARES, M. P.; PINHEIRO, V. R.; CARDOSO, I. L.; OLIVEIRA, A. S. S.; SARTORATTO, A.; ISHIKAWA, M. M.; JONSSON, C. M.; DUARTE, M. C. RANTIN, F. T.; SAMPAIO, F. G.; *In vitro* antibacterial activity of ethanol extract of *Artemisia annua* and its bioactive fractions against fish pathogens. **Aquaculture Research**, v.52, p. 1797-1801, 2020. DOI: <https://dx.doi.org/10.1111/are.15026>.
- SOUZA, A. E. F.; ARAÚJO, E.; NASCIMENTO, L. C. Atividade antifúngica de extratos de alho e capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolado de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 6, p. 465-471, 2007. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582007000600003>.
- SPLETOZER, A.G.; SANTOS, C.R. DOS; SANCHES, L.A.; GARLET, J. 2021. Plantas com potencial inseticida: enfoque em espécies amazônicas. **Ciência Florestal**, v. 31, n. 2, p. 974-997. DOI: <https://dx.doi.org/10.5902/1980509832244>.

STADNIK, M. J.; BETTIOL, W.; SAITO, M. L. Bioprospecting for plant and fungus extracts with systemic effect to control the cucumber powdery mildew. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 110, p. 383-393, 2003.

STADNIK, M. J.; BETTIOL, W. Association between lipoxygenase and peroxidase activity and systemic protection of cucumber plants against *Podospaera xanthii* induced by *Oudemansiella canarii* extracts. **Journal of Plant Diseases and Protection**. v. 114, p. 9-13. 2007.

STOYTICHEVA, M. **Pesticides in the Modern World: Effects of Pesticides Exposure**. Croatia: InTechOpen, 2011. DOI: <https://dx.doi.org/10.5772/943>.

SWANTON, C. J.; MASHHADI, H. R.; SOLOMON, K. R.; AFIFI, M. M., DUKE, S. Similarities between the discovery and regulation of pharmaceuticals and pesticides: in support of a better understanding of the risks and benefits of each. **Pest Manag Sci**, v. 67, p. 790-797, 2011. DOI: <https://dx.doi.org/10.1002/ps.2179>.

TABAN, A.; SAHARKHIZ, M. J.; NADERI, R. A natural post-emergence herbicide based on essential oil encapsulation by cross-linked biopolymers: characterization and herbicidal activity. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 36, p. 45844-45858, 2020. DOI: <https://dx.doi.org/10.1007/s11356-020-10405-y>.

TERAO, D., QUEIROZ, S. C. N., NECHET, K. L., HALFELD-VIEIRA, B. A. **Métodos de controle alternativo do bolor-verde em laranja**. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 18 p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos 125), 2020.

TRAAS, T. P.; VAN LEEUWEN, C. J. Ecotoxicological effects. In VAN LEEUWEN, C. J.; VERMEIRE, T. G., eds, **Risk Assessment of Chemicals: An Introduction**, 2nd ed. Springer, Dordrecht, The Netherlands, p. 281-356, 2007.

UMETSU, N.; SHIRAI, Y. Development of novel pesticides in the 21 st century, **J. Pest. Sci.**, v. 45, p. 54-74, 2020). DOI: <https://dx.doi.org/10.1584/jpestics.D20-201>.

YANG, F.-L.; LI, X.-G.; ZHU, F.; LEI, C.-L. Structural Characterization of Nanoparticles Loaded with Garlic Essential Oil and Their Insecticidal Activity against *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). **J. Agric. Food Chem.** v. 57, p. 10156-10162, 2009. DOI: <https://dx.doi.org/10.1021/jf9023118>.

YU, C. S.; WANG, Q.; BAJSA-HIRSCHL, J.; CANTRELL, C. L.; Duke, S. O.; Liu, X-H. Synthesis, Crystal Structure, Herbicidal Activity, and SAR Study of Novel N-(Arylmethoxy)-2-chloronicotinamides Derived from Nicotinic Acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 69, n. 23, p. 6423-6430, Jun 2021. DOI: <https://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07538>.

ZHOU, C.; LUO, X.; CHEN, N.; ZHANG, L.; GAO, J. C-P Natural Products as Next-Generation Herbicides: Chemistry and Biology of Glufosinate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 68, n. 11, p. 3344-3353, Mar 2020. DOI: <https://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00052>.

WANG, Y., ZHANG, L., FENG, Y., ZHANG, D., GUO, S., PANG, X. Comparative evaluation of the chemical composition and bioactivities of essential oils from four spice plants (Lauraceae) against stored-product insects. **Industrial Crops and Products**. v. 140, p. 111640, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/>

WHO - World Health Organization. **Antimicrobial resistance**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Acesso em 30 ago. 2021.