

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS
MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS**

LUANA BUDNY NIERO

**ANÁLISE DOS EXTRATOS DE *Allamanda cathartica* E SÍNTESE DE DERIVADOS
ALCALOÍDICOS VISANDO ATIVIDADE BIOLÓGICA**

CRICIÚMA

2024

LUANA BUDNY NIERO

**ANÁLISE DOS EXTRATOS DE *Allamanda cathartica* E SÍNTESE DE DERIVADOS
ALCALOÍDICOS VISANDO ATIVIDADE BIOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Área de Concentração: Ecologia e Gestão de Ambientes Alterados

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Patrícia de Aguiar Amaral

Coorientador: Prof. Dr. Nicolas Gouault

CRICIÚMA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

N676a Niero, Luana Budny.

Análise dos extratos de *Allamanda cathartica* e síntese de derivados alcaloídicos visando atividade biológica / Luana Budny Niero. - 2024.
136 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Criciúma, 2024.

Orientação: Patrícia de Aguiar Amaral.
Coorientação: Nicolas Gouault.

1. Alamanda. 2. Biopesticida. 3.
Fitoquímicos. 4. Antioxidantes. I. Título.

CDD 23. ed. 583.93

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
 Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação, Inovação e Extensão
 Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação Stricto Sensu
 Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata da DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO de LUANA BUDNY NIERO. Aos sete dias do mês de fevereiro de dois mil e vinte e quatro, às quatorze horas, reuniram-se de forma remota conforme RESOLUÇÃO N. 02/2020/PPGCA que estabelece procedimento para a Defesa de Dissertação e de Tese do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais por meio de videoconferência, os membros da Comissão Examinadora composta pelos professores: **Dra. Patrícia de Aguiar Amaral** (Presidente e Orientadora), **Dr. Carlyle Torres Bezerra de Menezes** (Membro – UNESC) e **Dra. Simone Cristina Baggio Gnoatto** (Membro Externo – UFRGS), designados pela Portaria 01/24, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, a fim de argüirem a Dissertação de Mestrado de **LUANA BUDNY NIERO**, subordinada ao título: “**Análise dos extratos de *Allamanda cathartica* e síntese de derivados alcalóidicos visando atividade biológica**”, Aberta à sessão pela Presidente da mesma, coube a candidata, sob a forma regulamentar, expor o tema de sua Dissertação, findo o que, dentro do tempo regulamentar, foi questionada pelos membros da Comissão Examinadora e, em seguida, procedeu às explicações que se faziam necessárias. Após esse procedimento, a Comissão Examinadora reuniu-se individualmente, para a avaliação final da candidata. Retomando à sessão, a Presidente, lendo o Termo de Apresentação de Dissertação, declarou **LUANA BUDNY NIERO aprovada**.
ALTERAÇÕES SUGERIDAS PELA COMISSÃO EXAMINADORA:

Incluir informações sobre o mecanismo de fungos e atividade citotoxicidade no referencial teórico.

COMISSÃO EXAMINADORA:

Documento assinado digitalmente
 PATRICIA DE AGUIAR AMARAL
 Data: 07/02/2024 16:50:29-0300
 Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. Patricia de Aguiar Amaral
 Presidente e Orientadora

Documento assinado digitalmente
 CARLYLE TORRES BEZERRA DE MENEZES
 Data: 07/02/2024 17:13:30-0300
 Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. Carlyle Torres Bezerra De Menezes
 Membro – UNESC

Documento assinado digitalmente
 SIMONE CRISTINA BAGGIO GNOATTO
 Data: 07/02/2024 18:24:17-0300
 Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. Simone Cristina Baggio Gnoatto
 Membro Externo – UFRGS

Documento assinado digitalmente
 LUANA BUDNY NIERO
 Data: 07/02/2024 17:01:47-0300
 Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Luana Budny Niero
 Candidata

Criciúma/SC, 07 de fevereiro de 2024.

*Aos meus pais, Everaldo e Giovania, por todo
suporte nestes anos de estudo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, aos meus pais Everaldo Niero e Giovania Budny Niero, por me darem suporte para concluir mais esta etapa e realizar meus sonhos.

Agradeço ao meu namorado, Daniel Paulo Bortoluzzi, por me acompanhar nestes anos de mestrado. Obrigado pelo apoio, companheirismo e pelos momentos de descontração.

À professora Dra. Patrícia de Aguiar Amaral, por me orientar durante a iniciação científica, TCC e agora no mestrado, sendo o apoio nos meus primeiros passos na pesquisa. Obrigada pelos ensinamentos e pela amizade!

Ao professor Dr. Nicolas Gouault, por me coorientar e por contribuir com o desenvolvimento da rota sintética. Um grande químico que me ensinou muitas coisas.

À minha colega de laboratório, Dra. Deise Parolo Tramontin, por me ajudar na execução de alguns dos experimentos, e encaminhar minhas amostras para Universidade Federal de Santa Catarina para o doseamento por CG/MS. Obrigada pelo apoio e pelas descontrações!

À professora Dra. Simone Gnoatto pelas análises instrumentais realizadas na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Ao professor Dr. Eduardo Varejão, da Universidade Federal de Viçosa, por contribuir com os testes em *Botrytis cinerea*.

Ao professor Dr. Diogo André Pilger e sua aluna Julia Willig, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelos testes citotóxicos.

Ao Laboratório de Plantas Mediciniais (LaPlaM), que me acolheu desde a iniciação científica até este momento. No laboratório, eu cresci, vivenciei momentos muito felizes e fiz amizades!

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC), pela bolsa de mestrado a mim concedida.

Aos professores que aceitam avaliar estes trabalho, Dr. Carlyle Torres Bezerra De Menezes, Dra. Simone Gnoatto e Dra. Flávia Karine Rigo.

À todos aqueles que de alguma forma estiveram presentes durante estes dois anos. Todos de alguma forma contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional.

E agradeço à Deus, por me guiar nos melhores caminhos e permitir a realização deste sonho.

"Um cientista no seu laboratório não é apenas um técnico: é, também, uma criança colocada à frente de fenômenos naturais que impressionam como se fossem um conto de fadas."

Marie Curie

RESUMO

O uso acentuado de agrotóxicos tem levado a diversos problemas nos ecossistemas, no meio ambiente e na saúde humana. A grande exposição a esses agentes tem ocasionado o surgimento de diversas doenças, como o câncer, e tem afetado a segurança alimentar da população. Muitas pragas agrícolas, como o fungo *Botrytis cinerea*, tem apresentado resistência a diversos agrotóxicos em diversas culturas. O grande consumo de alimentos contaminados leva a perda da segurança alimentar, esta que, é um dos grandes objetivos do desenvolvimento sustentável das Nações Unidas (ODS). Uma das alternativas ao uso excessivo de agrotóxicos, são os biopesticidas, produtos originários de organismo vivos, como plantas, microorganismos e animais. As plantas são fontes importantes de biomoléculas, e entre as plantas nativas brasileiras que apresenta grande potencial para esta finalidade está a *Allamanda cathartica*. Alguns alcaloides foram identificados em seus galhos e, estes podem ser de grande interesse no desenvolvimento de biopesticidas e novos fármacos anticâncer. Levando em consideração estes fatores, esta pesquisa se propõe a produzir extratos brutos etanólicos das flores, folhas e galhos da planta e sintetizar um alcaloide identificado em *A. cathartica* e análogos, aplicados ao controle de *Botrytis cinerea* e a atividade citotóxica em células tumorais. Para os extratos de *A. cathartica*, flores, folhas e galhos saudáveis foram colhidos no mês de fevereiro de 2023 no horto florestal da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), Criciúma/SC, Brasil. Os exemplares foram extraídos na proporção 1:15 em etanol 70 % por 7 dias, separadamente. Os doseamentos dos extratos por espectroscopia UV/Vis revelou a presença nas flores, folhas e galhos, respectivamente de 3,352; 4,112; e 2,086 mg ENIC/g de alcaloides; 14,756; 29,537; e 5,318 mg EQU/g de flavonoides; 16,149; 34,839; 13,635 e mg EAG/g de polifenóis e 0,360; 0,955; e 0,319 mg EAT/g de taninos totais. Por CLAE/UV, de forma geral, os três compostos identificados com maior concentração na espécie foram o Kaempferol, Quercetina 3- β -glicosídeo e Rutina. Por CG/MS a maioria dos compostos encontrados tratam-se de ésteres de ácido graxo ou ésteres etílicos de ácido graxo de cadeia longa. A capacidade antioxidante dos extratos foi maior para os extratos realizados a partir das folhas (247,652 μ M ET/g (ABTS); 108,250 μ M ET/g (DPPH)) e das flores (170,282 μ M ET/g (ABTS); 114,917 μ M ET/g (DPPH)). Sobre a atividade biológica, em altas concentrações (> 500 mg/L), os extratos podem ser tóxicos para o microcustráceo *Daphnia magna*. Em nível citotóxico, os extratos se apresentaram, seguros, necessitando de altas concentrações (> 800 μ g/mL para flores e folhas e > 500 μ g/mL para galhos) para causar dano à células saudáveis (Vero). Em células tumorais, os extratos das flores (em K-562, HeLa, SiHa) e folhas (em K-562, MCF-7, HeLa, SiHa), apresentaram resultados interessantes. Em relação a atividade biopesticida, os extratos na concentração de 10 mg/mL não foram capazes de gerar resultados antifúngicos em *Botrytis cinerea*. Para a obtenção dos compostos, foram propostas duas rotas sintéticas. A rota sintética para a síntese do alcaloide do tipo *Allamanda* foi composta por três etapas: I) *O*-Benzoilação de hidroxilamina *N*-protegida, II) Desproteção *N*-Boc da hidroxilamina e III) Formação de amida de Weinreb, com rendimentos de 98, 92 e 84 %, respectivamente. A rota sintética proposta para a síntese dos análogos foi composta de duas etapas: I) Formação de amida de Weinreb e II) Hidrogenólise, com rendimentos de 65 % e 99 %. Na avaliação citotóxica, em células tumorais K-562 e SiHa, os análogos apresentaram boa atividade citotóxica com bons índices de seletividade. As rotas sintéticas propostas foram eficientes e proporcionaram bons rendimentos.

Palavras-chave: biopesticida; antioxidante; citotóxico; compostos fitoquímicos.

ABSTRACT

The increased use of pesticides has led to various problems in ecosystems, the environment and human health. Heavy exposure to these agents has led to the emergence of various diseases, such as cancer, and has affected the population's food security. Many agricultural pests, such as the fungus *Botrytis cinerea*, have shown resistance to various pesticides in different crops. The widespread consumption of contaminated food leads to a loss of food security, which is one of the main objectives of the United Nations' Sustainable Development Goals (SDGs). One of the alternatives to the excessive use of pesticides are biopesticides, products that originate from living organisms such as plants, microorganisms and animals. Plants are important sources of biomolecules, and among the native Brazilian plants with great potential for this purpose is *Allamanda cathartica*. Some alkaloids have been identified in its stems and these could be of great interest in the development of biopesticides and new anti-cancer drugs. Considering these factors, this research aims to produce ethanolic crude extracts of the flowers, leaves and stems of the plant and synthesize an alkaloid identified in *A. cathartica* and analogues, applied to the control of *Botrytis cinerea* and cytotoxic activity in tumor cells. For the *A. cathartica* extracts, healthy flowers, leaves and stems were collected in February 2023 from the forest garden of the Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), Criciúma/SC, Brazil. The specimens were extracted in a 1:15 ratio in 70 % ethanol for 7 days, separately. Dosing of the extracts by UV/Vis spectroscopy revealed the presence of 3.352; 4.112; and 2.086 mg NICE/g of alkaloids; 14.756; 29.537; and 5.318 mg QUE/g of flavonoids; 16.149; 34.839; 13.635 and mg GAE/g of polyphenols and 0.360; 0.955; and 0.319 mg TAE/g of total tannins, respectively. By HPLC/UV, in general, the three compounds identified with the highest concentration in the species were Kaempferol, Quercetin 3- β -glucoside and Rutin. By GC/MS, most of the compounds found were fatty acid esters or long-chain fatty acid ethyl esters. The antioxidant capacity of the extracts was higher for the leaves (247.652 μ M TE/g (ABTS); 108.250 μ M ETAC/g (DPPH)) and for the flowers (170.282 μ M TEAC/g (ABTS); 114.917 μ M TEAC/g (DPPH)). At high concentrations (> 500 mg/L), the extracts can be toxic to the microcystacean *Daphnia magna*. At the cytotoxic level, the extracts are safe, requiring high concentrations (> 800 μ g/mL for flowers and leaves and > 500 μ g/mL for stems) to cause damage to healthy cells (Vero). The extracts from the flowers (K-562, HeLa, SiHa) and leaves (K-562, MCF-7, HeLa, SiHa) showed good results in tumor cells. In terms of biopesticidal activity, the extracts at a concentration of 10 mg/mL were not able to generate good antifungal results on *Botrytis cinerea*. To obtain the compounds, two synthetic routes were proposed. The synthetic route for the synthesis of the *Allamanda*-type alkaloid was composed of three steps: I) *O*-Benzoylation of *N*-protected hydroxylamine, II) *N*-Boc deprotection of hydroxylamine and III) Formation of Weinreb's amide, with yields of 98, 92 and 84 %, respectively. The synthetic route proposed for the synthesis of the analogues consisted of two steps: I) Formation of Weinreb's amide and II) Hydrogenolysis, with yields of 65 % and 99 %. In the cytotoxic evaluation, in K-562 and SiHa tumor cells, the alkaloid analogues showed good cytotoxic activity with good selectivity indices. The synthetic routes proposed were efficient and provided good yields.

Keywords: biopesticide; antioxidant; cytotoxic; phytochemical compounds.

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Processo de inibição da AChE por OP e reativação por oximas.	34
Esquema 2 - Primeira proposta de rota sintética para a síntese do alcaloide [17].	84
Esquema 3 - Esquema de síntese do alcaloide N^1, N^7 -bis(benzoiloxi)heptanodiamida [17] ...	84
Esquema 4 - Mecanismo reacional da <i>O</i> -Benzoilação da hidroxilamina <i>N</i> -protegida.	85
Esquema 5 - Mecanismo reacional da desproteção <i>N</i> -Boc da hidroxilamina	86
Esquema 6 - Mecanismo reacional da formação de amida de Weinreb	87
Esquema 7 - Rota sintética proposta para a síntese de análogos de alcaloide do tipo <i>Allamanda</i>	88

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Ingredientes ativos de agrotóxicos mais vendido no Brasil em 2021.	29
Gráfico 2 - Efeito dos extratos na inibição do crescimento do diâmetro do COAD3389, <i>in vitro</i>	75
Gráfico 3 - Efeito dos extratos na inibição do crescimento do diâmetro do COAD2800, <i>in vitro</i>	75
Gráfico 4 - Efeito dos extratos das flores em diferentes linhagens celulares.	78
Gráfico 5 - Efeito dos extratos das folhas em diferentes linhagens celulares.	78
Gráfico 6 - Efeito dos extratos dos galhos em diferentes linhagens celulares.	78
Gráfico 7 - Efeito do composto [37] em diferentes linhagens celulares.	94
Gráfico 8 - Efeito do composto [33] em diferentes linhagens celulares.	95

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estruturas gerais de carbamatos, organofosforados e piretróides.	27
Figura 2 - Mofo cinzento em diferentes frutas.	46
Figura 3 - Estrutura químicas dos alcaloides securinina e berberina.....	49
Figura 4 - <i>Allamanda cathartica</i>	51
Figura 5 - Constituintes majoritários de folhas e galhos de <i>A. cathartica</i> e alcaloides encontrados nos galhos de <i>A. cathartica</i>	55
Figura 6 - Fragmentos com alto risco de toxicidade dos compostos [37] e [17].....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classes Toxicológicas do GHS.	28
Tabela 2. Informações sobre os 10 ingredientes ativos de agrotóxicos mais vendidos em 2021, no Brasil.	30
Tabela 3 – Resultados dos alimentos analisados pelo PARA em 2017-2018.	41
Tabela 4 - Resultados dos alimentos analisados pelo PARA em 2022.	42
Tabela 5 - Doseamento de Metabólitos secundários por UV/Vis.	64
Tabela 6 - Dados experimentais dos padrões comerciais.	66
Tabela 7 - Quantificação Fitoquímica por CLAE/UV dos extratos.	67
Tabela 8 - Caracterização Fitoquímica por CG/MS do extrato das Flores.	68
Tabela 9 - Caracterização Fitoquímica por CG/MS do extrato das Folhas.	69
Tabela 10 - Caracterização Fitoquímica por CG/MS do extrato dos Galhos.	70
Tabela 11 – Capacidade antioxidante total dos diferentes extratos de <i>A. cathartica</i>	71
Tabela 12 - Toxicidade aguda dos extratos em <i>Daphnia magna</i>	73
Tabela 13 - Atividade citotóxica dos extratos em diferentes linhagens celulares.	77
Tabela 14 - Propriedades físico-químicas estimadas pelo <i>software Molinspiration</i>	90
Tabela 15 - Bioatividade dos compostos estimadas pelo <i>software Molinspiration</i>	91
Tabela 16 - Predição de toxicidade dos compostos sintetizados.	92
Tabela 17 - Atividade citotóxica dos compostos em diferentes linhagens celulares.	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AcOEt	Acetato de Etila
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AT	Alcaloides totais
atm	Atmosfera
ATP	Adenosina Trifosfato
BDA	Ágar Batata Dextrose
BOC	t-butiloxicarbonil
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG	Cromatografia Gasosa
CIATox/SC	Centro de Informação e Assistência Toxicológica de Santa Catarina
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DCM	Diclorometano
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimetilformanida
DMSO	Dimetilsufóxido
DPPH	2,2-difenil-1-(2,4,6 -trinitrofenil) hidrazila
DRfA	Dose de Referência Aguda
EAG	Equivalentes de Ácido Gálico
EAT	Equivalentes de Ácido Tânico
ENIC	Equivalentes de Nicotina
EQU	Equivalente de Quercetina
ESI	Eletrospray
ET	Equivalente de Trolox
EtOH	Etanol
FT	Flavonoides totais
GHS	<i>Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals</i>
Ibama	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IC ₅₀	Concentração necessária para inibir 50% dos indivíduos testados
IP	Inibidor de protease
IS	Índice de Seletividade
LaPlaM	Laboratório de Plantas Mediciniais
LD ₅₀	Dose letal média
LMR	Limite Máximo de Resíduos
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária
MEC	Matriz extracelular
MS	Espectroscopia de Massas
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio
OP	Organofosforado
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
Pd	Paládio
Pd/C	Paládio sobre Carbono
PF	Ponto de Fusão
PPA	Potencial de Periculosidade Ambiental
PPGCA	Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais
PT	Polifenóis totais
RE	Retículo endoplasmática
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPMI	<i>Gibco Roswell Park Memorial Institute</i>
Sinan	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
t	Tonelada
t.a.	Temperatura ambiente
TAC	Capacidade Antioxidante Total
TBTU	Tetrafluoroborato de 2-(1H-Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamínio
TEA	Trietilamina
TfOH	Ácido tríflico
TT	Taninos totais
UV/VIS	Ultravioleta/Visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	JUSTIFICATIVA	21
1.2	OBJETIVOS	22
1.2.1	Objetivo Geral	22
1.2.2	Objetivos Específicos	22
1.3	HIPÓTESES	23
1.4	ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	24
2	REFERÊNCIAL TEÓRICO	25
2.1	AGROTÓXICOS	25
2.1.1	Os agrotóxicos no Brasil em números	29
2.1.2	Consequências decorrentes da exposição aos agrotóxicos: efeitos agudos	32
2.1.3	Consequências decorrentes da exposição aos agrotóxicos: efeitos crônicos	35
2.1.3.1	Desenvolvimento de tumores malignos	38
2.1.4	Risco para a Segurança Alimentar	39
2.1.4.1	<i>Botrytis cinerea</i>	44
2.2	ALTERNATIVAS PROMISSORAS	46
2.2.1	Biopesticidas	46
2.2.2	Fármacos derivados de produtos naturais	49
2.2.3	<i>Allamanda cathartica</i>	50
3	AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS DE <i>ALLAMANDA CATHARTICA</i>	56
3.1	METODOLOGIA	56
3.1.1	Produção dos Extratos	56
3.1.2	Doseamento de Metabólitos Secundários por Espectroscopia UV/Vis	56
3.1.2.1	Determinação de Polifenóis Totais	56
3.1.2.2	Determinação de Flavonoides Totais	57
3.1.2.3	Determinação de Taninos Totais	57
3.1.2.4	Determinação de Alcaloides Totais	58
3.1.2.5	Análise estatística	58
3.1.3	Caracterização Fitoquímica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/UV)	58
3.1.4	Caracterização Fitoquímica por Cromatografia Gasosa acoplada (GC/MS)	59
3.1.5	Avaliação da Capacidade Antioxidante Total	60

3.1.5.1	Atividade de eliminação de radicais livres DPPH.....	60
3.1.5.2	Método de captura do radical livre ABTS ⁺	60
3.1.5.3	Análise estatística	61
3.1.6	Avaliação da Atividade Citotóxica.....	61
3.1.6.1	Cultura de células	61
3.1.6.2	Determinação da Viabilidade Celular.....	62
3.1.6.3	Contagem de células	62
3.1.6.4	Análise do Índice de Seletividade	62
3.1.6.5	Análise estatística	62
3.1.7	Ensaio de Toxicidade Aguda para Microcrustáceo de Água Doce (<i>Daphnia magna</i>) (Ecotoxicidade).....	63
3.1.8	Avaliação da Atividade Antifúngica <i>in vitro</i>	63
3.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
3.2.1	Produção dos Extratos.....	64
3.2.2	Doseamento de Metabólitos Secundários por Espectroscopia UV/Vis	64
3.2.3	Caracterização Fitoquímica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/UV).....	65
3.2.4	Caracterização Fitoquímica por Cromatografia Gasosa acoplada a espectroscopia de massas (GC/MS).....	67
3.2.5	Avaliação da Capacidade Antioxidante Total	71
3.2.6	Ensaio de Toxicidade Aguda para Microcrustáceo de Água Doce (<i>Daphnia magna</i>) (Ecotoxicidade)	72
3.2.7	Avaliação da Atividade Antifúngica <i>in vitro</i>	74
3.2.8	Avaliação da Atividade Citotóxica.....	77
4	SÍNTESE DE ALCALOIDES DO TIPO <i>ALLAMANDA</i>	80
4.1	METODOLOGIA	80
4.1.1	Síntese de Alcaloide do tipo <i>Allamanda</i> e de análogos.....	80
4.1.1.1	Materiais e Reagentes	80
4.1.1.2	Procedimento Geral de Síntese do Alcaloide [17]	80
4.1.1.3	Procedimento Geral de Síntese dos Análogos de Alcaloide	81
4.1.2	Avaliação <i>in silico</i> dos Compostos Sintetizados.....	81
4.1.3	Avaliação da atividade citotóxica.....	81
4.1.3.1	Cultura de células	82
4.1.3.2	Determinação da Viabilidade Celular.....	82

4.1.3.3	Contagem de células	82
4.1.3.4	Análise do Índice de Seletividade	83
4.1.3.5	Análise estatística	83
4.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
4.2.1	Síntese de Alcaloide do tipo <i>Allamanda</i>	84
4.2.2	Síntese dos Análogos de Alcaloide.....	87
4.2.3	Avaliação <i>in silico</i> dos compostos sintetizados	88
4.2.3.1	Propriedades físico-químicas e predição de bioatividade.....	88
4.2.3.2	Predição de toxicidade	92
4.2.4	Avaliação da Atividade citotóxica	93
4.2.5	Dados Experimentais da Síntese	97
5	CONCLUSÃO GERAL.....	99
	REFERÊNCIAS.....	100
	APÊNDICES	114
	APÊNDICE A - CROMATOGRAMA DO PADRÃO ÁCIDO CAFEICO	115
	APÊNDICE B - CROMATOGRAMA DOS EXTRATOS (ÁCIDO CAFEICO).....	116
	APÊNDICE C - CROMATOGRAMA DO PADRÃO ÁCIDO <i>P</i> -CUMÁRICO.....	117
	APÊNDICE D - CROMATOGRAMA DOS EXTRATOS (ÁCIDO <i>P</i> -CUMÁRICO).....	118
	APÊNDICE E - CROMATOGRAMA DO PADRÃO APIGENINA	119
	APÊNDICE F - CROMATOGRAMA DOS EXTRATOS (APIGENINA).....	120
	APÊNDICE G - CROMATOGRAMA DO PADRÃO KAEMPFEROL	121
	APÊNDICE H - CROMATOGRAMA DOS EXTRATOS (KAEMPFEROL)	122
	APÊNDICE I - CROMATOGRAMA DO PADRÃO PINOCEMBRINA	123
	APÊNDICE J - CROMATOGRAMA DOS EXTRATOS (PINOCEMBRINA)	124
	APÊNDICE K - CROMATOGRAMA PADRÃO QUERCETINA-3-B-GLICOSÍDEO.....	125
	APÊNDICE L - CROMATOGRAMA EXTRATOS (QUERCETINA-3-B-GLICOSÍDEO).....	126
	APÊNDICE M - CROMATOGRAMA DO PADRÃO RUTINA.....	127
	APÊNDICE N - CROMATOGRAMA DOS EXTRATOS (RUTINA)	128
	APÊNDICE O – CROMATOGRAMA CG FLORES E MS DOS COMPOSTOS.....	129
	APÊNDICE P – CROMATOGRAMA CG FOLHAS E MS DOS COMPOSTOS	131
	APÊNDICE Q – CROMATOGRAMA CG FOLHAS E MS DOS COMPOSTOS.....	134
	ANEXOS.	135
	ANEXO A – EXSICATA DE <i>ALLAMANDA CATHARTICA</i>	136

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é atualmente o segundo maior consumidor de agrotóxicos do mundo, perdendo apenas para os Estados Unidos (FAO, 2022). A venda nacional destes produtos cresceu aproximadamente 135 % nos últimos 12 anos (IBAMA, 2022b). Este fato deve-se principalmente pela grande explosão populacional que impõe um grande desafio à agricultura e setores relacionados para atender à crescente demanda mundial de alimentos (Khursheed *et al.*, 2022). O Brasil, por ter sua economia baseada principalmente no agronegócio, sofre também com este tipo de pressão econômica (Carneiro *et al.*, 2015; Moraes, 2019). Além da pressão exercida pela explosão populacional, as contínuas atividades antrópicas, como o uso excessivo de agrotóxicos, têm levado à destruição do entorno humano e acarretam impactos negativos nos ecossistemas e no meio ambiente, como a deterioração e degeneração da eficiência, fertilidade e qualidade dos solos, com diminuição contínua das terras agrícolas, escassez de água devido à contaminação e degradação dos recursos hídricos, acúmulo de xenobióticos nos solos, morte de animais benéficos e aumento de resistência das pragas (Khursheed *et al.*, 2022; Moraes, 2019). Para a saúde humana os impactos são agudos, como em caso de intoxicações, mas também são crônicos, devido a exposição continuada a pequenas quantidades de agrotóxicos, principalmente por meio do consumo de alimentos contaminados (INCA, 2022). Esta exposição crônica gera distúrbios em todo o organismo, como o surgimento de problemas endócrinos, malformações congênitas, vários tipos de câncer, problemas neurocomportamentais e até a ideação suicida, principalmente entre aqueles que trabalham diretamente com o uso de agrotóxicos, como nos casos os produtores rurais (Gonzaga; Baldo; Caldeira, 2021; Mora *et al.*, 2022; Moraes, 2019).

A segurança alimentar é fortemente afetada com o uso excessivo de agrotóxicos. Segundo relatório do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), 51 % dos alimentos de origem vegetal representativos da dieta da população brasileira contém resíduos de agrotóxicos (ANVISA, 2019b). Um dos fatores que acarretam o aumento da aplicação de agrotóxicos, que está ligado a tentativa de aumento de produtividade das colheitas, é a resistências aumentada das pragas. Um dos fungos de maior risco fitossanitário no Brasil, *Botrytis cinerea*, tem sido reportando como resistente a vários fungicidas em diversas culturas em todo o mundo (Malandrakis *et al.*, 2022; Xiao *et al.*, 2021). Este fungo causa a doença do mofo cinzento em mais de 200 espécies de plantas, incluindo a maioria das hortaliças, frutas, árvores e flores. No Brasil, as principais culturas alimentícias nas quais o mofo cinzento ocorre são: frutíferas, como a videira, maçã, pera, ameixas, e hortícolas, como o morango, tomate,

alface, pimentão, cebola, etc. Dentre as culturas atingidas pelo fungo, estão algumas classificadas como as mais contaminadas por agrotóxicos, como a uva, pimentão e morango (ANVISA, 2019b; Morandi; Maffia, 2005).

Diante de todos estes pontos, surge a necessidade de encontrar novas alternativas eficazes aos pesticidas sintéticos nos sistemas de cultivo existentes (Di Lecce *et al.*, 2022; Gahukar, 2012). Os biopesticidas são pesticidas produzidos naturalmente por organismos vivos como microorganismos, plantas, animais, etc. (Sharma *et al.*, 2020). Dentre as classes de biopesticidas temos os pesticidas bioquímicos, que são substâncias naturais que controlam pragas. Pesticidas bioquímicos incluem substâncias que interferem no acasalamento, como feromônios sexuais de insetos e outros semioquímicos, bem como extratos de plantas e moléculas isoladas (EPA, 2022).

As plantas são as fontes mais importantes para o isolamento de novos metabólitos (Di Lecce *et al.*, 2022), e entre as plantas nativas brasileiras que apresenta grande potencial como biopesticida está a *Allamanda cathartica*, um arbusto nativo brasileiro, pertencente à família Apocynaceae. Plantas desta família são bem conhecidas pelos alcaloides que contêm (BRASIL, 2023; Joselin *et al.*, 2012) e em *A. cathartica* foram identificados e caracterizados estruturalmente dois alcaloides em seus galhos (Prabhadevi *et al.*, 2012). Nos últimos anos, pesquisas tem mostrado que os alcaloides também desempenham um papel importante nos processos agrícolas. Suas aplicações como pesticidas botânicos têm aumentado gradualmente e inclusive, alguns mostram-se mais eficazes do que os pesticidas químicos utilizados historicamente (Wu *et al.*, 2021). Os extratos à base de plantas também têm sido particularmente usados no manejo de pragas. Suas composições químicas são muito complexas e por isso é mais difícil ocorrer resistência da praga (Khursheed *et al.*, 2022). Os efeitos do uso dos extratos brutos ocorrem em decorrência de interações sinérgicas, que por sua vez, são observadas quando o efeito produzido por uma combinação de substâncias é superior ao que se poderia esperar da contribuição individual de seus componentes (Casanova; Costa, 2017).

Sendo assim, levando em consideração o uso indiscriminado de agrotóxicos, suas consequências a saúde e ao meio ambiente, a resistência apresentada por pragas e o risco para a segurança alimentar, o objetivo deste trabalho é avaliar a atividade biopesticida e biológica dos extratos etanólicos de *Allamanda cathartica* e sintetizar um alcaloide do tipo *A. cathartica* e seus análogos. Além disso, no que tange a segurança de uso, verificar a toxicidade aguda dos extratos em microcrustáceo de água doce e a citotoxicidade em diferentes linhagens celulares dos extratos e moléculas sintetizadas.

1.1 JUSTIFICATIVA

O uso de agrotóxicos, principalmente no Brasil, tem crescido atualmente devido ao aumento da demanda do seu principal setor econômico, o agronegócio. O aumento do uso de agrotóxicos justificado pelo aumento do rendimento das safras, bem como o uso exacerbado das terras agricultáveis, vem resultando em sérios problemas ambientais e a saúde humana. Ambientalmente, observa-se a poluição das águas, mortes de animais, contaminação do solo e resistência de pragas. A saúde humana também é afetada de inúmeras maneiras, com o aparecimento de doenças em diversos sistemas do organismo, intoxicações e problemas com a segurança alimentar. O grande uso de agrotóxicos também pode levar ao desenvolvimento de câncer. Ainda existem muitas lacunas no tratamento dos diversos tipos de câncer, sendo necessário, além da diminuição da exposição, o desenvolvimento de novos tratamentos.

Como alternativa aos agrotóxicos convencionais, os biopesticidas, aparecem como uma possível solução para a diminuição de danos ao meio ambiente e a saúde. Estes produtos podem ser originados a partir de plantas, que produzem uma diversidade de metabólitos secundários, que são capazes de produzir diferentes respostas biológicas contra microrganismos patogênicos e pragas. Estes produtos podem ser usados tanto na forma de extratos ou como substâncias puras. A utilização destas alternativas, causa menos impactos ambientais e na sociedade, que se beneficia com a redução do consumo de agrotóxicos nos alimentos e aumento da qualidade de vida.

Entre as plantas nativas que apresentam uma diversidade de compostos potenciais está a *Allamanda cathartica* L.. Os alcaloides, classe de metabólitos versáteis, conhecidos por suas atividades citotóxicas para células de outros organismos, já foram identificados nos galhos da planta e podem ser atraentes para o desenvolvimento de biopesticidas e de novos fármacos. No entanto, a extração de moléculas isoladas de plantas é uma opção interessante, mas em alguns casos, de alto custo e baixo rendimento. Como alternativa, pode-se utilizar estratégias de síntese química para obtenção de moléculas naturais, com menor investimento e melhor rendimento, possibilitando a produção em larga escala industrial. Atualmente, não há disponível em literatura uma rota de síntese para estes alcaloides, ressaltando o ineditismo deste trabalho. As plantas também podem produzir efeitos biológicos através do sinergismo de suas moléculas, sendo justificável a utilização destes produtos complexos, como os extratos brutos de plantas, em testes biológicos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

- Avaliar a atividade biopesticida e biológica dos extratos etanólicos de *Allamanda cathartica* e sintetizar um alcaloide da espécie e seus análogos.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Preparar extratos etanólicos dos galhos, flores e folhas de *A. cathartica*;
- Quantificar polifenóis, flavonoides, alcaloides e taninos totais por espectroscopia UV/Vis.
- Realizar a caracterização fitoquímica dos extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia Gasosa (CG);
- Determinar a atividade antioxidantes dos extratos pelos métodos DPPH e ABTS⁺;
- Analisar a toxicidade dos extratos em *Daphnia magna*;
- Analisar a atividade biopesticida dos extratos contra o fungo fitopatogênico *Botrytis cinerea*;
- Analisar *in silico* as propriedades físico-químicas, bioatividade e toxicidade dos compostos sintetizados;
- Avaliar a atividade citotóxica em células K-562; MCF-7, HeLa, SiHa e Vero *in vitro* dos extratos e análogos sintetizados.

1.3 HIPÓTESES

Levando em consideração os objetivos desta pesquisa, as hipóteses formuladas foram: Os extratos etanólicos brutos das folhas, flores e galhos de *A. cathartica* são eficientes fungicidas contra *Botrytis cinerea* e não causam toxicidade em *Daphnia magna*. As rotas sintéticas propostas para a síntese do alcaloide do tipo *Allamanda* e de análogos é eficiente e com bons rendimentos, sendo uma alternativa para a obtenção destes compostos bioativos. Os extratos etanólicos brutos das folhas, flores e galhos de *A. cathartica* e os análogos sintetizados não são tóxicos para células saudáveis e são tóxicos para células tumorais.

1.4 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação está em conformidade com normas gerais para elaboração de dissertações e teses do Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais (PPGCA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). Os elementos textuais foram divididos em introdução, desenvolvimento e conclusão, sendo que o desenvolvimento foi dividido em três seções:

Seção 1: Referencial teórico, onde estão discutidos de forma abrangente, os assuntos relacionados a dissertação.

Seção 2: Denominada **Avaliação dos extratos de *Allamanda cathartica***, onde são apresentados a metodologia e resultados da avaliação fitoquímica, antioxidante, citotóxica, ecotoxicidade e a atividade antifúngica dos extratos de *A. cathartica*.

Seção 3: Denominada **Síntese de alcaloide do tipo *Allamanda***, onde estão apresentados a metodologia e resultados da síntese de alcaloide do tipo *Allamanda* e de seus análogos, avaliação *in silico* e atividades citotóxicas *in vitro*.

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 AGROTÓXICOS

Segundo o Decreto nº 4.074/ 2002, agrotóxicos e afins são definidos como produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, desseccantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 2002).

O termo agrotóxico surgiu em 1977, em uma publicação do Centro Acadêmico Luiz de Queiroz, pelo pesquisador brasileiro Adilson Dias Paschoal. A palavra vem do grego “*agros*”, que exprime a ideia de campo, e “*toxikon*”, que exprime a ideia de veneno. O Brasil é o único país que emprega a denominação em suas documentações técnicas e normativas. Outros países utilizam o termo pesticida, correspondente ao latim “*pestis*” (destruição, epidemia, doença contagiosa grave), e ao latim “*caedere*” (matar), para referir-se ao que enquadramos como agrotóxicos (Baronas, 2019; Santos, 2020).

Para se utilizar um agrotóxico no Brasil, é necessário que o mesmo seja registrado no país, perante a três órgãos do governo federal: Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), no que se refere à eficácia e segurança agrônomicas; Ministério da Saúde (por meio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa), no que se refere à saúde pública, seja de risco ocupacional, seja de risco para consumidores; e Ministério do Meio Ambiente (por meio do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - Ibama), no que se refere ao impacto ambiental. Essas obrigatoriedades foram inseridas a partir da criação da lei dos agrotóxicos, em 1989, que veio para suprir as várias deficiências da legislação anterior de 1934. A nova lei também solicita testes que demonstrem a segurança do agroquímico, bem como estudos sobre impactos ambientais e humanos, além da necessidade de demonstrar que novos produtos não são mais tóxicos do que similares existentes; instituí a exigência de receituário agrônomico, e aumentou os valores das multas (Moraes, 2019).

Em termos classificatórios, os pesticidas podem ser classificados de forma ampla, como naturais, sintéticos ou em relação ao seu organismo-alvo. Com base nos seus organismos-alvo, podem ser classificados como acaricidas (usados para controlar ácaros e carrapatos),

fungicidas (usados para controlar fungos fitopatogênicos), herbicidas (usados para controlar o crescimento de plantas não desejadas), bactericidas (usados para controlar bactérias fitopatogênicas), entre outros. Os produtos considerados como pesticidas naturais, são aqueles isolados de fontes naturais, como plantas ou microrganismos. Já os sintéticos, são aqueles obtidos em laboratório por síntese e são formados pela modificação de minerais ou compostos químicos. Estes são os pesticidas mais amplamente utilizados no mundo, são muito estáveis na natureza e podem se acumular ao longo do tempo. Dentro desta classe estão os organoclorados, organofosforados, piretroides, carbamatos, entre outras classes químicas (Sharma *et al.*, 2020).

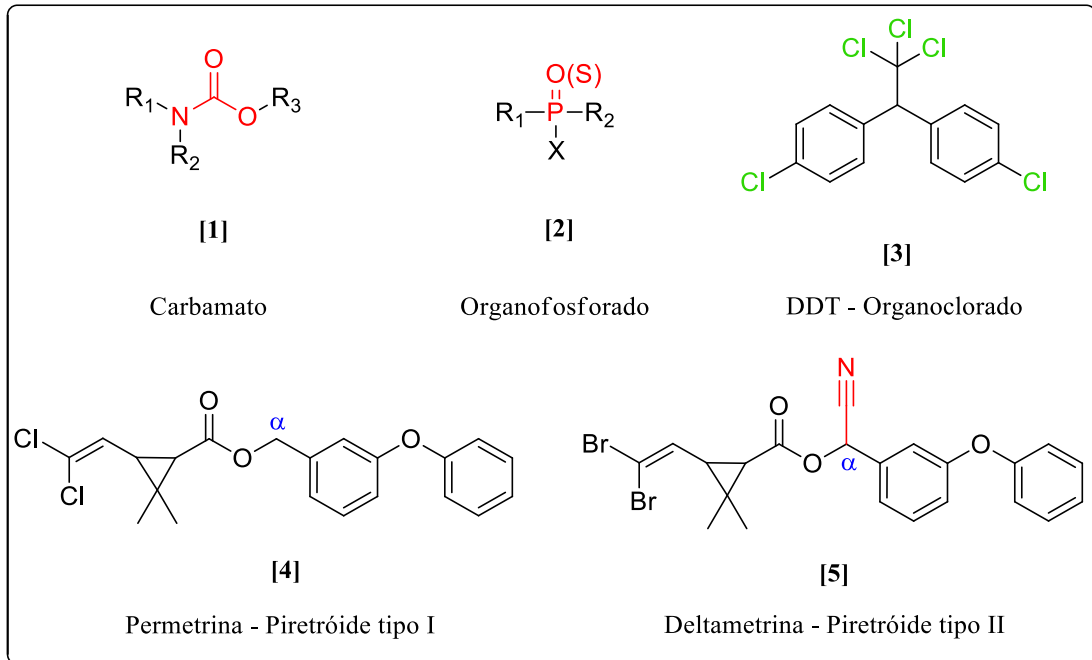
Os organofosforados e carbamatos, constituem um grupo de substâncias amplamente utilizadas como inseticidas, nematicidas, larvicidas e acaricidas sistêmicos para controle de pragas na agropecuária, desinsetização urbana e doméstica e controle de vetores. Esses compostos também são utilizados na fabricação de armas químicas e de alguns produtos farmacológicos. Os organofosforados englobam os derivados de ácido fosfórico e seus homólogos. Os carbamatos, por sua vez, são ésteres do ácido carbâmico ou do ácido *N*-metil-carbâmico (BRASIL, 2020). Os carbamatos de *N*-metil contêm uma estrutura -NCOO- comum, com várias cadeias laterais R_1 - R_3 [1]. O organofosforado contém um grupo fosforil ou tiofosforil, duas cadeias laterais de grupamentos lipofílicos (R_1 e R_2) e um grupo de saída (lâbel) (X) [2] (King; Aaron, 2015).

Os organoclorados são compostos de hidrocarbonetos clorados com cinco ou mais átomos de cloro [3]. Possuem baixa solubilidade aquosa, alta persistência, alta lipossolubilidade e baixa polaridade (Sharma *et al.*, 2020). Os piretroides são inseticidas sintéticos obtidos pela modificação química das piretrinas, de origem natural, e fazem parte da formulação de diversos produtos registrados para uso na agricultura, na veterinária e para o tratamento de ectoparasitoses em humanos (BRASIL, 2020). São divididos em tipo I [4], quando há a ausência e tipo II [5], quando há a presença de um grupo ciano ligado ao carbono alfa da molécula (Dallegrave, 2017; Fagundes, 2021). Na Figura 1, estão demonstrados estruturas gerais de carbamatos, organofosforados e piretroides.

O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama) possui uma classificação para os agrotóxicos, denominada Potencial de Periculosidade Ambiental (PPA). O PPA baseia-se nos parâmetros de bioacumulação, persistência, transporte, toxicidade a diversos organismos, potencial mutagênico, teratogênico e carcinogênico. Nesta classificação, os produtos são enquadrados em: Classe I - Produto altamente perigoso ao meio ambiente; Classe II - Produto muito perigoso ao meio ambiente; Classe III - Produto perigoso

ao meio ambiente; e, Classe IV - Produto pouco perigoso ao meio ambiente (BRASIL, 1996; IBAMA, 2022a).

Figura 1- Estruturas gerais de carbamatos, organofosforados e piretróides.



Fonte: Adaptado de Bhatt *et al.*, 2021; King; Aaron, 2015; Taiwo, 2019.

Os agrotóxicos também são classificados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), conforme sua toxicidade. O Brasil passou a adotar os parâmetros de classificação toxicológica de agrotóxicos com base nos padrões do Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (*Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – GHS*). Com este novo modelo, a classificação passou a ter cinco categorias (anteriormente quatro), além de incluir o item “não classificado”, válido para produtos de baixíssimo potencial de dano, como produtos de origem biológica. As categorias atuais estão representadas na Tabela 1.

Atualmente com a última avaliação realizada pela Anvisa, que iniciou em 2017, foram classificados 43 agrotóxicos como categoria 1; 79 como categoria 2; 136 como categoria 3; 599 como categoria 4; 899 como categoria 5; e 168 como não classificado (ANVISA, 2022b). O agrotóxico 2,4-D (Ácido Diclorofenoxiacético), por exemplo, passou a ser classificado neste novo modelo como categoria 4 – pouco tóxico, o que antes era classificado como categoria I – extremamente tóxico (IBAMA, 2017; NORTOX, 2019). Há evidências que o 2,4-D é possivelmente cancerígeno e além disso, pode alterar o desempenho sexual, a fertilidade e exercer efeitos tóxicos no feto e em lactentes. Apesar das evidências, na última reavaliação do

agrotóxico, a Anvisa concluiu que não existem efeitos proibitivos de registro associados ao 2,4-D (Gurgel; Guedes; Friedrich, 2021).

Tabela 1. Classes Toxicológicas do GHS.

Categoria	1	2	3	4	5	Não Classificado
Classificação	Extremamente Tóxico	Altamente Tóxico	Moderadamente Tóxico	Pouco Tóxico	Improvável De Causar Dano Agudo	Não Classificado
Pictograma					Sem símbolo	Sem símbolo
Palavra de Advertência	PERIGO	PERIGO	PERIGO	CUIDADO	CUIDADO	Sem advertência
Danos Causados Por Contato						
Oral	Fatal se ingerido	Fatal se ingerido	Tóxico se ingerido	Nocivo se ingerido	Pode ser perigoso se ingerido	-
Dérmico	Fatal em contato com a pele	Fatal em contato com a pele	Tóxico em contato com a pele	Nocivo em contato com a pele	Pode ser perigoso em contato com a pele	-
Inalatório	Fatal se inalado	Fatal se inalado	Tóxico se inalado	Nocivo se inalado	Pode ser perigoso se inalado	-
Cor da Faixa	Vermelho	Vermelho	Amarelo	Azul	Azul	Verde

Fonte: Adaptado de ANVISA, 2019a.

Sob a perspectiva das áreas de saúde pública, saúde do trabalhador e meio ambiente, a controvérsia na regulação de agrotóxicos deveria se limitar aos casos em que a evidência científica é inconclusiva. No entanto, não há necessariamente uma relação direta entre a disponibilidade de evidência científica e a regulação de agrotóxicos, pois apesar de influenciarem na decisão, no Brasil ainda ocorrem muitas influências nas regulações de agrotóxicos de apoiadores ou opositores a regimes mais restritos, levando a mudanças nem sempre esperadas por defensores do meio ambiente e da saúde pública (Moraes, 2019). Por exemplo o Acefato, proibido na União Europeia há mais de 10 anos, teve sua continuidade de uso aprovada mesmo após uma avaliação que aponta acentuada neurotoxicidade e suspeitas de carcinogenicidade, que contraria a Lei de Agrotóxicos (Bombardi, 2017), que proíbe o registro de agrotóxicos no Brasil que revelarem características carcinogênicas. Desta forma, há que se exigir maior robustez científica dos estudos aportados pelos proponentes das tecnologias, tais

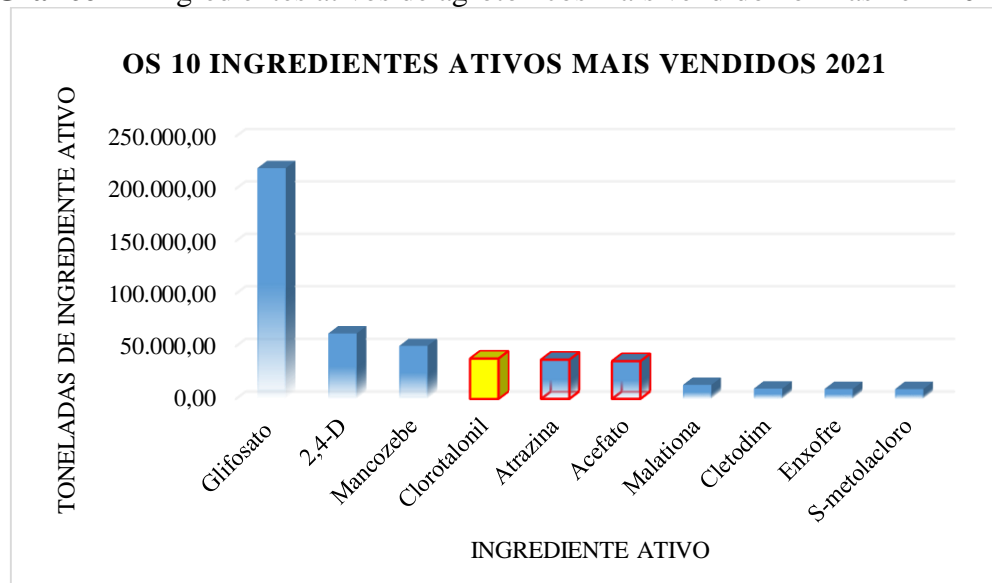
como estudos de exposição crônica por alimentação e estudos intergeracionais, principalmente realizados por cientistas independentes (Hess; Nodari; Lopes-Ferreira, 2021).

2.1.1 Os agrotóxicos no Brasil em números

Em 2020, a lista das monografias de agrotóxicos autorizados para uso e comercialização no Brasil, contava com 455 ingredientes ativos aprovados, sendo 404 químicos (88,8 %) e 51 biológicos (11,2 %). Dentre esses 404 ingredientes ativos químicos, pelo menos 121 (30,0 %) não tinham uso permitido na União Europeia (Hess; Nodari; Lopes-Ferreira, 2021).

Segundo relatório do Ibama (IBAMA, 2022b), a venda total de ingredientes ativos de agrotóxicos em 2021 foi de 720,87 mil toneladas, o que representa um aumento de 5,03 % em relação ao ano anterior (2020: 686,35 mil toneladas). Deste total, 53,88 % correspondeu a venda de produtos classificados como III (perigoso ao meio ambiente); 41,48 % de produtos classe II (muito perigoso ao meio ambiente), 2,79 % de produtos de classe I (altamente perigoso ao meio ambiente) e 1,85 % aos produtos classe IV (pouco perigosos). O gráfico 1, traz os dez agrotóxicos mais vendidos em 2021 em números e a Tabela 2 as informações sobre cada um. Cabe destacar que, destes 10 ingredientes, dois deles são proibidos na União Europeia desde o início dos anos 2000 (Acefato em 2003 e Atrazina em 2004) e o Clorotalonil deste 2009 (Hess; Nodari; Lopes-Ferreira, 2021).

Gráfico 1 - Ingredientes ativos de agrotóxicos mais vendido no Brasil em 2021.



Fonte: IBAMA, 2022b. As cores das barras representam a classificação toxicológica da Anvisa. Barras destacadas em vermelho simbolizam produtos proibidos na União Europeia.

Tabela 2. Informações sobre os 10 ingredientes ativos de agrotóxicos mais vendidos em 2021, no Brasil.

Ingrediente ativo (IBAMA, 2022b)	Grupo químico (ANVISA, 2022a)	Classe agrônômica (ANVISA, 2022a)	Uso autorizado (ANVISA, 2022a)	Classificação ambiental	Classificação toxicológica
1) Glifosato	Glicina substituída - organofosforado	Herbicida	84 culturas	Classe III (IBAMA, 2021)	Categoria 5 (IBAMA, 2021)
2) 2,4-D	Ácido ariloxialcanóico	Herbicida	16 culturas	Classe III (NORTOX, 2019)	Categoria 4 (NORTOX, 2019)
3) Mancozebe	Ditiocarbamato	Fungicida e acaricida	70 culturas	Classe III (NORTOX, 2020b)	Categoria 5 (NORTOX, 2020b)
4) Clorotanilil	Isoftalonitrila	Fungicida	97 culturas	Classe III (NORTOX, 2021b)	Categoria 3 (NORTOX, 2021b)
5) Atrazina	Triazina	Herbicida	11 culturas	Classe II (CROPChem, 2019)	Categoria 4 (CROPChem, 2019)
6) Acefato	Organofosforado	Inseticida e acaricida	11 culturas	Classe II (NORTOX, 2020a)	Categoria 4 (NORTOX, 2020a)
7) Malationa	Organofosforado	Inseticida e acaricida	26 culturas	Classe II (BRASIL, 2021)	Categoria 4 (BRASIL, 2021)
8) Cletodim	Oxima ciclohexanodiona	Herbicida	68 culturas	Classe III (NORTOX, 2021a)	Categoria 5 (NORTOX, 2021a)
9) Enxofre	Inorgânico	Acaricida e fungicida	86 culturas	Classe III (PERTERRA, 2021)	Categoria 5 (PERTERRA, 2021)
10) S-Metolacoloro	Cloroacetanilida	Herbicida	40 culturas	Classe II (SYNGENTA, 2022)	Categoria 4 (SYNGENTA, 2022)

Fonte: IBAMA, 2022b.

Analisando a série histórica no Brasil, disponibilizada pelo Ibama (IBAMA, 2022b), entre 2009 e 2021, as vendas totais de ingredientes ativos em produtos formulados aumentou progressivamente 134,97 % nestes últimos 12 anos. Além disso, a proporção de vendas por classificação ambiental também mudou. Em 2021, comparado ao ano de 2009, houve um aumento em número de vendas para classe I e II, as mais perigosas e diminuição para classe IV, menos perigosa.

O Brasil vem ocupando o ranking de países com maior consumo destes produtos decorrente do desenvolvimento do agronegócio no setor econômico. Dentre os dez produtos com maior número de exportações brasileiras em 2016, sete destes foram produtos agropecuários: soja, açúcar, carne de frango, farelo de soja, carne bovina, celulose e café em grão (Bombardi, 2017).

Ocorreram mudanças substanciais em termos da dimensão da produção agrícola, extensão das áreas cultivadas em um processo amplo de modernização, inserindo o país na chamada Revolução Verde. O maior uso de pesticidas trouxe ganhos de produtividade, obtidos também em função da expansão do uso de fertilizantes, maquinário e práticas modernas de gestão. Este processo foi favorecido pela liberalização do setor agrícola nos anos 1990, a qual criou incentivos para o adensamento da produção e o uso mais intensivo de pesticidas. Foi em parte o crescimento nestas dimensões que levou à expansão do consumo de agrotóxicos no Brasil (Carneiro *et al.*, 2015; Moraes, 2019).

No entanto, além do seu uso acentuado há outros sérios problemas quanto ao uso dos agrotóxicos no país, como a permissão de agrotóxicos já banidos em outros países, como por exemplo o Acefato, a Atrazina e o Paraquat, e a venda ilegal de agrotóxico que já foram proibidos. Na medida em que o consumo no Brasil se expande, ampliam-se os interesses tanto de produtores rurais como de indústrias produtoras em evitar que regulações se tornem mais restritas. Esta tendência é reforçada pelo fato de que o consumo tem diminuído em vários países desenvolvidos, aumentando a importância relativa do mercado brasileiro (Carneiro *et al.*, 2015; Moraes, 2019).

Embora a aplicação de agrotóxicos tenha conduzido ao aumento da produtividade agrícola e conferido vantagem competitiva, a fraca regulação que permaneceu por longo tempo ocasionou impactos ambientais e humanos que ainda estão sendo descobertos. O seu uso intensivo frequentemente gera um conjunto de externalidades negativas, bastante documentadas na literatura. Impactos sobre seres humanos vão desde simples náuseas, dores de cabeça e irritações na pele até problemas crônicos, como diabetes, malformações congênitas e vários tipos de câncer. Impactos ambientais também são vários, incluindo contaminação da água, plantas e solo, redução no número de organismos vivos e aumento da resistência de pestes (Moraes, 2019).

2.1.2 Consequências decorrentes da exposição aos agrotóxicos: efeitos agudos

A exposição humana a pesticidas ocorre principalmente por meio de alimentos, água e ar. Devido à sua ampla disponibilidade na forma líquida, sólida e gasosa, podem facilmente interferir na fisiologia humana por contato com a pele, inalação ou ingestão (Sharma *et al.*, 2020). O Ministério da Saúde considera que a exposição humana a agrotóxicos é um importante problema de saúde pública. Com o aumento do uso e da comercialização de agrotóxicos nos últimos anos no Brasil, o número de intoxicações reportadas tem aumentado (BRASIL, 2020).

As intoxicações por agrotóxicos são processos patológicos caracterizados por desequilíbrio fisiológico com manifestações variadas de acordo com a classe das substâncias, da quantidade, do tempo de absorção, da toxicidade do produto, da suscetibilidade do organismo e do tempo decorrido entre a exposição e o atendimento médico. Essa exposição pode levar ao aparecimento de efeitos agudos, que são aqueles de aparecimento rápido. Quando ocorre exposição a esses agentes através da pele, podem surgir como sintomas agudos gerais: irritações, ardência, desidratação e alergias. Quando a via de exposição são as vias respiratórias, pode se observar ardência no nariz e boca, tosse, coriza, dor no peito e dificuldade de respirar. Quando ocorre a exposição por via oral, podem ocorrer sintomas agudos como irritação da boca e garganta, dor de estômago, náuseas, vômitos e diarreia (INCA, 2022).

No Brasil, os casos suspeitos de intoxicação exógena por agrotóxico devem ser obrigatoriamente notificados por todos os profissionais de saúde, no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) e é um fator determinante para medidas de vigilância (BRASIL, 2020). No período de 2012 a 2022, segundo dados do Sinan, houveram a notificação de 73.702 casos de intoxicação exógena por agrotóxicos. Destes, 1.290 casos houveram cura com sequelas e 2.064 óbitos decorrestes da intoxicação. O ano que apresentou mais casos nesta série histórica de 10 anos, foi o ano de 2019, com 8.592 casos notificados (DATASUS, 2023). Este mesmo ano, corresponde ao período no qual os índices de aprovação de agrotóxicos proibidos ou com restrição de uso aumentaram consideravelmente em relação a outros períodos (503 em 2019), o que pode estar relacionado a estes números (Hess; Nodari; Lopes-Ferreira, 2021). Atualmente, 2022 aparece com 6.010 casos. Comparando com a década de 2002 a 2012, onde houveram 38.216 casos notificados, a última década representou um aumento de aproximadamente 93% em notificações (DATASUS, 2023).

Em Santa Catarina, dados mais recentes do Centro de Informação e Assistência Toxicológica de Santa Catarina (CIATox/SC), mostram que em 2022 foram registradas 443

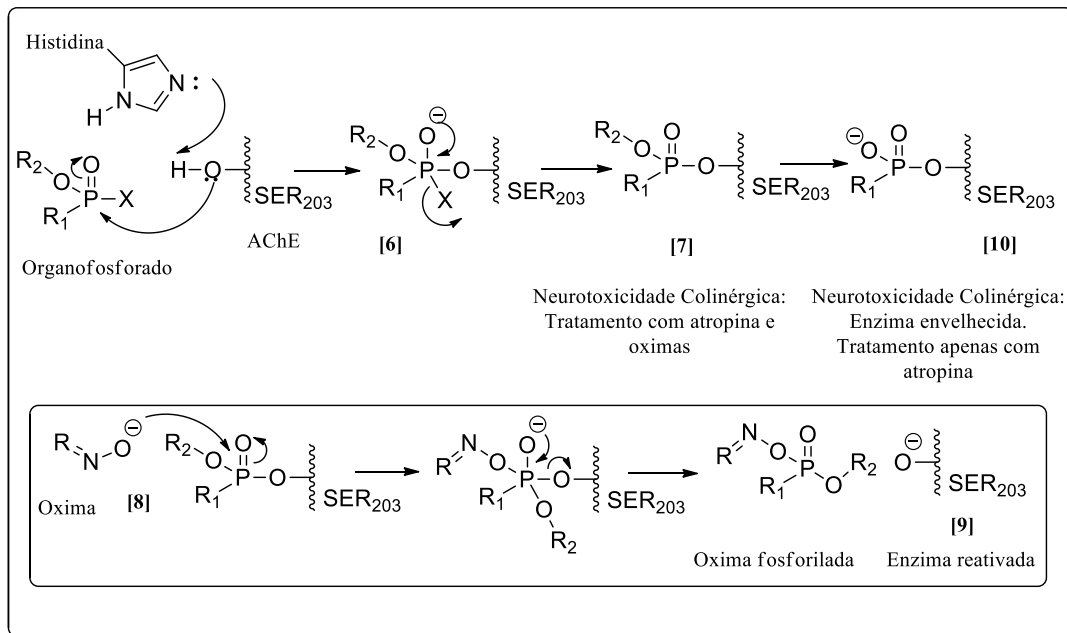
intoxicações relacionadas a agrotóxicos, correspondendo a 2,18 % do total de atendimentos de intoxicações. Do total de intoxicações relatadas, 5 pessoas vieram a óbito, e apresentavam idade entre 19 e 60 anos. Os agentes causadores de óbitos foram Paraquat, Diurom, chumbinho (carbamato ou organofosforado), clorpirifós e glifosato, utilizados em tentativa de suicídio. Cabe destacar também que, dentre os 10 agentes principais responsáveis por intoxicações em 2022, por faixa etária, em idosos acima de 60 anos, o sétimo agente principal envolvido em intoxicações foi o glifosato, envolvido em 19 registros, correspondendo a 2,17 % (CIATox/SC, 2023). No entanto, é importante destacar que os quadros de intoxicação, na maioria das vezes, não são notificados e estes números podem ser menores que os valores reais (Shinohara *et al.*, 2017).

Uma contribuição relevante da ciência em relação à investigação da toxicidade dos agrotóxicos através de experimentos controlados, e que vai além da toxicidade, diz respeito à compreensão do modo de ação das substâncias químicas (Hess; Nodari; Lopes-Ferreira, 2021). Os agrotóxicos representam um grupo heterogêneo de compostos que variam em sua estrutura química. Por isso, nem todos irão apresentar o mesmo efeito biológico decorrente da exposição humana. Contudo, elementos do grupo dos agrotóxicos podem se assemelhar estruturalmente (classes químicas) e apresentar o mesmo alvo bioquímico, causando efeitos semelhantes de intoxicação (PERES, 2003). Os organofosforados (OP) e carbamatos são dois grupos de agrotóxicos que exercem sua função tóxica por meio da inibição das enzimas colinesterases, mais especificamente da acetilcolinesterase (AChE). A AChE é responsável pela degradação da acetilcolina (ACh), mediador químico de sinapses do Sistema Nervoso Central (SNC), do Sistema Nervoso Periférico (SNP) e das junções neuromusculares. A inibição da acetilcolinesterase resulta no acúmulo da acetilcolina na fenda sináptica, resultando em manifestações tóxicas (convulsões, colapso no sistema nervoso central com perda do controle muscular, problemas respiratórios, etc.) (BRASIL, 2020; Petronilho; Figueroa-Villar, 2014).

Essa inibição ocorre, pois, dentro do sítio catalítico da AChE há um grupo hidroxila da serina (-OH). Os organofosforados têm afinidade com o sítio ativo da AChE e ligam-se covalentemente com a Ser₂₀₃. Esta ligação se dá entre o átomo de fósforo e o oxigênio da serina, com conseqüente desprendimento do grupo de saída do organofosforado (X) [6]. O grupo serina então torna-se fosforilado. Neste ponto, a ligação OP-serina pode hidrolisar e a enzima recupera sua função [7]. Neste caso, o tratamento da intoxicação pode ser realizado com atropina (antagonista muscarínico) e com oximas [8], grupos nucleofílicos que aumentam a taxa de hidrólise e reativação [9] e previnem o “envelhecimento” irreversível da enzima. Caso um grupo R saia da ligação OP-serina (dealquilação do grupo fosfato), a enzima “envelhece” e

torna-se irreversivelmente fosforilada e é permanentemente inibida [10]. Neste caso a possibilidade de reativação pelas oximas é mínima, sendo usada apenas a atropina para antagonizar os efeitos do acúmulo de ACh nos receptores colinérgicos. No Esquema 1, está demonstrado o processo de inibição da AChE pelos OP e o processo de hidrólise com o uso de oximas em enzimas não envelhecidas (King; Aaron, 2015).

Esquema 1 - Processo de inibição da AChE por OP e reativação por oximas.



Fonte: Adaptado de King; Aaron, 2015; Petronilho; Figueroa-Villar, 2014.

Os carbamatos também inibem a enzima AChE de forma idêntica. No sítio catalítico da AChE, a carbonila do carbamato é atacada pela hidroxila do resíduo de serina, neste momento, a histidina atua como uma base recebendo um próton. Em seguida, a histidina funcionará como um ácido doando um próton para a liberação de uma porção do carbamato. Nesta etapa, a enzima fica impedida de realizar a hidrólise da ACh, visto que seu sítio catalítico encontra-se ocupado. No entanto, a ligação carbamato-AChE é mais fraca do que a formada pelos OPs. Assim, as ligações carbamato-AChE hidrolisam espontaneamente mais rápido e a função da AChE retorna tipicamente dentro de 24 a 48 h. Ao contrário dos OPs, os carbamatos não envelhecem e a toxicidade prolongada é incomum (Araújo; Santos; Gonsalves, 2016; King; Aaron, 2015).

Os organoclorados induzem toxicidade principalmente por meio de regiões estimulantes do sistema nervoso central, atuando como antagonistas do ácido gama-aminobutírico (GABA), podendo causar sintomas agudos como náuseas, vômitos e contrações musculares involuntárias (PERES, 2003; Sharma *et al.*, 2020). Os piretróides atuam sobre a

permeabilidade iônica, produzindo uma série de efeitos na excitabilidade das terminações nervosas, dependendo do seu tipo e estrutura. O tipo I amplifica a frequência da abertura do canal de sódio sensível a voltagem, causando potenciais de ação repetitivos e que leva a chamada síndrome T (Tremores), caracterizada por tremores, sensibilidade a estímulos sensoriais, ataxia, convulsões e paralisia. O tipo II atrasa a inativação do canal de sódio, o que permite que os canais fiquem mais tempo abertos, tornando impossível a geração de um novo potencial de ação, induzindo a síndrome CS (Coreoatetose e Salivação), caracterizada por presença de hipersensibilidade a estímulos externos, contrações involuntárias, salivação e paralisia (Dallegrave, 2017; Fagundes, 2021).

2.1.3 Consequências decorrentes da exposição aos agrotóxicos: efeitos crônicos

Além dos sintomas de intoxicações agudas que os agrotóxicos podem causar, também podem ocorrer diversos problemas crônicos em vários sistemas do organismo humano. Estes são aqueles que aparecem após exposições repetidas a pequenas quantidades de agrotóxicos por um período prolongado (INCA, 2022). Não existe no país uma política que obrigue as agências governamentais ao constante monitoramento do efeito dos resíduos de agrotóxicos na água, nos alimentos e no meio ambiente, vias onde pode ocorrer uma contaminação crônica (Hess; Nodari; Lopes-Ferreira, 2021).

David Geier e Mark Geier, avaliaram a potencial relação dose-dependente inversa entre o aumento da presença de glifosato na urina – ingrediente ativo mais vendido no Brasil, no ano de 2021 - e a diminuição das concentrações de hormônios sexuais no sangue na população dos Estados Unidos, utilizando dados demográficos e testes laboratoriais da Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição de 2013–2014. Os resultados da modelagem estatística realizada neste estudo apontam uma correlação inversa significativa entre as concentrações de glifosato e estradiol total e uma tendência de correlação inversa entre as concentrações de glifosato e testosterona total, suportando a hipótese de que aumentos na concentração de glifosato urinário impactam significativamente as concentrações de hormônios sexuais no sangue (Geier; Geier, 2023).

Ait-Bali, Ba-Mhamed e Bennis, avaliaram os efeitos neurocomportamentais também do glifosato após exposição aguda, subcrônica (6 semanas) e crônica (12 semanas) (250 ou 500 mg/kg/dia) em camundongos tratados desde a idade juvenil até a idade adulta. Os resultados indicam que, ao contrário da exposição aguda, tanto a exposição subcrônica quanto a crônica ao glifosato induziram uma diminuição no ganho de peso corporal e na atividade

locomotora e um aumento nos níveis de ansiedade e comportamento do tipo depressão. Além disso, achados imuno-histoquímicos mostraram que o tratamento crônico induziu uma redução da imunorreatividade da tirosina hidroxilase e o tratamento subcrônico e crônico produziram uma redução da imunorreatividade de serotonina no núcleo dorsal da rafe, na amígdala basolateral e no córtex pré-frontal medial ventral. Os autores sugerem que a exposição ao glifosato desde a idade juvenil até a idade adulta em camundongos leva a alterações neurocomportamentais que decorrem do comprometimento dos processos de desenvolvimento neuronal (Ait Bali; Ba-Mhamed; Bennis, 2017).

Ait-Bali e colaboradores, também avaliaram a exposição pré e pós-natal ao herbicida à base de glifosato em Camundongos *Swiss* nas doses de 250 ou 500 mg/kg de glifosato durante a gravidez e a lactação. A taxa de fertilidade e o índice gestacional foram menores nos grupos tratados em comparação com o controle, assim como o número total de camundongos por ninhada. Na prole, o glifosato foi responsável por um atraso global nos reflexos inatos e um déficit no desenvolvimento motor. Na idade adulta, os animais expostos apresentaram diminuição da atividade locomotora, sociabilidade, aprendizado e memória de curto e longo prazo associados a alterações dos sistemas colinérgicos e dopaminérgicos. Além disso, apresentaram sinais de neuroinflamação no córtex pré-frontal medial e hipocampo (Ait-Bali *et al.*, 2020).

Estes efeitos neurocomportamentais podem ser observados em estudos transversais. Gonzaga, Baldo e Caldeira, objetivaram analisar a associação entre ideação suicida e exposição a agrotóxicos, comparando camponeses vivendo sob exposição ambiental a agrotóxicos em relação a camponeses envolvidos com práticas agroecológicas, sem o uso de agrotóxicos, no semiárido norte mineiro (Brasil). Os camponeses expostos a agrotóxicos, em relação a camponeses envolvidos com práticas agroecológicas, tiveram maiores chances para ideação suicida, consumo problemático de álcool e episódios prévios de intoxicação aguda por agrotóxicos. Os autores concluíram que as práticas agrícolas que implicam em exposição crônica a agrotóxicos se associam a maiores chances de ideação suicida, independentemente de episódios prévios de intoxicação aguda por agrotóxicos ou do uso problemático do álcool (Gonzaga; Baldo; Caldeira, 2021).

Mora e colaboradores, analisaram se níveis mais altos de exposição a pesticidas estariam associados a alterações na ativação cortical em trabalhadores rurais na Costa Rica. Neste estudo, foram medidas as concentrações de agrotóxicos e metabólitos em amostras de urina. Foram observadas associações negativas consistentes entre as concentrações de 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCPy) (metabólito do inseticida organofosforado clorpirifós), ácido 3-

fenoxibenzóico (3-PBA) e ácido 3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxílico (DCCA) (metabólitos de inseticidas piretróides) e a ativação cortical em regiões do córtex pré-frontal durante uma tarefa de memória de trabalho. Ou seja, trabalhadores que tinham maiores níveis de metabólitos na urina, tinham menores ativações cerebrais. Essas associações foram semelhantes, embora mais fracas, para as tarefas de atenção e flexibilidade cognitiva. Para biomarcadores de fungicidas e herbicidas, como o Mancozebi e o Glifosato, foram observadas associações nulas entre a concentração urinária e a ativação cerebral cortical durante tarefas de memória de trabalho, atenção e flexibilidade cognitiva (Mora *et al.*, 2022).

Os efeitos crônicos em decorrência da exposição aos agrotóxicos também são observados em animais. Pavan e colaboradores (2021), avaliaram os efeitos na sobrevivência, crescimento e danos em girinos de *Boana faber* e *Leptodactylus latrans* causados pela exposição crônica (7 dias) de concentrações relevantes encontradas em ambientes naturais e permitidas para águas brasileiras da mistura de glifosato + 2,4-D. A taxa de sobrevivência de *B. faber* foi em média 87,33 % e *L. latrans* 97,33 % e não houve diferença entre os tratamentos controle e mistura. As duas espécies apresentaram resultados diferentes para tamanho corporal quando comparado ao controle. Não houve diferença no comprimento e massa em *B. faber*, enquanto *L. latrans* apresentaram menor comprimento e menor massa em todos os tratamentos. A mistura de glifosato + 2,4-D causou natação irregular nas duas espécies, que apresentaram letargia e convulsões ou rajadas rápidas de natação. Todos os tratamentos causaram algum tipo de dano corporal, principalmente na boca dos girinos. Por fim, os autores concluem que existe um risco ecológico na exposição de girinos de *B. faber* e *L. latrans* a mistura destes dois agrotóxicos (Pavan *et al.*, 2021).

Os efeitos da exposição crônica a concentrações ambientais do glifosato e o 2,4-D separadamente (4,8 µg/L e 3,4 µg/L, respectivamente) também foram avaliadas em embriões de peixe-zebra em relação aos parâmetros iniciais de desenvolvimento, comportamento larval e implicações bioquímicas. A exposição ao glifosato diminuiu a sobrevivência, causou hiper mobilidade e comportamento do tipo ansiolítico, afetou negativamente o comportamento antipredatório das larvas e aumentou a atividade da acetilcolinesterase. A exposição ao 2,4-D causa apenas uma leve hiper mobilidade nas larvas e aumenta a atividade da acetilcolinesterase (AChE). O aumento na atividade de AChE é a chave para o comportamento hiper móvel e redução do comando controlado dos nervos observado nas larvas expostas ao glifosato e 2,4-D. A hiper mobilidade pode representar um risco para a sobrevivência dos peixes, pois facilita sua detecção pelo predador e aumenta as chances de serem predados. Não ocorreu prejuízo na eclosão, no movimento espontâneo ou a frequência cardíaca nos dois tratamentos

(Pompermaier *et al.*, 2022). Estes prejuízos podem não ter ocorrido devido as pequenas concentrações testadas. Lu e colaboradores, encontraram em maiores concentrações (30, 60, 90 e 120 mg/L) problemas na eclosão em peixe-zebra quando expostos ao glifosato e também distúrbios de ritmo cardíaco. O glifosato também afetou o desenvolvimento geral dos embriões do peixe-zebra, incluindo mortalidade, diminuição do comprimento do corpo, malformações, incluindo curvatura da coluna vertebral, edema pericárdico, encurtamento do comprimento do corpo e cauda curvada e malformações cardíacas, incluindo câmaras aumentadas, paredes ventriculares afinadas e distúrbios do ritmo (Lu *et al.*, 2022).

A investigação acerca da exposição aos agrotóxicos constitui um importante aspecto para a saúde pública. Os estudos científicos utilizando animais, visam investigar os riscos potenciais dos agrotóxicos e gerar dados sobre os impactos à saúde humana. As investigações acerca da exposição a múltiplos agrotóxicos, são importantes direcionamentos a serem feitos, contribuindo para o estabelecimento de novas relações causais no campo da saúde pública (Hess; Nodari; Lopes-Ferreira, 2021).

2.1.3.1 Desenvolvimento de tumores malignos

O câncer é um conjunto de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo. Um erro no processo de multiplicação celular dá origem a células anormais, que formam novas células danificadas que se multiplicam e formam massas tumorais, que podem ser benignas ou malignas. Células tumorais malignas migram para outros órgãos e tecidos para formar novos tumores e causar metástase em áreas adjacentes (Melanda *et al.*, 2022). Segundo a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer da Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que houveram 20 milhões de novos casos de câncer e 9,7 milhões de mortes em 2022. Estima-se também que cerca de 1 em cada 5 pessoas desenvolverá câncer durante a vida; cerca de 1 em cada 9 homens e 1 em cada 12 mulheres morrerão da doença (Ferlay *et al.*, 2024).

Os tipos de câncer tendem a apresentar diferentes incidências dependendo do sexo. Segundo estatísticas globais de 2020, em mulheres, os tipos de câncer mais incidentes foram: mama, pulmão, colorretal, cervical uterino, corpo do útero, ovário, estômago, fígado, linfoma Não-Hodgkin, leucemia, rim, esôfago, bexiga e lábios e cavidade oral. Entre os homens, os tipos de câncer mais incidentes foram: pulmão, próstata, colorretal, estômago, fígado, bexiga, esôfago, linfoma Não-Hodgkin, leucemia, rim e lábios e cavidade oral (Sung *et al.*, 2021).

Vários estudos relataram que as influências ambientais, incluindo a exposição a produtos químicos, representam um risco de causar instabilidade genômica e epigenômica nos

organismos, podendo causar câncer (Melanda *et al.*, 2022). Uma revisão sistemática e meta-análise, apoiou uma associação entre o potencial de exposição a pesticidas na agricultura e a incidência e mortalidade por câncer cerebral (Gatto; Ogata; Lytle, 2021). Outra meta-análise encontrou uma associação entre tumores cerebrais infantis e a exposição parental a pesticidas. Além disso, a exposição dos pais a pesticidas em ambientes domésticos está mais fortemente associada à TCC do que a exposição ocupacional dos pais aos pesticidas. Quando a exposição aos pesticidas ocorrem antes ou durante a gravidez e na primeira infância, a probabilidade de contribuição para o desenvolvimento de câncer cerebral jovens/adultos é maior (Feulefack *et al.*, 2021).

Um trabalho realizado no estado do Paraná/ Brasil, analisou a extensão da contaminação da água potável por 11 agrotóxicos comprovados, prováveis ou potencialmente cancerígenos em 127 municípios produtores de grãos. Noventa e sete por cento dos municípios apresentaram uma soma de todos os agrotóxicos em níveis significativamente acima (189,84 ppb) dos limites preconizados pela União Europeia (< 0,5 ppb). Utilizando a concentração média de pesticidas na água (ppb), a população exposta para cada município e a dose de referência para risco de desenvolvimento de câncer para cada pesticida (calculado para cada substância com base na concentração de pesticida necessária para produzir um caso de cancro por cada 10^4 ou 10^6 pessoas num intervalo de exposição de 70 anos), o número mínimo de casos de câncer atribuíveis à água potável contaminada com pesticidas durante o período foi estimada. Mais de 80 % foram atribuídos ao mancozebe- etilenotiouréia e ao diuron. Os casos atribuíveis ao glifosato- ácido aminometilfosfônico e ao diuron correlacionaram-se fortemente com o total de casos de câncer no mesmo período, bem como com os casos de câncer de mama. A contaminação da água foi significativamente correlacionada com a soma dos casos estimados de câncer para todos os 11 agrotóxicos detectados em cada cidade. Esses achados revelam extensa contaminação da água potável no estado do Paraná e sugerem que a contaminação pode aumentar o risco de câncer nesta região (Panis *et al.*, 2022).

2.1.4 Risco para a Segurança Alimentar

É evidente que o uso exacerbado de pesticidas convencionais traz problemas para a saúde da população, além de ser um fator que pode interferir na segurança alimentar. A segurança alimentar e nutricional consiste na realização do direito de todos ao acesso regular e permanente a alimentos de qualidade, em quantidade suficiente, sem comprometer o acesso a outras necessidades essenciais, tendo como base práticas alimentares promotoras de saúde que

respeitem a diversidade cultural e que sejam ambiental, cultural, econômica e socialmente sustentáveis (BRASIL, 2006). Nesse sentido, para ter alimentação adequada e saudável, não basta atentar somente para as características nutricionais dos alimentos. É preciso considerar sua procedência e a forma de produção (BRASIL, 2020).

A segurança alimentar está enquadrada dentro do segundo Objetivo de Desenvolvimento Sustentável (ODS) das Nações Unidas (ONU) - Fome zero e agricultura sustentável – onde tem-se como propostas centrais acabar com a fome, alcançar a segurança alimentar, a melhoria da nutrição e promover a agricultura sustentável. Para alcançar isto, é necessário garantir sistemas sustentáveis de produção de alimentos e implementar práticas agrícolas resilientes, que aumentem a produtividade e a produção, que ajudem a manter os ecossistemas e que melhorem progressivamente a qualidade da terra e do solo (ONU, 2023).

Além do risco para a segurança alimentar, os pesticidas sintéticos também podem ser tóxicos para plantas não-alvo, para microrganismos que habitam ao redor das plantas onde são aplicados e para todo o meio ambiente. Há também preocupações crescentes em relação ao desenvolvimento de resistência de pragas a esses pesticidas sintéticos (Khursheed *et al.*, 2022). Estes impactos são amplos, atingem vastos territórios e envolvem diferentes grupos populacionais, como trabalhadores em diversos ramos de atividades, moradores do entorno de fábricas e fazendas, além de todos que consomem alimentos contaminados (Carneiro *et al.*, 2015).

Segundo o relatório do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), que analisou amostras dos anos de 2017 e 2018, 51 % dos alimentos de origem vegetal representativos da dieta da população brasileira contém resíduos de agrotóxicos. Ao todo, foram analisadas 4.616 amostras de 14 alimentos de origem vegetal (abacaxi, alface, alho, arroz, batata-doce, beterraba, cenoura, chuchu, goiaba, laranja, manga, pimentão, tomate e uva). As amostras foram coletadas em estabelecimentos varejistas localizados em 77 municípios brasileiros (exceto no Estado do Paraná). Foram pesquisados até 270 agrotóxicos diferentes nas amostras analisadas. Do total de amostras analisadas, 2.254 (49 %) não foram detectados resíduos, e 1.290 (28 %) apresentaram resíduos com concentrações iguais ou inferiores ao Limite Máximo de Resíduos (LMR), estabelecido pela Anvisa. Foram consideradas insatisfatórias 1.072 amostras (23 %) em relação à conformidade com o LMR. Na Tabela 3 estão apresentados os alimentos analisados e a quantidade de amostras que apresentaram ou não resíduos de agrotóxicos (ANVISA, 2019b).

Foram detectados resíduos de 122 ingredientes ativos diferentes nas 4.616 amostras analisadas, o que resultou no total de 8.270 detecções. Os ingredientes ativos imidacloprido,

tebuconazol e carbendazim apresentaram o maior índice de detecções. Os ingredientes ativos acefato, clorpirifós e metomil foram os que apresentaram maior índice de detecções irregulares, sendo que apresentaram maior número de detecções para as quais não existem LMR estabelecido. A cipermetrina e o etefom apresentaram o maior número de detecções que excederam o LMR (ANVISA, 2019b).

Considerando-se estes resultados obtidos, o PARA realizou também a avaliação do risco agudo para todos os resíduos detectados de agrotóxicos que possuem dose de referência aguda (DRfA) estabelecida e parâmetro de segurança toxicológica aguda. Os resultados da referida avaliação indicaram que 0,89 % das amostras analisadas (n = 41) representam um potencial de risco agudo à saúde, ou seja, o consumo de uma grande proporção deste alimento em um período de 24 h, tem potencial de causar dano agudo à saúde devido a sua contaminação por agrotóxicos. Estas amostras que apresentaram risco agudo eram: laranja (27 amostras); goiaba (8 amostras); uva (4 amostras) e abacaxi (1 amostra) (ANVISA, 2019b).

Tabela 3 – Resultados dos alimentos analisados pelo PARA em 2017-2018.

Alimento	Quant. amostras	Sem resíduos	Com resíduos ≤ LMR	Com Resíduos > LMR	Com resíduos não autorizados
Cereais					
Arroz	329	220	94	8	7
Frutas					
Abacaxi	347	162	144	28	18
Goiaba	283	134	29	18	15
Laranja	382	157	173	5	48
Manga	350	216	102	32	31
Uva	319	84	149	49	48
Hortaliças					
Alface	286	106	94	31	48
Chuchu	288	247	15	0	26
Pimentão	326	7	52	79	263
Tomate	316	39	167	8	106
Raízes, Tubérculos e Bulbos					
Alho	365	326	22	1	16
Batata-doce	315	287	0	0	28
Beterraba	357	236	69	19	37
Cenoura	353	33	180	3	139

Fonte: ANVISA, 2019b.

Atualização mais recente do relatório do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) (ANVISA, 2023), analisou amostras do ano de 2022. Neste novo relatório, constatou-se que 58,9 % dos alimentos de origem vegetal representativos da

dieta da população brasileira contém resíduos de agrotóxicos. Ao todo, foram analisadas 1.772 amostras de 13 alimentos de origem vegetal (amendoim, batata, brócolis, café em pó, laranja, feijão, farinha de mandioca, maracujá, morango, pimentão, quiabo, repolho e farinha de trigo).

As amostras foram coletadas em estabelecimentos varejistas localizados em 79 municípios brasileiros. Foram pesquisados até 311 agrotóxicos diferentes nas amostras analisadas. Do total de amostras analisadas, 728 (41,1 %) não foram detectados resíduos, e 601 (33,9 %) apresentaram resíduos com concentrações iguais ou inferiores ao Limite Máximo de Resíduos (LMR), estabelecido pela Anvisa. Foram consideradas insatisfatórias 443 amostras (25 %), que apresentavam irregularidades em relação à conformidade com o LMR, contendo ingrediente ativo não permitido para a cultura ou não aprovado no Brasil (ANVISA, 2023). Na Tabela 4 estão apresentados os alimentos analisados e os resultados encontrados.

Tabela 4 - Resultados dos alimentos analisados pelo PARA em 2022.

Alimento	N.º amostras	Sem resíduos	≤ LMR	> LMR	Não AU	Ambos	% INS	% sem resíduos
Café								
Café (em pó)	158	123	33	1	1	-	1,27	77,85
Cereais								
Trigo (farinha)	152	14	126	6	6	-	7,90	9,21
Frutas								
Laranja	157	5	117	12	23	-	21,80	3,18
Maracujá	148	23	22	18	32	53	69,59	15,54
Morango	83	-	65	12	31	24	68,68	0
Hortaliças								
Brócolis	107	65	12	4	25	1	28,04	60,75
Pimentão	142	2	41	7	73	19	69,72	1,41
Quiabo	125	86	12	-	27	-	21,60	68,8
Repolho	144	62	31	0	51	-	35,42	43,06
Leguminosas e Oleaginosas								
Amendoim	101	99	2	-	-	-	0	98,02
Feijão	150	70	74	5	1	-	4,0	46,67
Raízes, Tubérculos e Bulbos								
Batata	154	34	105	13	1	1	9,74	22,08
Mandioca (farinha)	151	145	0	4	2	-	3,97	96,03

Fonte: ANVISA, 2023. Legenda: Ambos: Amostras com resíduos não autorizados e com resíduos acima do Limite Máximo de Resíduos. LMR: Limite Máximo Resíduos. Não AU: Amostras com resíduos não autorizados. % INS: Porcentagem de amostras insatisfatórias (com resíduos acima do limite e com resíduos não autorizados para a cultura).

Foram detectados resíduos de 98 ingredientes ativos diferentes nas 1.772 amostras analisadas, o que resultou no total de 3.668 detecções. Os dez ingredientes ativos mais

detectados foram em ordem alfabética: acefato, azoxistrobina, bifentrina, carbendazim, imidacloprido, malationa, mancozebe, pirimifós-metílico, procimidona, tebeconazol. Destes, seis são proibidos para uso agrícola na União Europeia, e um proibido no Brasil (carbendazim). Os alimentos que apresentaram maior contaminação por resíduos de agrotóxicos (menos de 10% das amostras se apresentavam livres de resíduos) foram morango, pimentão, laranja e farinha de trigo (ANVISA, 2023).

Um dos pontos preocupantes na saúde pública é a presença de resíduos acima dos níveis autorizados nos alimentos, decorrentes do uso crescente de agrotóxicos na produção agrícola. Devido à demanda aumentada de grãos, frutas e hortaliças, os agricultores têm sido estimulados a utilizarem uma variedade maior de produtos para reduzir perdas e aumentar a produtividade das safras. Isto conseqüentemente leva ao uso indiscriminado de químicos, colocando em risco a saúde de produtores e consumidores (Shinohara *et al.*, 2017). Este assunto é ainda mais preocupante pois em relação aos limites máximos de resíduos, estes variam muito de acordo com o país. Enquanto certos pesticidas são banidos ou possuem uso restrito em alguns países, equivalentes são de uso livre ou pouco restrito em outros, mesmo com inúmeras tentativas para a criação de padrões internacionais no âmbito da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), da Organização Mundial do Comércio (OMC), da Organização Mundial da Saúde (OMS) e especialmente por meio da Comissão do *Codex Alimentarius* (Moraes, 2019).

Outro ponto importante é que em um mesmo alimento pode conter mais de um resíduo de agrotóxico detectado. Há uma preocupação quanto aos resíduos de agrotóxicos detectados em uma mesma amostra que possuem um mesmo modo de ação, tendo em vista a possibilidade de potencialização de efeitos adversos à saúde. A presença de múltiplos resíduos em uma mesma amostra pode ser resultante da aplicação de diferentes tipos de agrotóxicos utilizados contra diferentes pragas ou doenças, por exemplo, inseticidas, fungicidas e herbicidas. Além disso, algumas formulações contêm mais de um agrotóxico, que geralmente possuem diferentes modos de ação no organismo alvo. O uso de agrotóxicos com diferentes modos de ação é uma das estratégias adotadas de manejo integrado de pragas, a fim de minimizar o desenvolvimento de resistência de pragas a agrotóxicos. Outras possíveis razões para a ocorrência de múltiplos resíduos são: mistura de lotes de produtos alimentícios que foram tratados com diferentes agrotóxicos durante a amostragem; emprego de mais de um agrotóxico em uma mesma cultura, sem levar em consideração as boas práticas agrícolas; resíduos provenientes da absorção do solo, nos casos de agrotóxicos com elevada persistência; resíduos resultantes de contaminação cruzada no tratamento das culturas no campo; contaminação

durante o manuseio, embalagem e armazenamento (ANVISA, 2016).

As pragas agrícolas também possuem a capacidade de desenvolver resistência aos agrotóxicos aplicados. Com o tempo, os agrotóxicos vão perdendo eficácia e levando os agricultores a aumentar as doses aplicadas e/ ou recorrer a novos produtos. Outro elemento chave neste processo é que o desequilíbrio ambiental, provocado por esses sistemas, que leva ao surgimento de novas pragas. Insetos ou plantas que antes não provocavam danos às lavouras, passam a se comportar como invasores e atacar as plantações (Shinohara *et al.*, 2017).

O *Botrytis cinera*, por exemplo, é um dos patógenos fúngicos mais destrutivos que podem causar doenças em numerosas espécies de plantas, principalmente alimentícias. O fungo demanda frequentes aplicações de fungicidas, que resultam em resistências da praga e também no aumento de contaminações nos alimentos que recebem muitas aplicações de fungicidas. Já foi relatado em todo mundo e em várias culturas, o aumento de cepas isoladas de *B. cinerea* resistentes a uma ou várias classes de fungicidas (Malandrakis *et al.*, 2022; Xiao *et al.*, 2021).

2.1.4.1 *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea é um importante fitopatógeno com uma ampla variedade de plantas hospedeiras. Este fungo causa a doença do mofo cinzento em mais de 200 espécies de plantas, incluindo a maioria das hortaliças, frutas, árvores e flores. No Brasil, as principais culturas nas quais o mofo cinzento ocorre são: ornamentais (rosa, violeta, gerânio, begônia, lírio, gérbera e outras); frutíferas (uva, morango, maçã, pera, ameixas e outras); hortícolas (tomate, alface, pimentão, cebola e outros) e mudas de eucalipto em viveiro, durante o enraizamento. Pode atacar como necrotrófico muitos órgãos, incluindo folhas, caules e frutos, muitas vezes causando grandes perdas após a colheita. É também um saprófita em materiais vegetais senescentes e mortos. Em vista da ampla gama de hospedeiros, ampla faixa geográfica de ocorrência e potencial para desenvolvimento de epidemias severas e rápidas, *B. cinerea* é um fitopatógeno importante e difícil de controlar (Morandi; Maffia, 2005; Nakajima; Akutsu, 2014).

O controle químico continua sendo a principal forma de reduzir a incidência de mofo cinzento nas principais culturas. No entanto, devido ao desenvolvimento de multirresistência em cepas de campo do fungo, essa estratégia é apenas parcialmente bem-sucedida. O controle químico também é dificultado, pois o patógeno pode infectar praticamente todas as partes de plantas em quase todos os estágios de crescimento e em pós-colheita

(Morandi; Maffia, 2005; Nakajima; Akutsu, 2014).

As infecções por *B. cinerea* podem ocorrer antes da colheita, na fase de campo, e podem permanecer latentes até o armazenamento, quando o patógeno assume vantagem para o desenvolvimento de doenças devido à alta umidade relativa e baixas temperaturas, que retardam as defesas do hospedeiro. No início das infecções, é visível uma área circular mais escura onde os tecidos do fruto são mais moles do que as outras partes do fruto. Posteriormente, pode desenvolver-se esporificação abundante, cuja cor varia de branco a cinza. A infecção começa a partir de aberturas naturais ou feridas mecânicas que ocorrem. Frequentemente, *B. cinerea* pode se desenvolver a partir de frutas podres ao lado de frutas saudáveis, causando extensa degradação da mercadoria. *B. cinerea* é um exemplo típico de fungo necrotrófico: primeiro mata as células da planta hospedeira e depois coloniza o tecido morto. A temperatura mínima para crescimento é 0 °C, a ótima é 20 °C, e a máxima é de 30 °C. Portanto, *B. cinerea* se desenvolve bem durante o armazenamento refrigerado de frutas e vegetais (Romanazzi; Feliziani, 2014). Na Figura 2, é possível observar infecções de mofo cinzento em framboesas armazenadas (canto superior esquerdo), kiwi (canto superior direito), melão (canto inferior esquerdo) e mancha inicial em uva de mesa (canto inferior direito).

O controle tradicional da infecção pelo mofo cinzento consiste na aplicação de fungicidas sintéticos no campo durante o ciclo de cultivo. Por causa da falta de métodos eficazes para prever o risco desta doença, aplicações preventivas, antes do aparecimento dos sintomas da doença são recomendados. Por exemplo, para uvas de mesa, geralmente são realizadas quatro aplicações de fungicidas no final da floração, fechamento do cacho, amadurecimento e 3 semanas antes da colheita. Para morangos, os fungicidas são aplicados em torno da floração e são repetidos até a colheita, dependendo das condições climáticas e do intervalo pré-colheita da fórmula (Romanazzi; Feliziani, 2014).

Embora a aplicação de fungicidas sintéticos no campo continue sendo o método mais comum para controlar a podridão pós-colheita de frutas e hortaliças, sua aplicação tem vários aspectos negativos que precisam ser levados em consideração. A crescente preocupação pública com os resíduos de fungicidas tem contribuído para o interesse no desenvolvimento de métodos alternativos. Entre os compostos naturais, extratos de plantas e óleos essenciais têm sido relatados para controlar doenças pós-colheita, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e prolongar a qualidade geral e o tempo de armazenamento de produtos frescos (Romanazzi; Feliziani, 2014).

Figura 2 - Mofo cinzento em diferentes frutas.



Fonte: Romanazzi; Feliziani, 2014.

O fungo consta na lista de hierarquização de pragas de maior risco fitossanitário do Brasil, como categoria de risco muito alto. Este processo de hierarquização é um instrumento de direcionamento para priorização da análise de registro de novos produtos que visem o controle das pragas de maior risco fitossanitário para as diferentes culturas agrícolas. Atualmente a lista conta com 83 pragas divididas em muito alto, alto e médio. Os resultados obtidos no processo de hierarquização de pragas também devem ser considerados como instrumento balizador e direcionador das prioridades institucionais de pesquisa científica aplicada ao setor agropecuário, tanto por parte da Embrapa, quanto das demais instituições de pesquisa nos diferentes níveis de atuação em todo o território nacional. Sendo assim, novos produtos com a finalidade de controle do *B. cinerea* são prioridades de pesquisa e registro no Brasil (MAPA, 2022).

2.2 ALTERNATIVAS PROMISSORAS

2.2.1 Biopesticidas

Uma das alternativas aos agrotóxicos convencionais e ecologicamente correta são os biopesticidas. O termo biopesticida é usado para se referir a pesticidas produzidos naturalmente por organismos vivos como microorganismos, plantas, animais, etc. (Sharma *et al.*, 2020). Os biopesticidas são comparativamente mais seguros de usar e geralmente têm várias vantagens em comparação com os pesticidas convencionais. São inerentemente menos tóxicos

para os seres humanos e para o meio ambiente e não deixam resíduos nocivos. Frequentemente, eles afetam apenas a praga-alvo e organismos intimamente relacionados, reduzindo substancialmente o impacto em espécies não-alvo (Sporleder; Lacey, 2013). Geralmente são eficazes em quantidades muito pequenas, podendo se decompor rapidamente, evitando em grande parte os problemas de poluição residual. Quando usados como um componente dos programas de Manejo Integrado de Pragas (utilização de táticas de controle de pragas, isolada ou harmoniosamente articuladas em uma estratégia de manejo, baseado em análises de custo/benefício que levam em consideração os interesses e impactos dos produtores, da sociedade e do meio ambiente), os biopesticidas podem reduzir muito o uso de pesticidas convencionais, enquanto o rendimento das culturas permanece alto (EPA, 2022; Kogan, 1998). Apesar de apresentar vantagens evidentes, os biopesticidas possuem algumas desvantagens que retardam a sua aceitação. Eles possuem uma ação mais lenta comparada aos pesticidas convencionais, são suscetíveis às condições climáticas adversas e o tempo de aplicação impacta fortemente na sua eficácia. Quanto mais cedo no desenvolvimento da doença for iniciado o seu uso, mais eficaz será o produto (Khurshed *et al.*, 2022).

Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), os biopesticidas se enquadram em três classes principais: 1) Pesticidas microbianos: consistem em um microrganismo (por exemplo, uma bactéria, fungo, vírus ou protozoário) como ingrediente ativo. Pesticidas microbianos podem controlar muitos tipos diferentes de pragas, embora cada ingrediente ativo separado seja relativamente específico para sua praga alvo. Os pesticidas microbianos mais amplamente utilizados são subespécies e cepas de *Bacillus thuringiensis*. Cada cepa dessa bactéria produz uma mistura diferente de proteínas e mata especificamente uma ou algumas espécies relacionadas de larvas de insetos. As espécies de insetos-alvo são determinadas pelo fato de o *B. thuringiensis* produzir uma proteína que pode se ligar a um receptor do intestino larval, fazendo com que as larvas do inseto morram de fome. Outra classe de biopesticidas são os 2) Protetores incorporados à planta (PIPs): que são substâncias pesticidas que as plantas produzem a partir de material genético que foi adicionado à planta. Por exemplo, o gene da proteína pesticida *Bacillus thuringiensis* pode ser introduzido no próprio material genético da planta. Então a planta, em vez da bactéria, fabrica a substância que destrói a praga. Outros biopesticidas são classificados como 3) Pesticidas bioquímicos: que são substâncias naturais que controlam pragas. Pesticidas bioquímicos incluem substâncias que interferem no acasalamento, como feromônios sexuais de insetos e outros semioquímicos, bem como extratos de plantas (EPA, 2022).

Os pesticidas bioquímicos podem ser vistos como intimamente relacionados aos

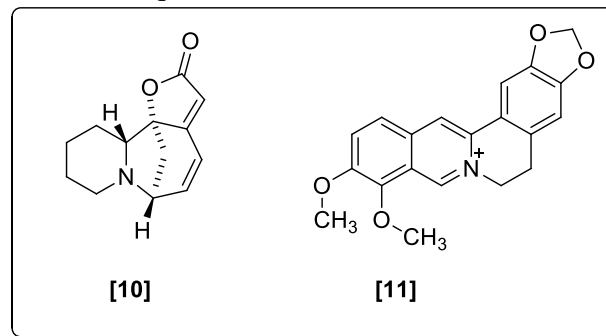
pesticidas químicos convencionais, mas são distintos porque ocorrem naturalmente, podendo o ingrediente ativo ser um análogo sintético da substância natural. Os pesticidas bioquímicos podem ser separados de acordo com as categorias funcionais em extratos vegetais (botânicos), semioquímicos, metabólitos e reguladores de crescimento (Sporleder; Lacey, 2013).

As plantas são a principal fonte de biossíntese de produtos naturais bioativos e fornecem alternativas importantes aos agentes químicos/sintéticos de controle de pragas atualmente usados. Todos os produtos naturais biossintetizados pelas plantas são agrupados em metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários compreendem os compostos necessários para o desenvolvimento da planta, como ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e carboidratos. Os metabólitos secundários são os principais constituintes que participam do mecanismo de defesa das plantas e podem ser classificados como compostos fenólicos (como ácidos fenólicos, ligninas, taninos, flavonoides, estilbenos, lignanos e cumarinas), terpenos (como carotenoides, glicosídeos cardiotônicos, compostos voláteis e esteróis) e compostos contendo nitrogênio (como glucosinolatos e alcaloides) (Khursheed *et al.*, 2022; Simões *et al.*, 2017). Cada espécie de planta desenvolve metabólitos secundários específicos para se proteger de pragas e outros interferentes ambientais, possuindo um fitocomplexo único. Por exemplo, óleo de Neem (*Azadirachta indica*), muito usado como biopesticida, contém azadiractina como principal ingrediente ativo (Sporleder; Lacey, 2013). As piretrinas, são inseticidas naturais, encontradas nas flores de crisântemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) (BRASIL, 2020).

Os efeitos pesticidas de produtos botânicos podem ser tanto pelo sinergismos das moléculas presentes em extratos brutos, quanto na forma de moléculas ativas (Dinesh *et al.*, 2014). Os alcaloides, por exemplo, são compostos nitrogenados encontrados predominantemente nas angiospermas. Na sua grande maioria, possuem caráter alcalino, grande diversidade estrutural e presença de grupamentos cíclicos, representando cerca de 20% das substâncias naturais descritas. Tem sido relatado que muitas plantas que produzem alcaloides são evitadas por animais ou insetos em sua dieta, isto certamente devido a sua toxicidade ou ao fato de a maioria dos alcaloides ter gosto amargo (Simões *et al.*, 2017). Nos últimos anos, os pesquisadores descobriram que os alcaloides também desempenham um papel importante nos processos agrícolas e suas atividades refletem principalmente a atividades fungicidas, inseticidas, antivirais, acaricidas e herbicidas (Wu *et al.*, 2021). O alcaloide securinina [10] isolado de *Phyllanthus amarus*, foi avaliado contra a germinação de esporos de alguns fungos fitopatogênicos. *Alternaria brassicicola*, *Curvularia luneta*, *Curvularia pallenscens* e *Helminthosporium spiciferum* foram altamente sensíveis, e ocorreu a inibição completa da germinação de esporos em concentrações muito baixas (Singh *et al.*, 2008).

A berberina [11], um alcaloide benzilisoquinólico encontrado principalmente em plantas como *Berberis*, *Coscinium* e *Coptis*, mostrou atividade antifúngica notável *in vitro* contra patógenos de arroz, incluindo *Bipolaris oryzae*, *Curvularia lunata*, *Pyricularia oryzae* e *Rhizoctonia solani*. A berberina na concentração de 5 mg/mL mostrou supressão efetiva da doença da mancha marrom no arroz quando aplicada antes da inoculação do patógeno. Também apresentou maior atividade fungicida na supressão da mancha-parda em plantas com 30 e 60 dias de idade do que o difenoconazol e o mancozebe quando aplicados após a inoculação do patógeno. Além disso, a berberina na concentração de 10 mg/mL reduziu significativamente a porcentagem de severidade da brusone do arroz em 49,81%, o que foi semelhante à ação do difenoconazol e mancozeb quando aplicados duas vezes em condições de campo. Esses resultados indicaram que a berberina é um composto bioativo promissor que pode ser desenvolvido como um composto principal em um novo fungicida para controlar a mancha marrom e as doenças da brusone do arroz (Kokkrua *et al.*, 2020). Na Figura 3, é mostrado as estruturas dos alcaloides securinina e berberina. Outra planta onde foram identificados alcaloides é a *Allamanda cathartica*. Esta planta tem-se mostrado promissora fonte de novas moléculas de interesse (Prabhadevi *et al.*, 2012).

Figura 3 - Estrutura químicas dos alcaloides securinina e berberina.



Fonte: Adaptado de KOKKRUA *et al.*, 2019; SINGH *et al.*, 2008.

2.2.2 Fármacos derivados de produtos naturais

Os produtos naturais representam uma fonte primordial de novos medicamentos. Numerosos produtos naturais derivados de plantas demonstraram potentes propriedades antitumorais, atraindo assim um interesse considerável no seu potencial como medicamentos antitumorais (Hui *et al.*, 2024). Cerca de 25 % dos medicamentos anticâncer registrados no período de 1981 a 2019 são de origem natural, origem natural botânica ou derivado de um produto natural. Mais especificadamente, 17% são de origem botânica (Newman; Cragg, 2020).

Existem na literatura uma variedade de compostos bioativos promissores com potencial para serem usados como novos medicamentos ou servirem como pistas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes farmacológicos. Por exemplo, para Leucemia Mieloide Aguda, existem muitos compostos promissores, pertencendo na sua maioria a classes como polifenóis (principalmente flavonóides), alcalóides, compostos organossulfurados e terpenóides (Egbuna *et al.*, 2023). A curina, um alcalóide natural isolado de *Chondrodendron platyphyllum*, causou efeito citotóxico em células K562 após 48 h de exposição, com um IC₅₀ de 3,8 µM. Para o câncer de mama, o extrato etanólico bruto de *Houttuynia cordata* Thunb, reduziu a viabilidade celular de células MCF-7 e MDA-MB-231 em concentrações menores que 200 µg/mL. No entanto, não houve efeitos prejudiciais nas células NIH3T3 (saudáveis), em concentrações superiores a 200 µg/mL (Inthi *et al.*, 2023), mostrando que o extrato foi seletivo para células tumorais.

A icaritina, composto natural derivado de plantas medicinais da família *Epimedium*, foi testada contra células de câncer de colo do útero, HeLa e SiHa. As taxas de proliferação das células foram significativamente suprimidas e após 48 h de tratamento, os valores de IC₅₀ para células HeLa e SiHa foram de 12,5 e 17 µM, respectivamente, enquanto em fibroblastos não cancerosos CCD-1095Sk e em células epiteliais H293, a viabilidade celular não foi alterada. Estes resultados indicaram que a icaritina foi seletivamente mais tóxica para as células cancerígenas (Chen *et al.*, 2019).

Para diminuir a taxa de mortalidade nos casos de câncer, até o momento, existem várias intervenções terapêuticas, incluindo cirurgia, quimioterapia, terapia hormonal e radioterapia. No entanto, a resistência terapêutica, a recorrência e a falta de tratamento para casos de metástases são os principais desafios que ainda precisam ser enfrentados (Siddiqui *et al.*, 2015). Os resultados promissores encontrados na literatura, de produtos naturais, mostram que estes ainda se mostram uma alternativa promissora para o descobrimento de novos fármacos para suprir estas necessidades.

2.2.3 *Allamanda cathartica*

A família Apocynaceae, comumente conhecida como família oleandro, contém cerca de 200 gêneros e 2.000 espécies, sendo mais comumente encontradas em regiões tropicais e subtropicais e possuem grande valor ornamental. Essas plantas também são bem conhecidas pelos alcaloides que contêm, muitos dos quais são venenosos (Joselin *et al.*, 2012).

Allamanda cathartica L. é um arbusto nativo brasileiro, pertencente à família

Apocynaceae, que ocorre em todas as regiões do Brasil. Na Figura 4 é apresentada a planta em época de floração. Em diferentes regiões brasileiras, pode ser conhecida popularmente como dedal-de-princesa, dedal-de-rainha e margarida (BRASIL, 2023). Este gênero recebeu o nome do botânico suíço do século XVIII, Dr. Frederic Allamand, que enviou suas sementes a Linnaeus. A palavra “*cathartica*” significa purgativo (Prabhadevi *et al.*, 2012).

No Brasil, a espécie não consta na composição dos produtos tradicionais fitoterápicos (BRASIL, 2014), entretanto o seu uso tradicional é alegado em alguns locais. Tradicionalmente, *A. cathartica* é utilizada no tratamento da malária por povos indígenas na Nigéria (Dike; Obembe; Adebisi, 2012). Partes aéreas da planta, preparada por maceração por curandeiros e pessoas conhecedoras de plantas, também são usadas na região de Antioquia/Colômbia contra picada de cobra por via oral (Vásquez *et al.*, 2013), e também na forma de banho (Otero *et al.*, 2000). Na ilha de Rodrigues, no Oceano Índico, as folhas da planta são reportadas, na forma de infusão, para o tratamento de febre por infecções (Samoisy; Mahomoodally, 2016) e para icterícia neonatal (Samoisy; Mahomoodally, 2015). O uso do látex é reportado por jovens na Guiana Francesa para irritações oculares (Tareau; Palisse; Odonne, 2017). No Brasil, o uso tradicional de *A. cathartica* é relatado no livro *Formulary and Medical Guide* de Pedro Luiz Napoleão Chernoviz, como catártico, já em 1920 (Ricardo *et al.*, 2017).

Alguns autores evidenciam que a planta pode causar toxicidade, principalmente devido a plumericina, que está presente em toda a planta. A toxina é um irritante gastrointestinal leve e pode causar cólicas abdominais e diarreia. Também é relatado conjuntivite, irritação dos lábios, língua e boca, vômitos e dermatite (Anadón *et al.*, 2018; Banasik; Stedeford, 2014; Barr, 2013).

Figura 4 - *Allamanda cathartica*.



Fonte: Autora, 2022.

Estudos farmacológicos preliminares feitos com a planta ou compostos isolados demonstram resultados interessantes. O extrato aquoso das folhas de *A. cathartica* por via tópica, promoveu atividade cicatrizante significativa em modelo animal de feridas em ratos *Sprague Dawley*, assim como alta taxa de contração da ferida, diminuição do período de epitelização e alta resistência à ruptura da pele, além da presença de menor número de células inflamatórias e maior formação de colágeno do que no grupo controle (Nayak *et al.*, 2006). O plumerídeo, extraído das folhas da planta, exibiu fungitoxicidade absoluta no teste antidermatofítico contra *Epidermophyton floccosum* e *Microsporum gypseum*, inibindo completamente o crescimento, sendo designado como o princípio antidermatofítico de *A. cathartica* (Tiwari; Pandey; Dubey, 2002). A administração oral de plumerídeo também foi testada para efeitos contraceptivos e os resultados demonstram que o composto é capaz de interromper a espermatogênese em ratos *Wistar* machos sem efeitos colaterais perceptíveis (Gupta *et al.*, 2004). O plumerídeo e o extrato etanólico das flores da planta também já apresentam efeito tipo antidepressivo em Camundongos *Swiss-webster* fêmeas e não apresentaram sinais de toxicidade aguda em ratos *Wistar* fêmeas (Bonomini *et al.*, 2017).

Alguns autores também realizaram testes pesticidas preliminares com *Allamanda cathartica*, demonstrando resultados atrativos. Mone e colaboradores, testaram extratos das folhas da planta extraídos por Soxhlet com diversos solventes para os fungos fitopatogênicos *Phomopsis vexans*, *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. Os extratos obtidos por metanol, etanol absoluto e acetato de etila inibiram completamente o crescimento de todos os fungos, enquanto o extrato obtido com etanol 50 % (1:1 v/v) inibiu entre 74-86 % o crescimento dos fungos (Mone *et al.*, 2014).

O extrato aquoso das folhas de *A. cathartica* também foram avaliados quanto a sua atividade adulticida e ovicida no ácaro vermelho (*Oligonychus coffeae*), que se alimenta de café, uva, caju, manga e muitas outras plantas tropicais, além de muitos tipos de chás. O extrato, na concentração de 5 % causou morte de todos os indivíduos adultos após 96 h de exposição e na concentração de 2,5 % impediu a eclosão de 100 % dos ovos (Radhakrishnan; Prabhakaran, 2014). Em *Tribolium castaneum* fase larval, a fração de éter de petróleo do extrato metanólico das folhas apresentou valores de LD₅₀ (dose capaz de matar 50 % dos indivíduos) em 24, 48 e 72 h respectivamente de 684 µg/cm³, 319 µg/cm³, 225 µg/cm³ (Mannan *et al.*, 2017).

O pó das sementes de *A. cathartica* e infusões a frio feitas com este pó, foram usados para testar sua atividade moluscicida em *Bradybaena similares*. A exposição do pó das sementes e da infusão mostrou efeito letal nos moluscos após 48 h de exposição, número maior ao observado comparado ao grupo com menor tempo de exposição. Também foram observados

alterações no metabolismo dos moluscos com o uso do pó das sementes (Lustrino *et al.*, 2008). O extrato aquoso das folhas de *A. cathartica* nesta mesma espécie não foi letal para os indivíduos adultos em até 48 h, mas se mostrou como um irritante (Nascimento *et al.*, 2006).

Nur *et al.*, realizaram uma triagem para atividade antifúngica de extratos brutos do caule de *A. cathartica* contra *Pyricularia oryzae*, um agente causador da brusone do arroz. Os extratos foram produzidos com solventes em polaridade crescente, hexano, clorofórmio e metanol. Entre os extratos brutos avaliados, o extrato obtido por clorofórmio apresentou a maior porcentagem de inibição (60 %), seguido por metanol (57,5 %) e hexano (22 %). A atividade antifúngica aumentou à medida que a concentração do extrato aumentou de 1.000 para 10.000 ppm. Esses resultados demonstram que a maior inibição ocorreu pelos compostos polares intermediários, extraídos com o clorofórmio (Nur *et al.*, 2019).

Extratos de *A. cathartica* e suas aplicações na preparação de pesticidas também já foram patenteados em 2009, mostrando o potencial da planta. Na patente chinesa, os extratos foram obtidos a partir de toda a planta triturada e extraída com álcool metílico, acetona ou acetato de hexila, separadamente. A extração é realizada em ultrassom, de 30-40 min a 30-50 °C por duas a três horas. Posteriormente, os extratos foram secos e utilizados na preparação de um inseticida em creme, uma microemulsão, um pó molhável e um creme aquoso, utilizado contra os insetos *Brontispa longissima* (besouro da folha do coco); *Aleurodicus dispersus* Russell (mosca-branca espiralada) e *Spodoptera litura* Fabricius (Bicho-da-folha do algodão asiático) (CATAS, 2009).

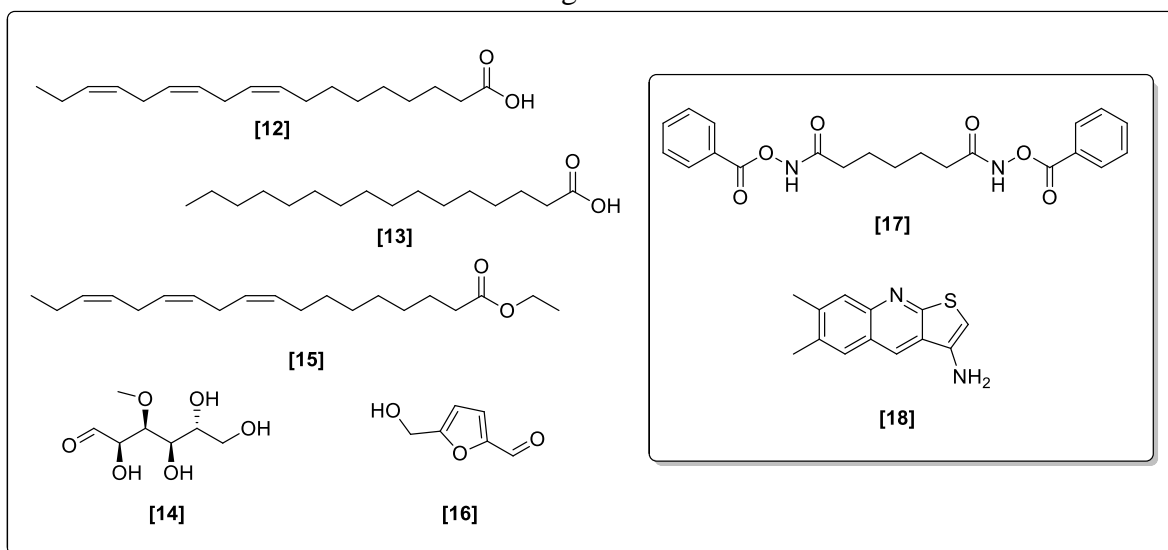
Há estudos também que demonstram que os extratos de *A. cathartica* não são tão interessantes para o controle de alguns patógenos. O extrato aquoso das flores de *A. cathartica* não apresentou atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas marginalis*, patógenos que causam podridão e necrose em plantas, como a mostarda (Sarkar; Kalita, 2022). O extrato metanólico/aquoso das folhas da planta, na concentração de 2 mg/mL inibiu o crescimento micelial de *Aspergillus flavus*, produtor de aflatoxinas, em apenas 12 %, enquanto outras espécies demonstraram resultados de até 98 % de inibição, demonstrando baixa atividade em *A. flavus* (Shukla *et al.*, 2012).

Em relação a composição fitoquímica de *A. cathartica*, em uma triagem química de extratos das flores de *A. cathartica* produzidas na Índia, foi possível identificar diferentes constituintes extraídos com solventes de polaridades diferentes. No extrato aquoso, os testes se mostraram positivos para a presença de compostos fenólicos, flavonoides, saponinas, esteroides, cumarinas, quinonas e carboidratos. No extrato de éter de petróleo, os testes foram positivos para glicosídeos, terpenoides e esteroides. No extrato clorofórmico, identificou-se a

presença de glicosídeos, cumarinas, fitoesteróis e carboidratos. O extrato produzido com acetona, mostrou-se positivo para compostos fenólicos, flavonoides, terpenoides, esteroides, cumarinas, proteínas e carboidratos. O extrato etanólico foi o que apresentou melhores resultados, com identificação de oito constituintes, sendo eles flavonoides, saponinas, glicosídeos, esteroides, cumarinas, quinonas, proteínas e carboidratos (Joselin *et al.*, 2012). Nas folhas da planta, colhidas na região de Bangladesh no mês de maio, também foram identificados diferentes compostos extraídos com solventes com polaridades diferentes. Na fração de éter de petróleo e metanólica, os testes apontaram a presença de alcaloides, esteroides e saponinas. Na fração clorofórmica, estão presentes alcaloides, glicosídeos, taninos e esteroides. Na fração de acetato de etila, foram encontrados alcaloides, glicosídeos, taninos, saponinas e esteroides, sendo o melhor solvente dentre os testados (Mannan *et al.*, 2017).

Prabhadevi e colaboradores, analisaram os extratos etanólicos das folhas e galhos de *A. cathartica* colhidos na Índia, por Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-MS). As análises de GC-MS determinaram a presença de 28 compostos fitoquímicos diferentes no extrato etanólico das folhas de *A. cathartica*. Os principais fitoconstituintes foram ácido 9,12,15-octadecatrienoico (*Z,Z,Z*) [12] (16,39 %) (ácido linoleico), ácido *n*-hexadecanóico [13] (14,08 %) (ácido palmítico), 3-*O*-metil-d-glicose [14] (11,03%) (açúcar) e éster etílico do ácido 9,12,15-octadecatrienoico (*Z,Z,Z*) [15] (10,58 %) (éster). Também foram encontrados nas folhas álcoois, flavonoides, compostos aromáticos, terpenos, entre outros. O extrato etanólico dos galhos de *A. cathartica* apresentou 26 diferentes compostos bioativos. Os principais são 3-*O*-metil-D-glicose [14] (29,86 %) (açúcar), 2-furancarboxaldeído 5-(hidroximetil) [16] (14,87 %) (composto aromático), ácido *n*-hexadecanóico [13] (9,13 %) (ácido palmítico) e ácido 9,12,15-octadecatrienoico (*Z,Z,Z*) [12] (7,34 %) (ácido linoleico). Neste mesmo trabalho, os autores descrevem a presença de dois alcaloides nos galhos da planta, *N*¹,*N*⁷-bis(benzoiloxi)heptanodiamida [17] e 6,7-dimetiltieno(2,3-b)quinolin-3-ilamina [18], compostos de interesse desta pesquisa (Prabhadevi *et al.*, 2012). Na Figura 5, estão as estruturas dos constituintes majoritários das folhas e galhos de *Allamanda* e os alcaloides encontrados nos seus galhos.

Figura 5 - Constituintes majoritários de folhas e galhos de *A. cathartica* e alcaloides encontrados nos galhos de *A. cathartica*.



Fonte: PRABHADEVI *et al.*, 2012.

3 AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS DE *Allamanda cathartica*

3.1 METODOLOGIA

3.1.1 Produção dos Extratos

Flores, folhas e galhos saudáveis de *A. cathartica* foram colhidos no mês de fevereiro de 2023, no horto florestal da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), Criciúma/SC, Brasil. Um exemplar da espécie foi colhido e levado ao Herbário Pe. Dr. Raulino Reitz (CRI) para a identificação botânica e produção da exsicata (Anexo A). A planta foi identificada pela botânica prof.^a Dr.^a Vanilde Citadini-Zanette e tombada com o número CRI 16035. Os exemplares coletados foram selecionados manualmente, separando-se folhas, flores e galhos, lavados em água corrente e secos por meio de estufa com circulação de ar à 47 °C por 3 dias. Os extratos da planta foram preparados na proporção 1:15 em etanol 70% por 7 dias, com agitação ocasional, separadamente. Posteriormente, foram filtrados e evaporados sob pressão reduzida (803, Fisatom, São Carlos, SP, Brasil) em temperatura abaixo de 50 °C. O extrato bruto restante foi liofilizado (K 105, Qualicien, São Gonçalo, RJ, Brasil) para remoção completa do solvente (Bonomini *et al.*, 2017).

3.1.2 Doseamento de Metabólitos Secundários por Espectroscopia UV/Vis

3.1.2.1 Determinação de Polifenóis Totais

A determinação do teor de polifenóis totais (PT) presentes nos extratos etanólicos das flores, folhas e galhos de *A. cathartica* foi realizado pelo método de Folin–Ciocalteu com modificações (Umdale *et al.*, 2021). Os extratos etanólicos foram diluídos em etanol 70 % na concentração de 1 mg/mL. Uma alíquota de 400 µL desta solução foi agitada com 2 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e 1,6 mL de Na₂CO₃ (7,5 %). As amostras foram colocadas em local escuro e encubadas em temperatura ambiente por 60 min. A absorbância das amostras foi medida a 765 nm (V-M5, Bel Engineering, Piracicaba, SP, Brasil), utilizando-se como “branco” etanol 70 % e todos os reagentes, exceto o extrato. A curva padrão foi construída utilizando-se ácido gálico como substância de referência nas concentrações de 0,02 a 0,5 µg/mL, diluídos em etanol 70 %. O teor de PT foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra a curva de calibração construída com padrões de ácido gálico ($R^2 > 0,99$) e expressos como

miligramas EAG (equivalentes de ácido gálico) por grama de extrato seco liofilizado (mg EAG/g \pm desvio padrão).

3.1.2.2 Determinação de Flavonoides Totais

A determinação do teor de flavonoides totais (FT) foi realizada pelo método colorimétrico de cloreto de alumínio, com adaptações (Chang *et al.*, 2002). Amostras de cada extrato foram preparadas na concentração de 5 mg/mL em etanol 70 %. Quinhentos μ L dos extratos foram adicionados a 100 μ L de cloreto de alumínio 10 % e agitados. Após 5 min, 100 μ L de acetado de potássio 1 M e 2,8 mL de água foram adicionados e agitados. As amostras foram colocadas em local escuro e após 15 min, as absorvâncias foram medidas em 415 nm (V-M5, Bel Engineering, Piracicaba, SP, Brasil), utilizando-se como “branco”, etanol e água. A curva padrão foi construída utilizando-se quercetina como substância de referência nas concentrações de 3,1 a 200 μ g/mL, diluída em etanol 70 %. O teor de FT foi determinado por interpolação da absorvância das amostras contra uma curva de calibração ($R^2 > 0,99$) construída com padrões de quercetina e expressos como miligramas EQU (equivalentes de quercetina) por grama de extrato seco liofilizado (mg EQU/g \pm desvio padrão).

3.1.2.3 Determinação de Taninos Totais

A determinação do teor de taninos totais (TT) presentes nos extratos etanólicos das flores, folhas e galhos de *A. cathartica* foi realizado pelo método de Folin–Ciocalteu com modificações (Corrêa *et al.*, 2023). Os extratos foram diluídos com etanol 70 % na concentração de 0,5 mg/mL. Uma alíquota de 1 mL dessa solução foi retirada e adicionada à 1 mL do reagente de Folin-Dennis. A solução foi agitada mecanicamente e deixada em repouso por 3 min. Em seguida, foram adicionados 1 mL de uma solução de Na_2CO_3 8 % e a mistura foi deixada em repouso por 2 h após agitação, protegida da luz. Após esse tempo, a absorvância foi medida a 725 nm (V-M5, Bel Engineering, Piracicaba, SP, Brasil). A curva padrão foi construída utilizando-se ácido tânico como substância de referência nas concentrações de 31,25 a 2000 μ g/mL. O teor de TT foi determinado por interpolação da absorvância das amostras contra a curva de calibração construída com padrões de ácido tânico ($R^2 > 0,99$) e expressos como miligramas EAT (equivalentes de ácido tânico) por grama de extrato seco liofilizado (mg EAT/g \pm desvio padrão).

3.1.2.4 Determinação de Alcaloides Totais

A determinação do teor de alcaloides totais (AT) presentes nas flores, folhas e galhos de *A. cathartica* foi determinada pelo método colorimétrico de verde de bromocresol com adaptações (Cabral, 2021; Shamsa *et al.*, 2008). Os extratos foram diluídos em água destilada na concentração de 10 mg/mL. Três mL dos extratos foram adicionados a 5 mL de tampão fosfato pH 4,7 (17,9 g de fosfato dissódico (Na₂HPO₄) em 250 mL de água + 11,490 de ácido cítrico monohidratado em 250 mL de água destilada) e 5 mL de verde de bromocresol (0,0689 g de verde de bromocresol + 3 mL de NaOH 2 M + 5 mL de água destilada. Diluir a solução 2:250 v/v) e agitados. A mistura foi extraída com clorofórmio (2 x 5 mL) e avolumada para 10 mL. Em seguida, a mistura foi lida a 417 nm (V-M5, Bel Engineering, Piracicaba, SP, Brasil), contra um branco, preparado da mesma maneira, sem os extratos. A curva padrão foi construída utilizando-se nicotina como substância de referência nas concentrações de 20-120 µg (alíquotas de 200 a 1200 µL de uma solução mãe 100 µg/mL), preparados da mesma forma como descrito anteriormente. O teor de AT foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra a curva de calibração ($R^2 > 0,99$) construída com padrões de nicotina e expressos como miligramas ENIC (equivalentes de nicotina) por grama de extrato seco liofilizado (mg ENIC/g \pm desvio padrão).

3.1.2.5 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata. As médias de cada extrato foram submetidas a análise de variância (ANOVA) e comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade, utilizando o *software Statistica 7.0*.

3.1.3 Caracterização Fitoquímica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/UV)

A análise dos compostos fitoquímicos (ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, apigenina, kaempferol, pinocebrina, quercetina 3- β -glicosídeo e rutina) (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, USA), foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Shimadzu LC-20AT Prominence HPLC Liquid Chromatograph) acoplado a um detector UV-Vis. A composição da fase móvel utilizada foi ácido fórmico 4 % em água ultrapurificada Milli-Q (fase A) e acetonitrila (fase B). O gradiente utilizado foi: 0–3 min, 0 % B; 3–9 min, 3 % B; 9–24 min,

12 % B; 24–30 min, 20 % B; 30–33 min, 20 % B; 33–43 min, 30 % B; 43–63 min, 50 % B; 63–66 min, 50 % B; 66–76 min, 60 % B; 76–81 min, 60 % B; 81–90 min, 0% B. O fluxo de bombeamento da fase móvel foi de 0,5 mL/min e o volume de injeção de 5 µL (Smeriglio *et al.*, 2018). O sistema foi mantido a 25 °C e a detecção dos compostos foi realizada conforme pico máximo de absorção de cada padrão, sendo 268 nm para rutina; 292 nm para ácido cafeico, apigenina e pinocembrina; 330 nm para ácido *p*-cumárico e 370 nm para kaempferol e quercetina. A coluna utilizada foi a Luna Omega PS C18® (25 cm x 4.6 mm 5 µm; Phenomenex®, USA). A curva-padrão foi construída a partir de diferentes concentrações dos padrões entre 20 e 240 µg/mL solubilizados em metanol ou acetonitrila. O limite de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foi determinado pelo ruído (Noise (ASTM)/ Calculate on processing time of each compound). Os extratos foram avaliados em triplicata na concentração de 20 mg/mL. A concentração de cada composto nas amostras foi calculada pela equação de regressão correspondente e os resultados transferidos para o programa *Microsoft Excel* 2013. Os resultados finais foram apresentados sob forma de média ± desvio padrão, e expressos como mg de composto presentes em um grama de extrato seco liofilizado. As médias de cada extrato foram submetidas a análise de variância (ANOVA) e comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade, utilizando o *software Statistica* 7.0.

3.1.4 Caracterização Fitoquímica por Cromatografia Gasosa acoplada (GC/MS)

As análises dos extratos por GC/MS foram realizadas em um equipamento Agilent GC (7890A, Agilent, Santa Clara, CA, EUA) acoplado a um detector MS (5975C MS, Agilent, Santa Clara, CA, EUA). A coluna capilar (HP-5MS, Agilent, Santa Clara, CA, EUA) de sílica fundida (30 m de comprimento × 250 µm de diâmetro interno × 0,25 µm de espessura do filme, composta de 5 % de fenilmetilpolisiloxano) foi conectada a um detector quadrupolo operando em modo ESI (Eletrospray) a 70 eV. Hélio foi adotado como gás carreador a uma vazão de 0,8 mL/min. O injetor e a interface (G6502B, Agilent, Santa Clara, CA, EUA) ambos com temperatura de 240 °C, com uma razão de split de 10:1. O volume de amostra injetado foi de 1 µL. O programa de temperatura do forno consistiu em mantê-la em 80 °C por 1 min, aumentá-la em uma taxa de 10 °C/min até atingir 190 °C, em seguida reduzir a taxa de aquecimento para 5 °C/min até atingir 300 °C e mantê-la por 15 min. A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos espectros de massa com uma biblioteca de dados espectrais NIST (*Standard Reference Data Series of the National Institute of Standard and Technology – Mass*

Spectral Library). Cada amostra foi analisada em seu solvente de extração (Tramontin *et al.*, 2019).

3.1.5 Avaliação da Capacidade Antioxidante Total

3.1.5.1 Atividade de eliminação de radicais livres DPPH

A atividade antioxidante dos extratos das flores, folhas e galhos de *A. cathartica* foi avaliada pela atividade eliminadora do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) (Boroski *et al.*, 2015). Uma alíquota de 25 µL de extrato na concentração de 10 g/L foi misturada com 2 mL de DPPH 0,00091 mol/L em solução de EtOH 70 %. A mistura foi mantida em temperatura ambiente (25 °C) por 30 min e sua absorbância foi medida em espectrofotômetro (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices, Califórnia, USA) no comprimento de onda de 517 nm. A curva padrão foi construída utilizando-se Trolox como substância antioxidante de referência nas concentrações de 50-1500 µmol/L em 517 nm. A capacidade antioxidante total (TAC) foi determinada por interpolação da absorbância das amostras contra a curva de calibração construída com padrões de Trolox ($R^2 > 0,99$) e expressos como µmol equivalentes de Trolox por grama de extrato seco liofilizado (µmol ET/g ± desvio padrão).

3.1.5.2 Método de captura do radical livre ABTS⁺

A atividade antioxidante dos extratos das flores, folhas e galhos de *A. cathartica* foi avaliada pela inibição do radical 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico (ABTS⁺) (Kuskoski *et al.*, 2005). Preparou-se uma solução aquosa estoque de 7 µM de ABTS e adicionou-se a 5 mL desta solução estoque, 88 µL de solução aquosa de persulfato de potássio (140 µM), formando o radical ABTS⁺. Esta solução foi armazenada ao abrigo da luz, em temperatura ambiente (25 °C). Após 16 h, uma alíquota do radical foi diluída em EtOH até obter $0,70 \pm 0,05$ de absorbância a 734 nm (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices, Califórnia, USA).

A curva padrão foi construída com Trolox nas concentrações de 0 a 2000 µM ($R^2 > 0,99$). Trinta µL de cada diluição foi adicionada à 3 mL do radical ABTS⁺. Após 6 min em ambiente escuro, as amostras foram lidas a 734 nm em espectrofotômetro (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices, Califórnia, USA). A partir da equação da reta produzida, calculou-se a absorbância correspondente a 1000 µM ($Y_{1000} = -a1000 + b$).

Uma curva de atividade antioxidantes dos extratos também foi preparada nas concentrações de 200 – 1000 µg/mL ($R^2 > 0,99$). Trinta µL de cada diluição foi adicionada à 3 mL do radical ABTS⁺. Após 6 min em ambiente escuro, as amostras foram lidas a 734 nm em espectrofotômetro (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices, Califórnia, USA). As concentrações e absorbâncias foram utilizadas para obter-se a equação da reta. Para calcular a atividade antioxidante, substitui-se na equação da reta a absorbância equivalente a 1000 µM da curva padrão, obtendo-se o valor da diluição dos extratos em mg/L equivalentes a 1000 µM de Trolox. O resultado foi dividido por 1000 para obter-se o valor em gramas. O resultado final foi calculado pela divisão do 1000 µM pelo valor em g/L para encontrar o valor final expresso em µM equivalente de Trolox por grama de extrato seco liofilizado (µM ET/g ± desvio padrão).

3.1.5.3 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata. As médias de cada extrato foram submetidas a análise de variância (ANOVA) e comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade, utilizando o *software Statistica 7.0*.

3.1.6 Avaliação da Atividade Citotóxica

3.1.6.1 Cultura de células

As células utilizadas neste trabalho foram: HeLa (adenocarcinoma cervical humano), SiHa (adenocarcinoma cervical humano – HPV-16), MCF-7 (Carcinoma de mama), obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC - Rockville, MD, EUA) e linhagens celulares Vero (célula renal de macaco verde africano) e K-562 (leucemia mieloide crônica), obtidas no Banco de Celulares do Rio de Janeiro. As linhagens celulares foram mantidas em meio de cultura suplementado com 10 % (v/v) de soro fetal bovino (Gibco, Grand Island, NY, EUA), a 37 °C e em atmosfera umidificada (5 % CO₂). As linhagens celulares de SiHa e HeLa foram cultivadas em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium – Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) de baixa glicose, linhagem celular K-562 e MCF-7 em RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) e células Vero em DMEM de alto teor de glicose (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA).

3.1.6.2 Determinação da Viabilidade Celular

O efeito citotóxico dos extratos nas linhagens celulares (MCF-7, HeLa, SiHa e Vero) foi realizado utilizando o ensaio MTT. Cada linha celular foi semeada em placas de 96 poços (5 x 10³ células por poço) e incubadas a 37 °C e 5 % de CO₂. Após atingir a semiconfluência, as células foram tratadas com as concentrações dos extratos variando de 0,1 a 200 µg/mL e as células Vero de 0,1 a 1000 µg/mL. Após 48 h, o meio contendo o tratamento foi retirado e as células foram incubadas com solução de MTT (0,5 mg/mL) por 3 h a 37 °C, na ausência de luz. Os cristais de formazan formados foram dissolvidos em DMSO e quantificados por absorbância em 570 e 630 nm, medidos em um espectrofotômetro de placa (Spectramax M2e, SoftMax Pro Software Interface 5.4.1, EUA). Curvas dose-resposta foram construídas e os valores de IC₅₀ foram determinados pelo *software Graphpad Prism* (versão 8.0) (García *et al.*, 2003).

3.1.6.3 Contagem de células

A linhagem celular K-562 foi semeada em microplaca de 96 poços (8 x 10³/poço) e incubada a 37 °C em CO₂ a 5 % durante 24 h. Posteriormente, as células foram tratadas com extratos de 0,1 a 200 µg/mL por mais 48 h. A contagem celular foi realizada em um citômetro FACSVerse equipado com laser azul de 488 nm e sensor de fluxo (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). Curvas dose-resposta foram construídas e os valores de IC₅₀ foram determinados pelo *software Graphpad Prism* (versão 8.0) (Yurttas *et al.*, 2022).

3.1.6.4 Análise do Índice de Seletividade

Células Vero foram tratadas para avaliar o índice de seletividade (IS), a fim de avaliar o quão seletivo o composto é para matar/danificar células cancerígenas em vez de células normais. O grau de seletividade dos extratos foram expresso para cada linhagem celular tumoral, conforme equação $IS = CC_{50}/IC_{50}$ (Quispe *et al.*, 2006).

3.1.6.5 Análise estatística

As médias de cada extrato foram submetidas a análise de variância (ANOVA) e comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade utilizando o *software Statistica 7.0*.

3.1.7 Ensaio de Toxicidade Aguda para Microcrustáceo de Água Doce (*Daphnia magna*) (Ecotoxicidade).

O teste de toxicidade aguda foi realizado de acordo com a norma ABNT NBR 12713 (2016), expondo neonatos de *Daphnia magna* às substâncias teste por um intervalo de tempo (48 h). Os testes foram realizados em duplicata, com 10 espécies em cada recipiente, expondo 20 organismos de teste por diluição à temperatura de 18-22 °C, sem alimentação, no escuro e sem mudança de meio. Organismos recém-nascidos (2–26 h) foram expostos a diferentes concentrações dos extratos (500, 1000 e 1500 mg/L) por 48 h. Como controle negativo foi utilizado apenas o meio. Após o intervalo de 48 h, indivíduos de *D. magna* imobilizados e/ou mortos foram contados para cada diluição. Os resultados foram expressos como tóxicos, quando houve diferença significativa entre as amostras e controle, e não tóxico quando não houve diferença significativa entre as amostras e controle (ABNT, 2016).

3.1.8 Avaliação da Atividade Antifúngica *in vitro*

Os extratos foram avaliados quanto à capacidade de inibição *in vitro* do crescimento radial do micélio de dois isolados da espécie *Botrytis cinerea*, um (COAD 2800) obtido a partir de plantas de *Arachis hipogaea* (amendoim) e outro (COAD 3389) de *Acca sellowiana* (goiabeira-serrana) naturalmente infectadas. Os fungos foram cultivados em placas de Petri utilizando meio de cultura ágar batata dextrose (BDA). Discos de micélio (6 mm de diâmetro) foram retirados das margens de colônias em crescimento ativo e transferidos asepticamente para o centro de outras placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura. A seguir, 20 µL de soluções de cada extrato a 10 mg/mL, preparadas em solução de acetona-água 1:4 (v/v), foram depositados sobre o disco de micélio. As placas foram acondicionadas em câmara climática a 25 °C sob fotoperíodo de 12 h. Solução de acetona-água 1:4 (v/v) e o fungicida comercial Captan SC (captana p.a. 48.0%; ADAMA®) foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente (Cimmino *et al.*, 2018). Os experimentos foram realizados em quatro repetições. Para cada repetição, o diâmetro de crescimento micelial foi obtido como a média das medidas horizontal, vertical e diagonal do micélio. As médias de cada tratamento foram submetidas a análise de variância (ANOVA) e comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade utilizando o *software Statistica 7.0*.

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.1 Produção dos Extratos

Os extratos etanólicos liofilizados das flores, folhas e galhos de *A. cathartica*, renderam respectivamente 36 %, 19 % e 14 %. Em outro estudo, realizado em condições semelhantes de extração, o rendimento para o extrato etanólico liofilizado das folhas foi de 18 %, e das flores 25%, resultados semelhantes encontrados nesta pesquisa. A planta também foi coletada na época de floração (verão), no sul do Brasil (Paraná) (Almeida, 2016).

3.2.2 Doseamento de Metabólitos Secundários por Espectroscopia UV/Vis

Realizou-se o doseamento de quatro classes de metabólitos secundários: alcaloides, flavonoides, polifenóis e taninos totais, nos três diferentes extratos de *A. cathartica*. Os resultados encontrados estão demonstrados na Tabela 5.

Em relação a concentração de alcaloides totais, as três partes da planta diferiram significativamente nos resultados, sendo que as folhas apresentaram maior concentração, seguido das flores e galhos. É interessante destacar que os únicos alcaloides já identificados em *A. cathartica* foram encontrados nos seus galhos (Prabhadevi *et al.*, 2012), onde neste trabalho encontrou-se a menor concentração de alcaloides totais, sendo possível que em suas folhas e flores ainda há alcaloides que não foram identificados e elucidados, visto os resultados encontrados e abundância de alcaloides na família Apocynaceae (Chan; Wong; Chan, 2016).

Tabela 5 - Doseamento de Metabólitos secundários por UV/Vis.

Classe fitoquímica	Flores	Folhas	Galhos
Alcaloides totais (mg ENIC/g ± dp)	3,352 ± 0,10 ^b	4,112 ± 0,05 ^a	2,086 ± 0,05 ^c
Flavonoides totais (mg EQU/g ± dp)	14,756 ± 0,14 ^b	29,537 ± 3,10 ^a	5,318 ± 0,31 ^c
Polifenóis totais (mg EAG/g ± dp)	16,149 ± 0,58 ^b	34,839 ± 0,70 ^a	13,635 ± 0,40 ^c
Taninos totais (mg EAT/g ± dp)	0,360 ± 0,03 ^b	0,955 ± 0,02 ^a	0,319 ± 0,02 ^b

Fonte: Autora, 2023. ENIC: equivalentes de nicotina; EQU: equivalentes de quercetina; EAG: equivalentes de ácido gálico; EAT: equivalentes de ácido tânico. dp: desvio padrão. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas na mesma linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Das três partes da planta utilizadas para preparação dos extratos, as folhas foram as partes que apresentaram maior teor de flavonoides totais, seguido das flores e galhos, em concentrações estatisticamente diferentes. Corroborando com estes resultados, o doseamento de polifenóis totais também se mostrou maior nas folhas, seguidos das flores e galhos, e em valores maiores que dos flavonoides totais, visto que o método de Folin-Ciocalteu utilizado mede todas as hidroxilas fenólicas livres e, por isso, identifica todos os compostos fenólicos, inclusive flavonoides e taninos (Simões *et al.*, 2017). Os taninos também estão presentes na espécie; no entanto, em concentrações menores, mas seguindo a mesma ordem de concentração nas diferentes partes da planta, folhas, flores e galhos, contudo não havendo diferença significativa entre flores e galhos.

Uma vez que na literatura encontram-se trabalhos que analisaram estas classes fitoquímicas em *A. cathartica* mas com metodologia e padrões diferentes, os resultados encontrados na literatura serão discutidos apenas qualitativamente.

O trabalho de Rodrigues *et al.* (2020), avaliou os extratos hidroetanólicos das flores de *A. cathartica* colhidas em diferentes regiões de Santa Catarina. Por se tratar de locais diferentes de coleta, houve variação no conteúdo de flavonoides totais entre $7,14 \pm 0,19$ a $17,83 \pm 0,96$ mg equivalentes de rutina por grama de extrato. Outro trabalho avaliou o conteúdo de polifenóis totais no extrato metanólico de diferentes partes da planta extraídas juntas. O conteúdo de polifenóis obtido foi de 4,16 mg equivalentes de ácido gálico por grama de matéria úmida (Hameed; Nawaz; Gulzar, 2014). O conteúdo de polifenóis totais também foi avaliado nas frações solúveis em água e solúveis em gordura de extratos das flores. Os resultados encontrados foram de $3,51 \pm 0,09$ e $0,65 \pm 0,02$ mg equivalente de ácido gálico por grama de matéria fresca (Li *et al.*, 2014).

3.2.3 Caracterização Fitoquímica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/UV)

Para a caracterização fitoquímica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, foram utilizados sete padrões comerciais para identificação e quantificação na espécie *A. cathartica*. Os dados referentes aos padrões estão demonstrados na Tabela 6. Para todos os padrões, a curva padrão construída apresentou coeficientes de determinação ($R^2 \geq 0,99$) e limites de detecção e quantificação satisfatórios.

Dos sete compostos analisados, de uma forma geral, os três compostos com maior concentração na espécie foram o Kaempferol, Quercetina 3- β -glicosídeo e Rutina. O

Kaempferol foi identificado e quantificado nas folhas e galhos, sendo que o galho possui uma concentração significativamente maior que as folhas. O Kaempferol não foi identificado nas flores. A quercetina 3- β -Glicosídeo e a rutina foram identificadas nas três partes da planta. A maior concentração de quercetina 3- β -Glicosídeo foi encontrada nas flores, seguido das folhas e galhos, em concentrações significativamente diferentes. A rutina foi encontrada em maior concentração nas folhas, seguido das flores e galhos, em concentrações significativamente diferentes.

Tabela 6 - Dados experimentais dos padrões comerciais.

Composto	Tempo de retenção (min)	R² curva	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
Ácido Cafeico	29,125	0,999	0,078	0,236
Ácido <i>p</i> -Cumárico	38,218	0,999	0,0005	0,001
Apigenina	57,135	0,994	0,081	0,246
Kaempferol	57,302	0,999	0,031	0,092
Pinocebrina	62,298	0,999	0,172	0,521
Quercetina 3- β -Glicosídeo	43,487	0,998	0,196	0,594
Rutina	42,593	0,997	0,167	0,505

Fonte: Autora, 2023.

O kaempferol nos galhos (Yamauchi; Mitsunaga; Batubara, 2011), a quercetina nas flores (Sukumar, 2013) e a rutina nas flores (Bonomini *et al.*, 2017; Rodrigues *et al.*, 2020) já foram identificados na espécie anteriormente. A rutina, segundo composto em maior concentração das flores, foi quantificada na fração de acetado de etila do extrato etanólico das flores de *A. cathartica* por Bononimi *et al.* (2015), que encontram 103 mg de rutina/g de extrato seco. Rodrigues *et al.*, (2020) avaliaram a concentração de rutina em diferentes amostras de flores de *A. cathartica*, coletadas em diferentes regiões de Santa Catarina. Os autores encontraram concentrações entre 2,7 e 9,5 mg/g de extrato. Esses resultados foram semelhantes ao encontrados nesse estudo, enquanto os resultados demonstrados por Bonomini *et al.* (2017) foram superiores.

Os ácidos hidroxicinâmicos, ácido cafeico e ácido *p*-cumárico foram identificados e quantificados em todas as partes da planta analisadas. Estes mesmos compostos já foram identificados no extrato etanólico das flores e folhas de *A. cathartica* (Coelho *et al.*, 2016). Já nos galhos, até onde sabemos, não há registro de identificação e quantificação de ácido cafeico e *p*-cumárico na espécie.

Em menor quantidade, foi identificado nas três partes da planta os compostos apigenina, sem diferença de concentração nas diferentes partes, e pinocembrina, em menor concentração nos galhos, comparado as flores e folhas. Para esses dois compostos também não há registros na literatura da presença na espécie. O mesmo vale para outros compostos. Aqui relatamos pela primeira vez a presença de e quercetina 3- β -glicosídeo nas folhas e galhos; kaempferol nas folhas; e rutina nas folhas e galhos de *A. cathartica*. Os resultados da quantificação destes compostos estão demonstrados na Tabela 7.

Tabela 7 - Quantificação Fitoquímica por CLAE/UV dos extratos.

Compostos fitoquímicos	Classe fitoquímica	Flores	Folhas	Galhos
Ácido cafeico (mg/g \pm dp)	Ácido hidroxicinâmico	0,429 \pm 0,004 ^a	0,411 \pm 0,001 ^a	0,348 \pm 0,0007 ^b
Ácido <i>p</i> -cumárico (mg/g \pm dp)	Ácido hidroxicinâmico	0,148 \pm 0,001 ^a	0,145 \pm 0,009 ^a	0,168 \pm 0,01 ^a
Apigenina (mg/g \pm dp)	Flavona	0,473 \pm 0,001 ^a	0,471 \pm 0,007 ^a	0,475 \pm 0,002 ^a
Kaempferol (mg/g \pm dp)	Flavonol	ND	2,661 \pm 0,157 ^a	3,357 \pm 0,22 ^b
Pinocembrina (mg/g \pm dp)	Flavonona	0,054 \pm 0,0001 ^a	0,055 \pm 0,002 ^a	0,050 \pm 0,0014 ^b
Quercetina 3- β -glicosídeo (mg/g \pm dp)	Flavonol	9,548 \pm 0,53 ^a	8,630 \pm 0,06 ^b	0,573 \pm 0,008 ^c
Rutina (mg/g \pm dp)	Flavonol	4,327 \pm 0,16 ^a	5,888 \pm 0,13 ^b	1,302 \pm 0,04 ^c

Fonte: Autora, 2023. ND: não detectado. dp: desvio padrão. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas na mesma linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

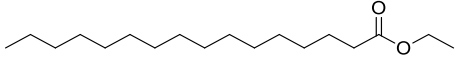
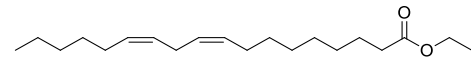
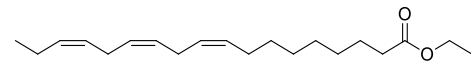
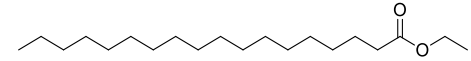
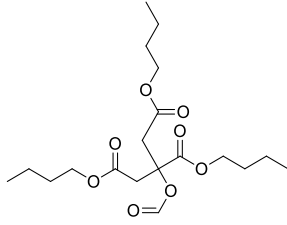
3.2.4 Caracterização Fitoquímica por Cromatografia Gasosa acoplada a espectroscopia de massas (GC/MS)

Analisou-se o perfil fitoquímico de cada extrato utilizando GC/MS para determinação dos compostos extraídos juntamente com a porcentagem de área relativa ao cromatograma total. Avaliou-se também o seu peso molecular e a classe à qual pertence cada um dos compostos identificados.

Nas flores, a maioria dos compostos encontrados tratam-se de ésteres de ácido graxo ou ésteres etílicos de ácido graxo de cadeia longa e elevado peso molecular. Destes, o ácido 9,12,15-octadecatrienóico, éster etílico, (*Z,Z,Z*)- foi o composto com maior área relativa

em relação ao cromatograma total (4,66 %). Outro composto com maior área relativa encontrada foi acetilcitrato de tributila (6,43 %), um composto orgânico oxigenado. Não são encontrados na literatura outros trabalhos que identificaram estes compostos nos extratos das flores de *A. cathartica* por CG/MS, devido à escassez de trabalhos fitoquímicos realizados com a espécie. Todos os compostos identificados por CG/MS nas flores estão demonstrados na Tabela 8.

Tabela 8 - Caracterização Fitoquímica por CG/MS do extrato das Flores.

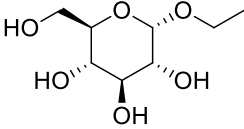
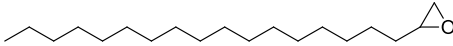
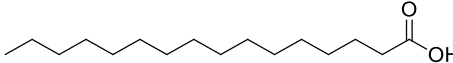
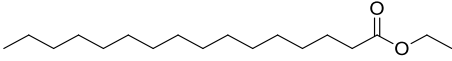
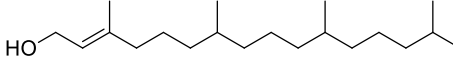
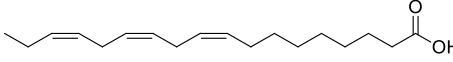
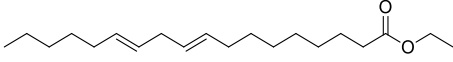
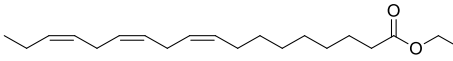
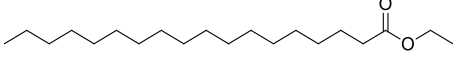
Composto/ Classe	Molécula	PM (g/mol)	Flores	
			TR (min)	Área relativa (%)
Ácido hexadecanóico, éster etílico Éster de ácido graxo		[19] 284,48	17,500	3,03
Éster etílico do ácido linoléico Éster etílico de ácido graxo		[20] 308,50	20,076	1,39
Ácido 9,12,15-octadecatrienóico, éster etílico, (Z,Z,Z)- Éster etílico de ácido graxo		[21] 306,48	20,189	4,66
Ácido octadecanóico, éster etílico Éster etílico de ácido graxo		[22] 312,53	20,528	0,91
Acetilcitrato de tributila Composto orgânico oxigenado		[23] 402,23	21,629	6,43

Fonte: Autora, 2023. PM: peso molecular. TR: tempo de retenção.

Nas folhas, encontrou-se um número maior de compostos. A classe mais representativa também foram os ácidos graxos e os ésteres de ácido graxo de cadeia longa. Assim como nas flores, o ácido 9,12,15-octadecatrienóico, éster etílico, (Z,Z,Z)- foi o composto com maior área relativa em relação ao cromatograma total (12,04 %). Outros compostos também foram identificados nas folhas, sendo os mais representativos com maior área relativa

o diterpeno fitol (11,93 %) e o composto *O*-glicosil, Etil.alfa-*D*-glucopiranosídeo (7,86 %). Todos os compostos encontrados nas folhas estão demonstrados na Tabela 9.

Tabela 9 - Caracterização Fitoquímica por CG/MS do extrato das Folhas.

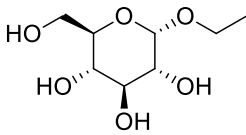
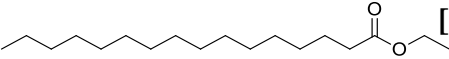
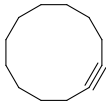
Composto/ Classe	Molécula	PM (g/mol)	Folhas	
			TR (min)	Área relativa (%)
Etil.alfa- <i>D</i> -glucopiranosídeo Compostos <i>O</i> -glicosil		[24] 208,21	12,716	7,86
Oxirano, heptadecil- Epóxido		[25] 282,50	15,282	1,30
Ácido <i>n</i> -hexadecanóico Ácido graxo		[26] 256,42	17,024	1,30
Ácido hexadecanóico, éster etílico Éster de ácido graxo		[19] 284,48	17,486	5,08
Fitol Diterpeno		[27] 296,53	19,313	11,93
Ácido 9,12,15- octadecatrienóico, (<i>Z,Z,Z</i>)- Ácido linolênico/ácido graxo ômega-3 poliinsaturado		[28] 278,43	19,784	3,04
Ácido 9,12- octadecadienóico, éster etílico Éster de ácido graxo		[29] 308,50	20,062	2,81
Ácido 9,12,15- octadecatrienóico, éster etílico, (<i>Z,Z,Z</i>)- Éster etílico de ácido graxo		[21] 306,48	20,179	12,04
Ácido octadecanóico, éster etílico Éster etílico de ácido graxo		[22] 312,53	20,518	1,49

Fonte: Autora, 2023. PM: peso molecular. TR: tempo de retenção.

Os extratos etanólicos das folhas de *A. cathartica* já foram avaliadas anteriormente por CG/MS. Dos nove compostos identificados neste estudo, sete já foram relatados: ácido hexadecanóico, éster etílico (3,4 %); ácido 9,12,15-octadecatrienóico, éster etílico, (Z,Z,Z)- (10,58 %); ácido octadecanóico, éster etílico (1,65 %); ácido *n*-hexadecanóico (14,08 %); fitol (5,66 %); ácido 9,12,15-octadecatrienóico, (Z,Z,Z)- (16,39 %); ácido 9,12-octadecadienóico, éster etílico (2,62 %) (Prabhadevi *et al.*, 2012). As áreas relativas encontradas por Prabhadevi *et al* (2012), são similares a deste estudo para alguns compostos. Para os compostos ácido *n*-hexadecanóico e ácido 9,12,15-octadecatrienóico, (Z,Z,Z), neste trabalho, encontrou-se uma área relativa menor e para o fitol, uma área relativa maior. Essas diferenças ocorrem devido ao ambiente onde a planta é cultivada e todos os processos relacionados às inter-relações do indivíduo com o seu meio ambiente (Simões *et al.*, 2017). Enquanto neste trabalho a planta foi coletada no Brasil, no trabalho de Prabhadevi *et al*, a planta foi coletada na Índia. Também foram identificados dois novos compostos neste trabalho, Etil.alfa-*D*-glucopiranosídeo, com área relativa de 7,86 % e Oxirano, heptadecil- com 1,30 % de área relativa.

Nos galhos encontrou-se um número menor de compostos. Apenas três moléculas de classes diferentes, representadas na Tabela 10, foram identificadas por CG/MS nos extratos etanólicos. O composto mais representativo foi Etil alfa-*D*-glucopiranosídeo com área relativa de 18,95 %. Também foram identificados o ácido hexadecanóico, éster etílico e a Ciclododecina. Destes três compostos, apenas o ácido hexadecanóico, éster etílico já foi relatado na literatura nos galhos de *A. cathartica*, com área relativa de 1,57 % (Prabhadevi *et al.*, 2012), próximo ao valor encontrado neste trabalho.

Tabela 10 - Caracterização Fitoquímica por CG/MS do extrato dos Galhos.

Composto/ Classe	Molécula	PM (g/mol)	Galhos	
			TR (min)	Área relativa (%)
Etil.alfa- <i>D</i> - glucopiranosídeo Compostos <i>O</i>-glicosil		[24] 208,21	12,749	18,95
Ácido hexadecanóico, éster etílico Éster etílico de ácido graxo		[19] 284,48	17,538	1,71
Ciclododecina Cicloalcino		[30] 164,29	20,207	3,84

Fonte: Autora, 2023. PM: peso molecular. TR: tempo de retenção.

3.2.5 Avaliação da Capacidade Antioxidante Total

A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada pelos métodos de eliminação dos radicais (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), ABTS; e 2,2-difenil-1-(2,4,6-trinitrofenil) hidrazila, DPPH (Mareček *et al.*, 2017). A maioria dos antioxidantes naturais ocorre em misturas complexas. Os componentes da mistura podem reagir de forma diferente com os radicais individuais e/ou influenciar-se sinergicamente ou antagonicamente. Para os materiais vegetais, as propriedades antioxidantes são caracterizadas pela “Capacidade Antioxidante Total” (TAC), que expressa a quantidade de radicais livres que podem ser eliminados pelos antioxidantes presentes na amostra. A TAC é expressa como capacidade antioxidante equivalentes de Trolox (derivado sintético da vitamina E) (Mareček *et al.*, 2017). Especificamente, o ensaio ABTS é baseado na geração de um radical ABTS⁺ azul/verde que pode ser reduzido por antioxidantes; enquanto o ensaio DPPH é baseado na redução do DPPH roxo que recebe um átomo de hidrogênio e da origem a forma reduzida 1,1-difenil-2-picril hidrazina, com perda da cor violeta (Chedea; Pop, 2019; Floegel *et al.*, 2011). A TAC dos extratos avaliados pelos dois métodos está demonstrada na Tabela 11.

Tabela 11 – Capacidade antioxidante total dos diferentes extratos de *A. cathartica*.

Ensaio Antioxidante	Flores	Folhas	Galhos
ABTS ($\mu\text{M ET/g} \pm \text{dp}$)	170,282 \pm 1,52 ^b	247,652 \pm 4,21 ^a	152,801 \pm 13,97 ^b
DPPH ($\mu\text{M ET/g} \pm \text{dp}$)	114,917 \pm 3,01 ^a	108,250 \pm 0,50 ^b	47,917 \pm 3,01 ^c

Fonte: Autora, 2023. ET: equivalentes de Trolox. dp: desvio padrão. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas na mesma linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Os resultados encontrados para os dois testes de capacidade antioxidante divergiram significativamente entre os extratos. No ensaio ABTS, as folhas foram a parte da planta que obteve maior capacidade antioxidante, seguida das flores, enquanto no ensaio DPPH houve uma inversão dos resultados, com maior capacidade antioxidante das flores, seguido das folhas. Isto pode ocorrer devido a multifuncionalidade dos antioxidantes naturais que podem contar com vários mecanismos de ação antioxidante diferentes (Li *et al.*, 2014). No entanto, estes resultados são condizentes, uma vez que os compostos fenólicos são considerados o principal grupo de compostos responsáveis pelas propriedades antioxidantes (Mareček *et al.*, 2017), e ambos os extratos possuem elevado concentração de polifenóis e flavonoides totais.

Os resultados obtidos em outros trabalhos serão discutidos qualitativamente, uma vez que a metodologia e os padrões descritos pela literatura foram diferentes daquelas utilizadas

no presente estudo. A soma da capacidade antioxidante pelo método ABTS⁺ de extratos lipofílicos das flores, extraídos com tetraidrofurano, e os hidrofílicos, extraídos com mistura metanol/ ácido acético/água de *A. cathartica*, foi de $8,80 \pm 0,47$ μmol equivalentes de Trolox por grama de matéria fresca (Li *et al.*, 2014). Quando os resultados são expressos em matéria seca liofilizada, como neste trabalho, os resultados tentem a apresentar um valor maior. Durante o processo de liofilização, dependendo das condições utilizadas, as paredes celulares da matriz vegetal podem ser quebradas, facilitando o acesso do solvente aos compostos presentes. Outra razão, pode ser a perda de água da matriz vegetal que concentra os compostos tornando-os mais disponíveis para extração pelo método (Tramontin, 2020). Outro trabalho que utilizou ácido ascórbico como substância antioxidante de referência no método ABTS⁺ e obteve a capacidade antioxidante de $1,54 \pm 0,27$ μmol equivalentes de ácido ascórbico/g extrato seco das folhas e $2,46 \pm 0,09$ μmol equivalentes de ácido ascórbico/g extrato seco das flores de *A. cathartica* (Hameed; Nawaz; Gulzar, 2014).

Dependendo da metodologia utilizada, a capacidade antioxidante avaliada pelo método DPPH pode ser expressa como IC₅₀, ou seja, a concentração de extrato necessária a inibir 50% do radical DDPH. A fração de tetracloreto de carbono de um extrato metanólico das folhas de *A. cathartica* apresentou IC₅₀ de $47,5 \pm 0,11$ $\mu\text{g/mL}$, que foi correlacionada com o alto teor de conteúdo fenólico do extrato, $59,31 \pm 0,47$ mg EAG/g de extrato (Sarker *et al.*, 2014).

3.2.6 Ensaio de Toxicidade Aguda para Microcrustáceo de Água Doce (*Daphnia magna*) (Ecotoxicidade)

Os testes de toxicidade com invertebrados aquáticos fornecem importante suporte na determinação de impactos químicos ao meio ambiente. O microcrustáceo de água doce *Daphnia magna* tem sido amplamente utilizado como indicador biológico em estudos e controle da qualidade da água e em testes de toxicidade na avaliação de efluentes (Laitano; Matias, 2006).

Os extratos de *A. cathartica* foram avaliados em *Daphnia magna* visando a análise da possível contaminação destes extratos até os efluentes. Os produtos utilizados como pesticidas podem entrar no meio ambiente através de emissões acidentais ou deliberadas durante o uso ou descarte (Grillo *et al.*, 2021). Há preocupações sobre as implicações negativas para a saúde humana e para a saúde ambiental, por exemplo, se os pesticidas voltarem a entrar na cadeia alimentar em água contaminada ou alimentos (Knight *et al.*, 2023).

Os extratos foram testados em concentração muito superiores a utilizadas em testes pesticidas e biológicos/citotóxicos. Encontramos que, nas concentrações de 500, 1000 e 1500 mg/L os extratos das flores e folhas são capazes de causar morte/imobilidade de 100% dos animais. Já nos galhos, a concentração de 500 mg/L, causou a morte/imobilidade de 40% dos animais testes, enquanto as concentrações de 1000 e 1500 mg/L, causou a morte/imobilidade de 100% dos animais. Os galhos podem ter apresentado menor toxicidade em comparação as flores e folhas por apresentarem diferentes compostos fitoquímicos ou por apresentarem menor concentração de compostos, como vistos na maioria dos testes fitoquímicos. Os resultados encontrados no teste de ecotoxicidade estão demonstrados na Tabela 12.

Tabela 12 - Toxicidade aguda dos extratos em *Daphnia magna*.

Concentração (mg/L)	Flores		Folhas		Galhos	
	Inibição/ morte	Toxicidade	Inibição/ morte	Toxicidade	Inibição/ morte	Toxicidade
500	100 %	Tóxico	100 %	Tóxico	40 %	Tóxico
1000	100 %	Tóxico	100 %	Tóxico	100 %	Tóxico
1500	100 %	Tóxico	100 %	Tóxico	100 %	Tóxico

Fonte: Autora, 2023.

Um estudo quantificou a contaminação por pesticidas e seu impacto ecológico a montante e a jusante de sete estações de tratamento de águas residuais em áreas rurais e suburbanas na bacia hidrográfica do rio Bode, na Alemanha. Trata-se de uma região onde as culturas mais importantes são os cereais (trigo, cevada, centeio) e a colza, sendo o potencial de contaminação por pesticidas através da agricultura pelo escoamento superficial no campo, classificado como risco baixo a médio. Mesmo com classificação de risco baixo a médio, no total, foram quantificados 45 pesticidas (19 herbicidas, 14 fungicidas, sete inseticidas e cinco metabólitos) em diversas misturas de até 26 compostos por amostra (Münze *et al.*, 2017).

Em amostras de água potável de poços da planície dos pampas (Argentina), foram detectados com maior frequência, os agrotóxicos atrazina, metolacoloro, imidacloprido, hidroxiatrazina, imazetapir e 2,4-D, variando em concentrações entre 1 a 14460 ng/L. No período de coleta das amostras, 25 % do solo foi plantado com culturas de inverno, enquanto pouco menos de 50 % foi destinado às culturas de verão, principalmente milho e soja (Aparicio; Gerónimo, 2024).

A ocorrência de pesticidas em águas residuais já foi relatada em muitos países ao redor do mundo em concentrações de ng/L (ppt) (Knight *et al.*, 2023), concentração 1 milhão de vezes menor do que testada neste trabalho, abrindo uma nova perspectiva para testes na escala de nanogramas, com possivelmente menor risco de toxicidade para a espécie. No entanto, a exposição humana a múltiplos pesticidas é uma preocupação científica crescente, uma vez que os efeitos toxicológicos combinados de dois ou mais componentes de uma mistura de pesticidas em doses baixas, podem ocorrer de forma independente ou com adição ou interação de efeitos. Em um futuro próximo, as regulamentações terão de reconhecer os efeitos adversos para a saúde das interações entre pesticidas, para fornecer uma abordagem abrangente para salvaguardar a saúde humana (Aparicio; Gerónimo, 2024; Hernández *et al.*, 2013).

Não só como produtos biopesticidas, os extratos de plantas e moléculas naturais tem servido como medicamentos, e a contaminação destes medicamentos em efluentes também é de importante conhecimento, visto que os medicamentos excretados pelos pacientes, mesmo após tratamento em instalações de processamento de águas, podem contaminar os rios (Toma *et al.*, 2014). A concentração destes produtos farmacêuticos em efluentes também são demonstradas em pesquisas em concentrações que normalmente variam de dezenas a centenas de ng/L (Vuckovic *et al.*, 2023). Já foi encontrado a presença de medicamentos e metabólitos de antineoplásicos nos de efluentes do Hospital do Câncer e nos afluentes e efluentes da estação de tratamento de esgoto municipal em Barretos/SP, Brasil, na ordem de grandeza de ng/L (Klein *et al.*, 2021). Nos efluentes das seis maiores estações de tratamento de águas residuais que descarregam na Baía de São Francisco/Califórnia, foram detectados o antiepiléptico carbamazepina, o anti-inflamatório diclofenaco e o betabloqueador metoprolol em todas as 12 amostras testadas. O betabloqueador propranolol e o antibacteriano trimetoprima foram detectados em 92 % e 67 % das amostras, respectivamente. As concentrações medianas de carbamazepina, diclofenaco e trimetoprima estiveram entre 170–255 ng/L, enquanto as concentrações medianas de propranolol e metoprolol foram mais baixas (47 ng/L) e mais altas (715 ng/L), respectivamente (Vuckovic *et al.*, 2023).

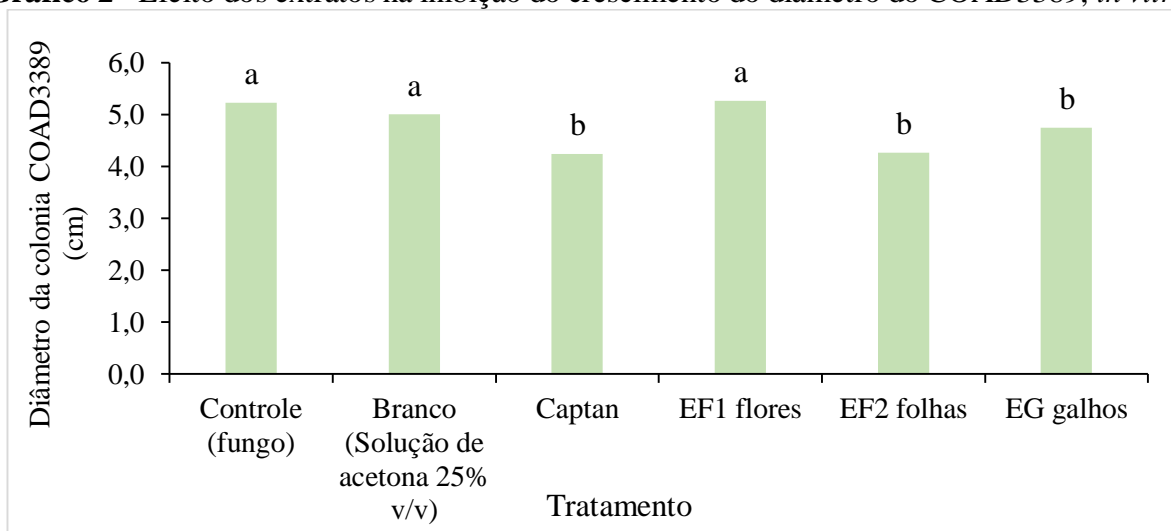
3.2.7 Avaliação da Atividade Antifúngica *in vitro*

Foram testados dois isolados de *Botrytis cinerea*, COAD 3389 e COAD 2800. O isolado COAD 3389 se mostrou resistente ao controle positivo (Captan), e os extratos produziram efeito estatisticamente diferente do efeito produzido pelo controle negativo, mas a porcentagem de inibição foi muito pequena. O extrato de folha inibiu o crescimento micelial

em 14,8 %, enquanto o extrato de galhos inibiu em apenas 5,2 %. O extrato de flores produziu efeito estatisticamente igual ao do controle negativo (Gráfico 2).

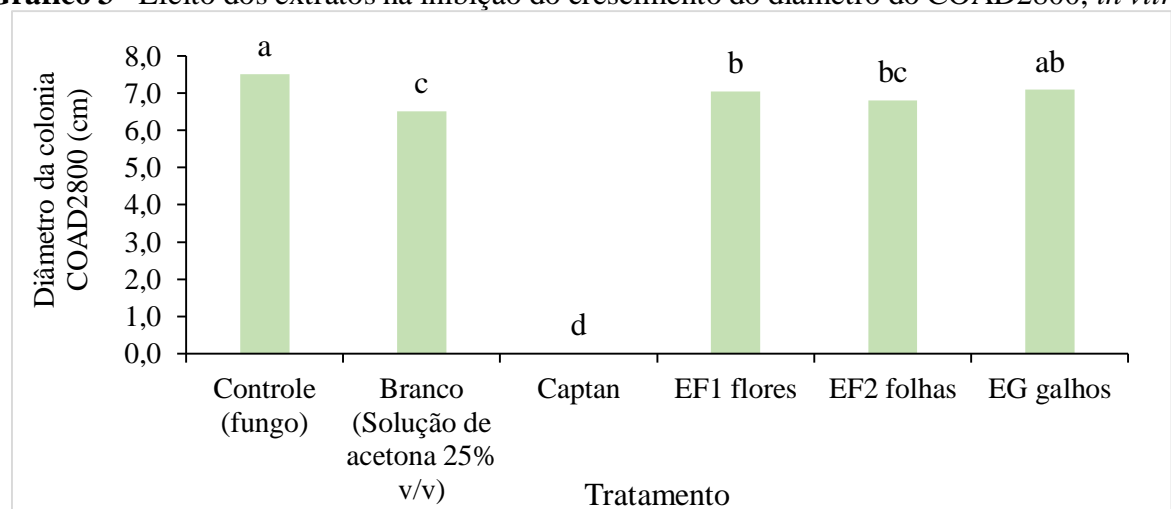
Contra o isolado COAD 2800, não houve efeito dos extratos. Este isolado foi muito sensível ao controle positivo (Captan) e o controle negativo (acetona: água 1:4 v/v) também produziu um efeito discreto quando comparado à aplicação de água destilada, estatisticamente igual ao dos tratamentos (Gráfico 3). Todos os extratos e o controle positivo foram testados a 10 mg/mL. Esta concentração é cerca de 10 vezes maior que a concentração do captan usada para o tratamento de *Botrytis cinerea* (ADAMA, 2020).

Gráfico 2 - Efeito dos extratos na inibição do crescimento do diâmetro do COAD3389, *in vitro*.



Fonte: Autora, 2023. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Gráfico 3 - Efeito dos extratos na inibição do crescimento do diâmetro do COAD2800, *in vitro*.



Fonte: Autora, 2023. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Possivelmente, o sinergismo dos compostos presentes no extrato não foi capaz de atuar em nenhuma via de controle de *B. cinerea*, como as discutidas a seguir. Outra

possibilidade é de o fungo já apresentar resistência aos compostos majoritários dos extratos, pois se trata de um fungo que se apresenta resistente a muitos tratamentos, visto que sofre variações genéticas frequentes (Chen *et al.*, 2023).

Os inibidores da biossíntese de ergosterol são amplamente registrados para controlar o mofo cinzento causado por *B. cinerea* em várias plantas. Os esteróis são constituintes cruciais das membranas celulares eucarióticas, contribuindo para a manutenção da fluidez da membrana e da estabilidade da bicamada fosfolipídica. Os inibidores da biossíntese de ergosterol têm como alvo a 14- α -desmetilase, uma enzima indispensável para sua biossíntese. Estes inibidores comprometem a biossíntese do ergosterol na membrana citoplasmática e levam ao acúmulo de 14- α -metilesteróis. Esses metilesteróis podem desagregar o arranjo compacto das cadeias acil dos fosfolipídeos, comprometendo as funções de determinados sistemas enzimáticos ligados à membrana, inibindo, assim, o crescimento dos fungos. Os inibidores da biossíntese de ergosterol incluem principalmente triazóis, imidazóis, pirimidinas, piridinas e piperazinas (Brunton; Chabner; Knollmann, 2012; Mao *et al.*, 2024).

A biossíntese do ergosterol também pode ser interrompida, pela inibição da esqualeno-2,3-epoxidase (ex. naftifina e terbinafina). Há também outros fármacos que atuam de diferentes maneiras na membrana de ergosterol. Anfotericina B e outros polienos, como a nistatina, ligam-se ao ergosterol nas membranas celulares fúngicas formando poros ou canais e aumentam a permeabilidade da membrana permitindo o extravasamento de uma variedade de pequenas moléculas (Brunton; Chabner; Knollmann, 2012).

Um composto de origem alimentar, ginsenosídeo (presente em *Ginseng*) também inibiu acentuadamente a bioatividade do esterase 14- α -desmetilase (CYP51) em *B. cinerea* (IC₅₀ = 14,45 μ M), aumentando assim a permeabilidade da membrana, que levou à morte de *B. cinerea* (Niu *et al.*, 2023).

O ácido clorogênico também demonstrou atividade antifúngica contra *Botrytis cinerea* (concentrações ≥ 2 g/L), por meio de outros mecanismos. O ácido clorogênico induziu o estresse no retículo endoplasmático (RE) em hifas de *B. cinerea* resultando em um efluxo de cálcio (Ca²⁺) do RE para o citoplasma e depois para as mitocôndrias. A sobrecarga de Ca²⁺ nas mitocôndrias desencadeou a cascata de Ca²⁺- calmodulina - calcineurina, resultando em uma explosão de superóxido nas mitocôndrias. Também foi observado uma diminuição no conteúdo de ATP e da viabilidade celular em *B. cinerea* (Zhang *et al.*, 2023).

Compostos quelantes, como o EDTA, também exibem atividade antifúngica contra *B. cinerea* (≥ 200 mg/L), por meio da quelação de íons metálicos (Yang *et al.*, 2023), sendo mais um dos mecanismos envolvidos na atividade antifúngica da espécie.

3.2.8 Avaliação da Atividade Citotóxica

Os extratos de *A. cathartica* também foram avaliados em relação as suas propriedades citotóxicas, tanto em células tumorais, quanto em células saudáveis, a nível de segurança de uso. As concentrações necessária para causar mortalidade em 50 % (IC₅₀) das células nas diferentes linhagens celulares testadas estão descritas na Tabela 13.

Tabela 13 - Atividade citotóxica dos extratos em diferentes linhagens celulares.

	Extratos					
	Flores		Folhas		Galhos	
Linhagem celular	IC ₅₀ (µg/mL)	IS	IC ₅₀ (µg/mL)	IS	IC ₅₀ (µg/mL)	IS
K-562	64.37 ± 1.78 ^a	13,12	5.75 ± 1.25 ^b	150.48	192,20 ± 3.17 ^c	2.65
MCF-7	165.90 ± 1.54 ^a	5.09	85.73 ± 4.78 ^b	10,09	172,80 ± 3.03 ^c	2.95
HeLa	70.05 ± 1.92 ^a	11.94	25.78 ± 1.64 ^b	33.56	>200	-
SiHa	73.65 ± 2.88 ^a	11,46	27,25 ± 2.74 ^b	31,75	>200	-
Vero	844.70 ± 6.50 ^a	-	865.30 ± 4.52 ^b	-	510.90 ± 5.17 ^c	-

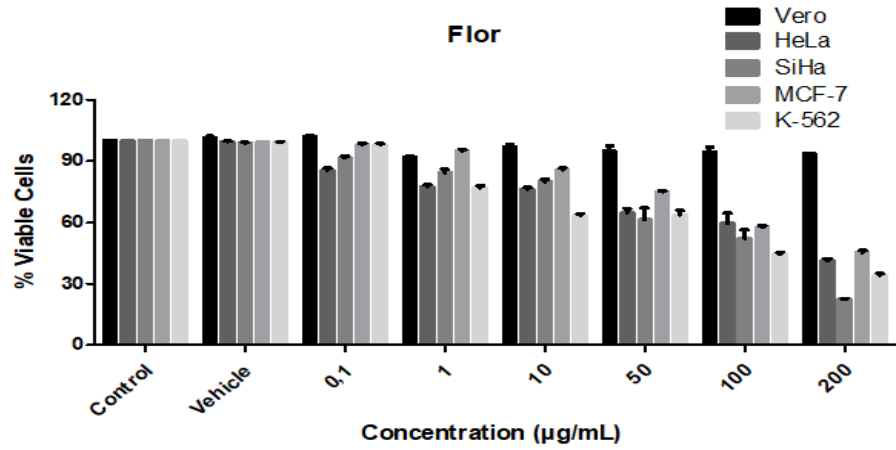
Fonte: Autora, 2023. IS: índice de seletividade. IS na cor vermelha indicam bons resultados. IC₅₀: Concentração necessária para causar a morte de 50% das células. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas na mesma linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Para os extratos das flores, o melhor resultado foi visto para a linhagem celular K-562, seguido da linhagem HeLa e SiHa, onde foi possível observar bons índices de seletividade. Para as folhas, houveram bons resultados com bons índices de seletividade para todas as linhagens testadas, especialmente em K-562, onde o índice de seletividade foi excelente, ou seja, uma pequena concentração foi necessária para causar a inviabilidade celular nesta linhagem, enquanto em células saudáveis (Vero), a concentração necessária para causar dano foi 150 vezes maior. Os galhos não apresentaram boa atividade citotóxica em nenhuma linhagem de células tumorais, no entanto a concentração necessária para inibir as células Vero foram altas, mostrando ser um extrato com potencial tóxico baixo.

Para as flores, as linhagens que apresentaram resultados dose dependentes foram SiHa, MCF-7 e K-562. Para as folhas, apenas as células Vero não foram dose dependentes. Para os galhos, as linhagens que apresentaram resultados dose dependentes foram MCF-7 e K-562.

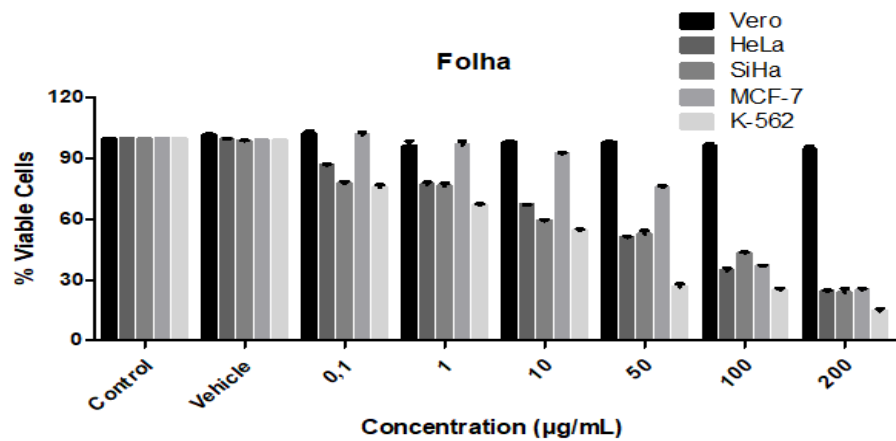
Os gráficos com os testes de diferentes doses dos extratos estão presentes a seguir (Gráfico 4, 5 e 6).

Gráfico 4 - Efeito dos extratos das flores em diferentes linhagens celulares.



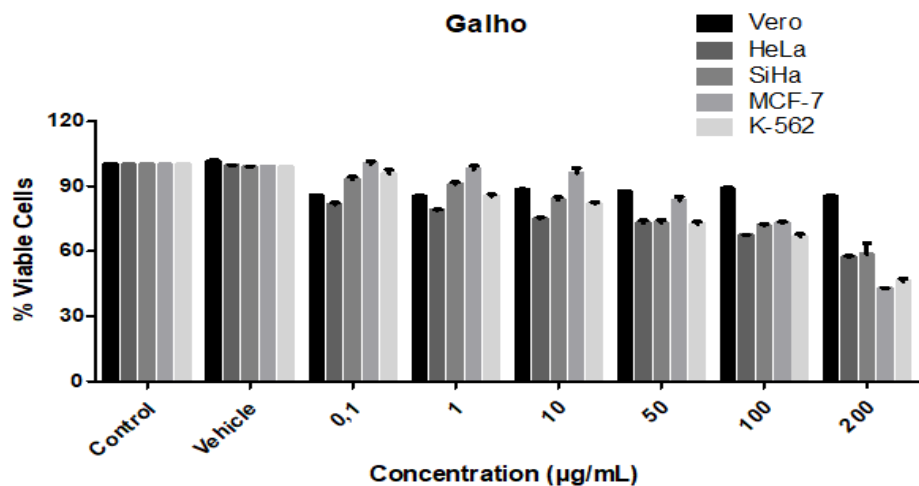
Fonte: Autora, 2023.

Gráfico 5 - Efeito dos extratos das folhas em diferentes linhagens celulares.



Fonte: Autora, 2023.

Gráfico 6 - Efeito dos extratos dos galhos em diferentes linhagens celulares.



Fonte: Autora, 2023.

Os resultados apresentados tanto dos extratos como de compostos isolados despertam interesse na pesquisa com *A. cathartica*, em especial por propriedades citotóxicas para células tumorais, tornando uma espécie de grande interesse para a futura produção de fitofármacos ou como fonte de protótipos para o estabelecimento de novos agentes antitumorais (Simões *et al.*, 2017).

Na família Apocynaceae, uma grande variedade de alcaloides foram relatados. Exemplos notáveis são alcaloides indólicos vinblastina e vincristina, presentes em *Catharanthus roseus*, que são comercializados como produtos farmacêuticos para tratar leucemia, linfoma, câncer de mama, pulmão e colo do útero. A atividade anticancerígena dos alcaloides é atribuída à sua capacidade de romper microtúbulos, causando dissolução dos fusos mitóticos e metáfase parada em células em divisão (Chan; Wong; Chan, 2016). As atividades biológicas dos alcaloides da vinca podem ser explicadas pela sua capacidade de ligar-se especificamente à β -tubulina e bloquear a sua polimerização com a tubulina em microtúbulos. Quando as células são incubadas com vinblastina, os microtúbulos se dissolvem, e ocorre formação de cristais altamente regulares, que contém 1 mol de vinblastina ligada por mol de tubulina. A divisão celular é interrompida na metáfase. Na ausência de um fuso mitótico intacto, os cromossomas duplicados não podem alinhar-se ao longo da placa equatorial. Sofrem dispersão por todo o citoplasma, ou podem aglomerar-se em grupos inusitados, formando bolas ou estrelas. As células bloqueadas durante a mitose sofrem alterações características do processo de apoptose (Brunton; Chabner; Knollmann, 2012).

Outros gêneros da família Apocynaceae com propriedades antiproliferativas contra linhagens celulares de câncer humano, incluem o gênero *Allamanda*, *Alstonia*, *Calotropis*, *Cerbera*, *Kopsia*, *Nerium*, *Plumeria* e *Vallaris* (Chan; Wong; Chan, 2016).

Em *Allamanda*, um extrato etanólico de *Allamanda cathartica* mostrou atividade *in vitro* contra células derivadas de carcinoma humano da nasofaringe (KB) (Dose efetiva - DE₅₀ 4.6 $\mu\text{g/mL}$) (Kupchan *et al.*, 1974). O extrato etanólico das flores de *A. cathartica* e o plumieride isolado da planta, apresentaram redução significativa da viabilidade celular em células HepG2 (células de câncer de fígado humano) nas doses de 0,1 a 100 $\mu\text{g/mL}$, contudo, esse efeito não foi dependente da dose (Bonomini *et al.*, 2017).

4 SÍNTESE DE ALCALOIDES DO TIPO *Allamanda*

4.1 METODOLOGIA

4.1.1 Síntese de Alcaloide do tipo *Allamanda* e de análogos

Os alcaloides encontrados em *A. cathartica* foram identificados por Prabhadevi e colaboradores (2012) em seus galhos. Esses compostos são encontrados em pequenas quantidades na planta, o que justifica a obtenção por via sintética, que pode proporcionar maiores quantidades destes compostos. Uma vez a síntese validada e com bons rendimentos, aliada à resultados positivos sobre a atividade biológica, abre-se a possibilidade de explorarmos essas moléculas como protótipos para possíveis produtos biopesticidas e fármacos. Sendo assim, em seguida, será apresentado uma proposta para obtenção do alcaloide [17] derivado de *A. cathartica* e uma proposta para a obtenção de dois análogos do alcaloide [17].

4.1.1.1 Materiais e Reagentes

Os reagentes utilizados foram adquiridos na Sigma-Aldrich Corporation (San Luis, EUA) e os solventes adquiridos da empresa Química Moderna (Barueri, São Paulo) e Êxodo Científica (Sumaré, São Paulo). O acompanhamento das reações foi realizado por cromatografia em camada delgada (CCD) em placas de alumínio revestidas com sílica gel 60 F254 (Merck KGaA®) e para a visualização das placas cromatográficas foi utilizada uma câmara de radiação ultravioleta com lâmpadas de 365 e 254 nm ou iodo metálico. Os produtos sintetizados foram purificados por cromatografia em coluna com sílica gel 60 (70-230 mesh) ou por recristalização.

As análises espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de hidrogênio foram obtidas no equipamento Bruker 300 e 400 MHz. Os espectros foram analisados pelo *software Topspin*. As análises de Espectrometria de Massa de Alta Resolução foram realizadas com Ionização por Electrospray (ESI).

4.1.1.2 Procedimento Geral de Síntese do Alcaloide [17]

Para alcançar o objetivo proposto, desenhou-se uma rota sintética composta de três etapas: I) *O*-Benzoilação de hidroxilamina *N*-protegida, II) Desproteção *N*-Boc da hidroxilamina e III) Formação de amida de Weinreb.

A etapa I, parte do reagente comercial carbamato de terc-butila (Boc-amida). A reação ocorreu a 0 °C na presença de cloreto de benzoíla e trietilamina (TEA) em diclorometano (DCM), por 1 h (Jeon *et al.*, 2020).

A etapa II, trata-se da desproteção *N*-Boc da hidroxilamina, utilizando ácido trifílico (TfOH) em éter etílico a 0 °C por 4 h (Liu *et al.*, 2017).

A última etapa (III), trata-se da formação da amida de Weinreb. A reação ocorreu na presença de *O*-benzoil-hidroxilamina, ácido trifílico, tetrafluoroborato de 2-(1*H*-Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamínio (TBTU), e *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) em DMF, por aproximadamente 12 h (overnight) em temperatura ambiente (Gouault *et al.*, 2009), proporcionando a síntese do alcaloide [17].

4.1.1.3 Procedimento Geral de Síntese dos Análogos de Alcaloide

Para alcançar o objetivo proposto, desenhou-se uma rota sintética composta de duas etapas: I) Formação de amida de Weinreb e II) Hidrogenólise.

A etapa de formação de amida de Weinreb (I), parte do reagente comercial ácido pimélico. A reação ocorreu na presença de cloridrato de *O*-benzilhidroxilamina (NH₂OBn.HCl), Tetrafluoroborato de 2-(1*H*-Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamínio (TBTU), e *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) em DMF, por aproximadamente 12 h (overnight) em temperatura ambiente (Gouault *et al.*, 2009), proporcionando a síntese de um análogo do alcaloide [17].

A etapa (II), parte do intermediário sintetizado na etapa anterior. O meio reacional foi composto por Paládio sobre carbono (Pd/C) em metanol sob atmosfera de hidrogênio. A suspensão ficou em agitação por 4 h (Apfel *et al.*, 2000), proporcionando a síntese de outro análogo do alcaloide [17].

4.1.2 Avaliação *in silico* dos Compostos Sintetizados

Os compostos obtidos foram analisados *in silico* pelo *software Molinspiration* em relação às suas propriedades físico-químicas e predição de bioatividade. O *software Osiris Property Explorer* foi utilizado para avaliar a predição de toxicidade dos compostos.

4.1.3 Avaliação da atividade citotóxica

Os análogos de alcaloides sintetizados foram avaliados *in vitro* em relação as suas atividades citotóxicas, conforme descrito a seguir:

4.1.3.1 Cultura de células

As células utilizadas neste trabalho foram: HeLa (adenocarcinoma cervical humano), SiHa (adenocarcinoma cervical humano – HPV-16), MCF-7 (Carcinoma de mama), obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC - Rockville, MD, EUA) e Linhagens celulares Vero (célula renal de macaco verde africano) e K-562 (leucemia mieloide crônica), obtidas no Banco de Celulares do Rio de Janeiro. As linhagens celulares foram mantidas em meio de cultura suplementado com 10 % (v/v) de soro fetal bovino (Gibco, Grand Island, NY, EUA), a 37 °C e em atmosfera umidificada (5 % CO₂). As linhagens celulares de SiHa e HeLa foram cultivadas em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium – Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) de baixa glicose, linhagem celular K-562 e MCF-7 em RPMI 1640 Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) e células Vero em DMEM de alto teor de glicose (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA).

4.1.3.2 Determinação da Viabilidade Celular

O efeito citotóxico dos compostos nas linhagens celulares (MCF-7, HeLa, SiHa e Vero) foi realizado utilizando o ensaio MTT. Cada linha celular foi semeada em placas de 96 poços (5 x 10³ células por poço) e incubadas a 37 °C e 5 % de CO₂. Após atingir a semiconfluência, as células foram tratadas com as concentrações dos compostos variando de 0,1 a 200 µg/mL e a célula Vero de 0,1 a 1000 µg/mL. Após 48 h, o meio contendo o tratamento foi retirado e as células foram incubadas com solução de MTT (0,5 mg/mL) por 3 h a 37 °C, na ausência de luz. Os cristais de formazan formados foram dissolvidos em DMSO e quantificados por absorbância em 570 e 630 nm, medidos em um espectrofotômetro de placa (Spectramax M2e, SoftMax Pro Software Interface 5.4.1, EUA). Curvas dose-resposta foram construídas e os valores de IC₅₀ foram determinados pelo *software Graphpad Prism* (versão 8.0) (García *et al.*, 2003).

4.1.3.3 Contagem de células

A linhagem celular K-562 foi semeada em microplaca de 96 poços (8 x 10³/poço) e incubada a 37 °C em CO₂ a 5 % durante 24 h. Posteriormente, as células foram tratadas com os compostos de 0,1 a 200 µg/mL por mais 48 h. A contagem celular foi realizada em um citômetro FACSVerse equipado com laser azul de 488 nm e sensor de fluxo (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). Curvas dose-resposta foram construídas e os valores de IC₅₀ foram determinados pelo *software Graphpad Prism* (versão 8.0) (Yurttaş *et al.*, 2022).

4.1.3.4 Análise do Índice de Seletividade

Células Vero foram tratadas para avaliar o índice de seletividade (IS), a fim de avaliar o quão seletivo o composto é para matar/danificar células cancerígenas em vez de células normais. O grau de seletividade dos compostos foram expresso para cada linhagem celular tumoral, conforme equação $IS = CC_{50}/IC_{50}$ (Quispe *et al.*, 2006).

4.1.3.5 Análise estatística

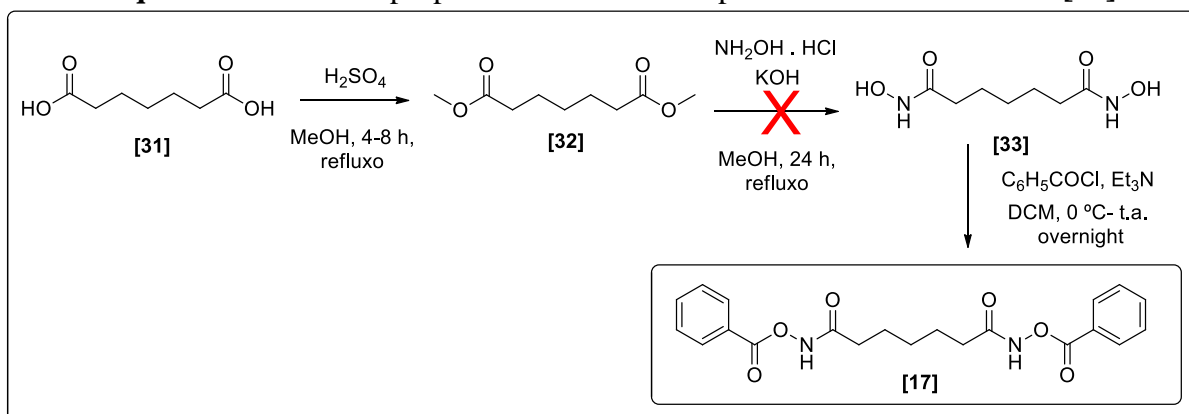
As médias de cada molécula foram submetidas a análise de variância (ANOVA) e comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade, utilizando o *software Statistica 7.0*.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 Síntese de Alcaloide do tipo *Allamanda*

Anteriormente a rota discutida neste trabalho, houve a proposta de outra rota sintética para a síntese do alcaloide [17], também composta de três etapas, sendo elas: I) Esterificação; II) Formação do ácido hidroxâmico e III) Benzoilação (Esquema 2).

Esquema 2 - Primeira proposta de rota sintética para a síntese do alcaloide [17]

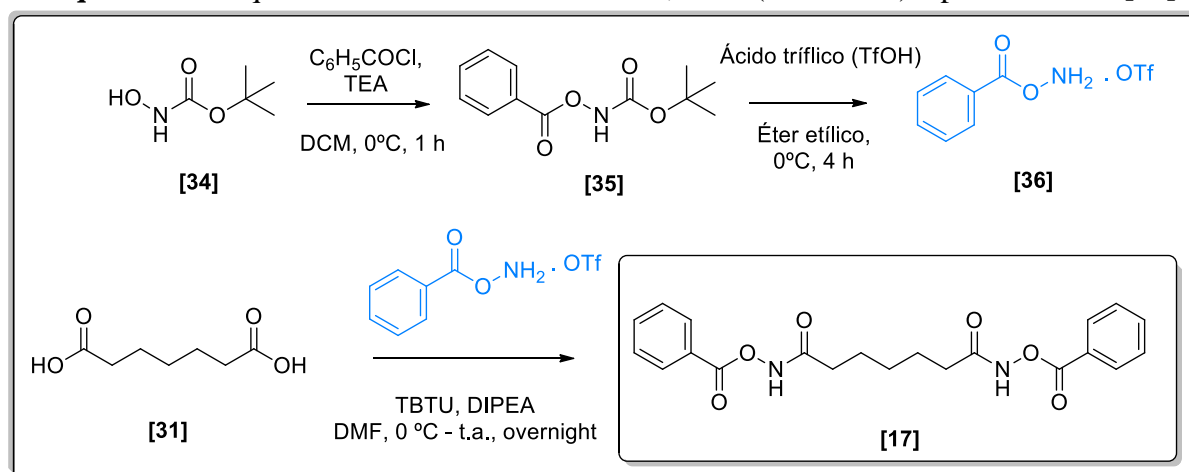


Fonte: Autora, 2023.

No entanto, esta rota não foi eficiente para a obtenção do alcaloide desejado. A etapa II, por se tratar da formação de uma molécula muito polar [33] (ácido hidroxâmico), não foi possível extrair o produto do meio reacional por fracionamento líquido/líquido, impossibilitando sua purificação, análise e seguimento da rota sintética.

Sendo assim, foi necessário uma nova proposta de rota sintética, onde conseguiu-se manter três etapas reacionais (Esquema 3).

Esquema 3 - Esquema de síntese do alcaloide *N*¹,*N*⁷-bis(benzoiloxi)heptanodiamida [17]

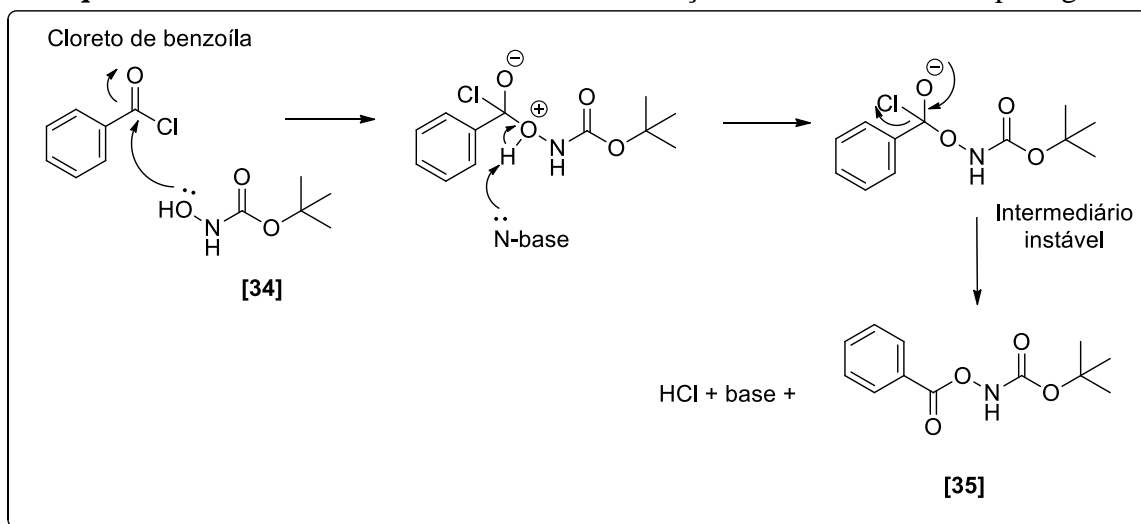


Fonte: Autora, 2023.

A primeira etapa da rota sintética tratou-se de uma *O*-Benzoilação da hidroxilamina *N*-protegida. Esta reação trata-se de uma substituição nucleofílica no grupo carbonila. A maioria dos materiais de partida dessas substituições são derivados de ácido carboxílico, com a fórmula geral RCOX, neste caso utilizou-se o cloreto de benzoíla. Como o grupo carbonila desta molécula é um eletrófilo muito bom, ele reage com uma ampla gama de nucleófilos diferentes, como as hidroxilas, presente na hidroxilamina (Clayden; Greeves; Warren, 2012). Nas condições testadas, o rendimento desta reação foi de 98%.

A primeira etapa desta reação consiste na adição do grupamento hidroxila da hidroxilamina [34] ao grupo carbonila eletrofílico. A base é importante porque remove o próton da hidroxila ao atacar o grupo carbonila. Utilizando um cloreto de acila, nesta reação ocorre a formação de um intermediário, no qual é instável. O intermediário entra em colapso por uma reação de eliminação, e perde o íon cloreto, formando o produto [35]. O cloreto é o grupo de saída e sai com sua carga negativa, que posteriormente formará ligação com o próton capturado pela base, formando HCl (Clayden; Greeves; Warren, 2012). O mecanismo reacional desta etapa está demonstrado no Esquema 4.

Esquema 4 - Mecanismo reacional da *O*-Benzoilação da hidroxilamina *N*-protegida.



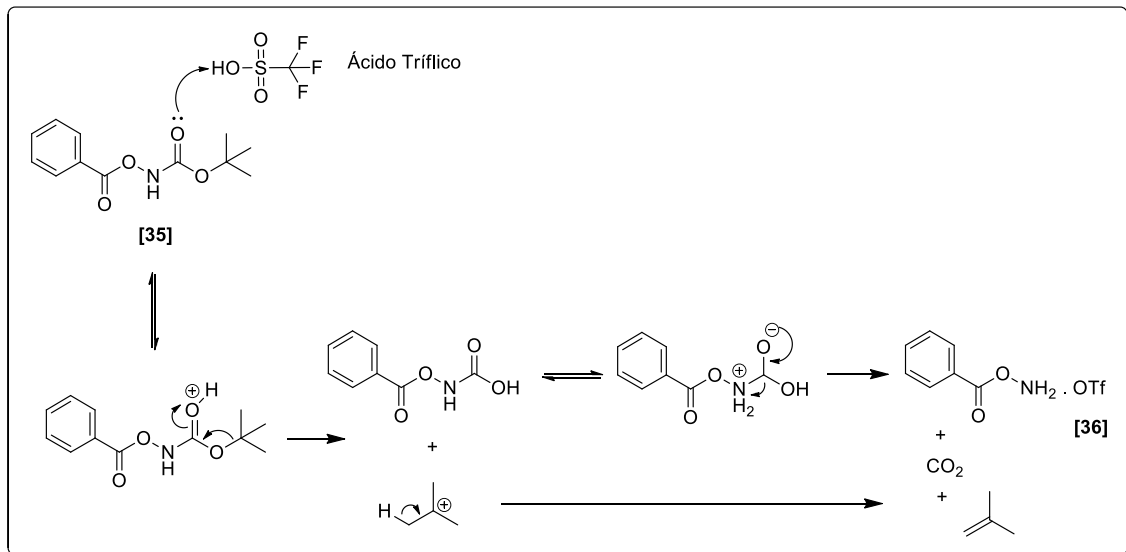
Fonte: Autora, 2023.

A hidroxilamina utilizada nesta reação, estava protegida por um grupo protetor carbamato, chamado Boc, que significa t-butiloxicarbonil. O grupo Boc é utilizado em aminas para protegê-las de compostos eletrofílicos e formação de produtos secundários. É um dos grupos protetores mais utilizados na química orgânica sintética quando é necessário para proteger aminas primárias ou secundárias. Esta utilidade deve-se claramente à facilidade de

introdução e remoção de Boc, que pode ser removido simplesmente com ácido aquoso diluído (Agami; Couty, 2002; Clayden; Greeves; Warren, 2012).

A desproteção *N*-Boc da hidroxilamina com ácido, tratou-se da etapa II, com rendimento de 92 %. O mecanismo reacional da desproteção da molécula está demonstrado no Esquema 5.

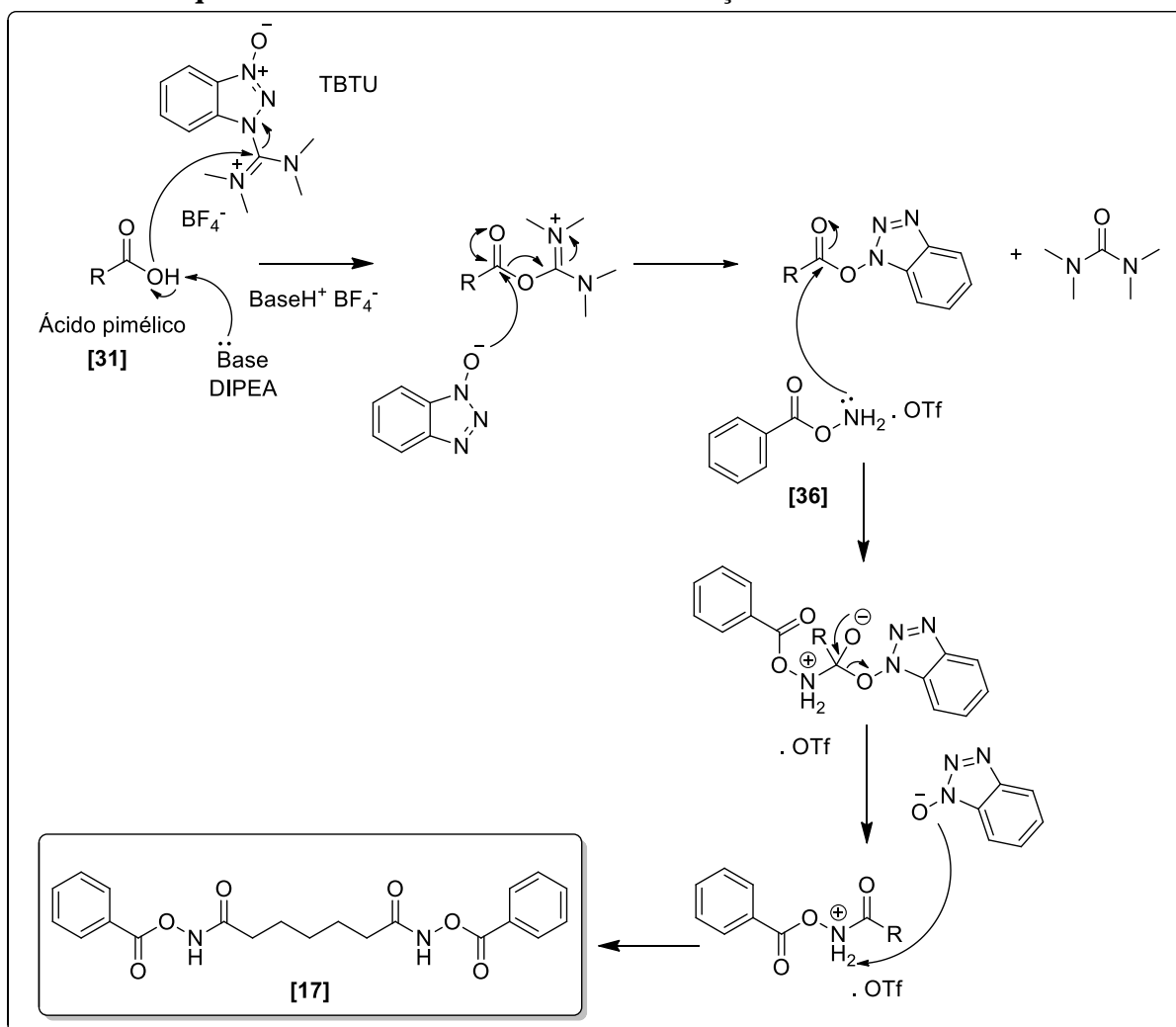
Esquema 5 - Mecanismo reacional da desproteção *N*-Boc da hidroxilamina



Fonte: Autora, 2023.

A etapa III, tratou-se da formação da amida de Weinreb (Esquema 6). Nas condições reacionais testadas, o rendimento obtido foi de 84 %. A preparação deste alcaloide, cujo grupo funcional é uma *N*-metoxi-*N*-metilamida, foi realizada pelo acoplamento do ácido carboxílico [31] (ácido pimélico) com ativadores (reagentes de acoplamento), neste caso o TBTU, e *O*-benzoil-hidroxilamina-OTf, na presença de uma base (DIPEA). As amidas de Weinreb são compostos estáveis; não requerem manuseio especial, e são facilmente purificados por cromatografia ou cristalização e podem ser armazenados indefinidamente (Kürti; Czakó, 2005). Neste trabalho, a purificação se deu por recristalização em etanol.

Este tipo de reação já foi utilizado na síntese de outro alcaloide. A primeira síntese total do alcalóide da família Stemona, (-)-tuberostemonina, foi realizada por Wipf e colaboradores. A instalação da porção butirrolactona começou com a preparação de uma amida de Weinreb a partir de um éster metílico (Kürti; Czakó, 2005).

Esquema 6 - Mecanismo reacional da formação de amida de Weinreb

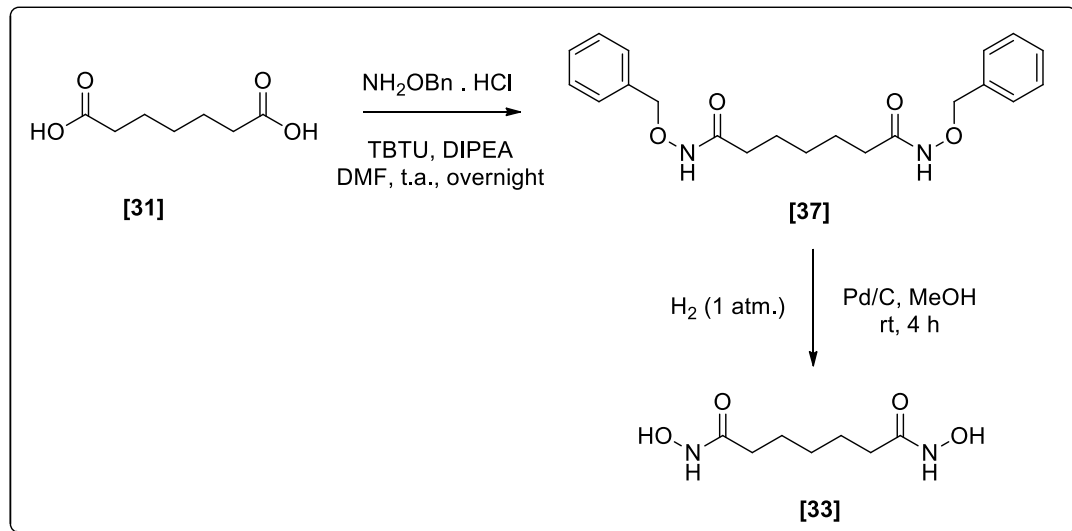
Fonte: Autora, 2023.

4.2.2 Síntese dos Análogos de Alcaloide

Os análogos do alcaloide [17], foram sintetizados a partir da rota proposta no Esquema 7, tratando-se de duas etapas.

A etapa I, também se tratou da formação da amida de Weinreb. Nas condições reacionais testadas, o rendimento obtido foi de 65 % para o análogo [37]. A preparação desta molécula, foi realizada pela conversão do ácido carboxílico (ácido pímelico) com ativadores (reagentes de acoplamento), neste caso o TBTU, e cloridrato de *O*-benzilhidroxilamina na presença de uma base (DIPEA).

Esquema 7 - Rota sintética proposta para a síntese de análogos de alcaloide do tipo *Allamanda*.



Fonte: Autora, 2023.

A segunda etapa tratou-se de uma desbenzilação, remoção do grupo benzilo, via hidrogenólise. A desbenzilação por clivagem redutiva sobre catalisadores metálicos de paládio (Pd) com hidrogênio molecular tem sido amplamente utilizada por muitas décadas (Entwistle; Wood, 1991). O paládio é amplamente utilizado para desbenzilação. Possui alta atividade para hidrogenólise, com baixa atividade para saturação de anéis aromáticos (Smith; Notheisz, 1999). A reação pode ocorrer sob condições de hidrogenação catalítica sempre que um heteroátomo (em particular O ou N) se encontra ligado a um átomo de carbono adjacente a um anel benzeno, e envolve a quebra de uma ligação σ entre C – O ou C – N (Clayden; Greeves; Warren, 2012).

A estrutura do substrato influencia as taxas de hidrogenólise. Sobre o Pd, as taxas de hidrogenólise dos derivados benzílicos aumentam na ordem $\text{OH} < \text{O-R} < \text{O-Ar} < \text{OCOR}$, de acordo com a sua capacidade de grupo de saída. Portanto, por a molécula conter um bom grupo de saída, o rendimento da reação utilizando Pd/C e hidrogênio molecular foi quantitativa para o análogo [33].

4.2.3 Avaliação *in silico* dos compostos sintetizados

4.2.3.1 Propriedades físico-químicas e predição de bioatividade

Os compostos obtidos [37, 33 e 17] foram analisados *in silico* pelo *software Molinspiration* em relação às suas propriedades físico-químicas e predição de bioatividade.

Através do *software Molinspiration* é possível calcular as propriedades físico-químicas para solubilidade e permeabilidade do fármaco, sendo elas: coeficiente de partição

água/octanol (logP), área e superfície polar molecular (ASPM), número de átomos (N átomos), massa molecular (MM), aceptores de ligações de hidrogênio (nALH), doadores de ligações de hidrogênio (nDLH) e número de ligações rotativas (nLRot). Com estes parâmetros é possível verificar se os compostos se enquadram nas regras dos cinco de Lipinski. A regra dos cinco foi derivada de uma análise de compostos do banco de dados do World Drugs Index com o objetivo de identificar características que eram importantes para tornar um medicamento oralmente ativo. Verificou-se que os fatores em questão envolviam números múltiplos de cinco: $\log P \leq 5$, peso molecular ≤ 500 , número de aceptores de ligações de hidrogênio ≤ 10 e número de doadores de ligações de hidrogênio ≤ 5 . Moléculas que violam mais de uma dessas regras podem ter problemas de biodisponibilidade e absorção por via oral (Lipinski *et al.*, 2001; Patrick, 2013).

A análise da área de superfície polar molecular é um descritor muito bom que caracteriza a absorção do medicamento, incluindo absorção intestinal, biodisponibilidade, permeabilidade e penetração da barreira hematoencefálica. O número de ligações rotativas é uma medida de flexibilidade molecular. Foi demonstrado que é um descritor muito bom da biodisponibilidade oral de medicamentos (Molinspiration, 2023).

Veber e colaboradores em 2002, demonstraram uma descoberta bastante surpreendente de que a flexibilidade molecular desempenha um papel importante na biodisponibilidade oral; quanto mais flexível for a molécula, menor será a probabilidade de ela ser oralmente ativa. Para medir a flexibilidade, pode-se contar o número de ligações livremente rotativas que resultam em conformações significativamente diferentes. Ligações a substituintes simples, como grupos metílicos ou álcool, não estão incluídas nesta análise porque sua rotação não resulta em conformações significativamente diferentes. O estudo de Veber também demonstrou que a área da superfície polar da molécula poderia ser usada como um fator. Essas descobertas levaram aos seguintes parâmetros para prever a atividade oral aceitável: uma área de superfície polar $\leq 140 \text{ \AA}^2$ e ≤ 10 ligações rotativas ou ≤ 12 doadores e aceptores de ligação de H no total e ≤ 10 ligações rotativas (Patrick, 2013).

Medicamentos polares que violam as regras acima são geralmente mal absorvidos e devem ser administrados via injetável. No entanto, alguns medicamentos altamente polares são absorvidos pelo sistema digestivo, pois são capazes de serem transportados por proteínas de transporte presentes nas membranas das células que revestem a parede intestinal, devido a semelhanças estruturais com moléculas que fazem parte de processos bioquímicos nos tecidos. Também podem ser absorvidos pelo suprimento sanguíneo se tiverem baixo peso molecular

(menos de 200), pois podem passar através de pequenos poros entre as células que revestem a parede intestinal (Patrick, 2013).

As análises das propriedades físico-química dos compostos analisados estão demonstradas na Tabela 14. É possível observar que nenhuma das moléculas violaram as regras de Lipinski, ou seja, não é provável que estas moléculas terão má absorção ou permeação por via oral. No entanto, em relação ao estudo de Veber, apenas os compostos [33] e [17] seguiram os dois parâmetros, com uma área de superfície polar $\leq 140 \text{ \AA}$ e tiveram ≤ 10 ligações rotativas ou ≤ 12 doadores e aceptores de ligação de H no total e ≤ 10 ligações rotativas. O composto [37] violou apenas o parâmetro de número de ligações rotativas, o que não inviabiliza totalmente sua absorção por via oral.

Tabela 14 - Propriedades físico-químicas estimadas pelo *software Molinspiration*.

Propriedades avaliadas	Compostos		
	37	33	17
LogP	3,69	-0,05	3,89
ASPM (\AA)	76,66	98,65	76,66
N átomos	27	13	25
MM (g/mol)	370,45	190,20	342,39
nALH	6	6	6
nDLH	2	4	2
nLRot	12	6	10
Violações das Regras de Lipinski	0	0	0
Violações aos parâmetros de Veber	1	0	0

Fonte: Autora, 2023. Legenda: coeficiente de partição água/octanol (logP), área e superfície polar molecular (ASPM), número de átomos (N átomos), massa molecular (MM), aceptores de ligações de hidrogênio (nALH), doadores de ligações de hidrogênio (nDLH) e número de ligações rotativas (nLRot).

A triagem em relação a bioatividade fornece um conjunto de dados teóricos que podem indicar alguns alvos farmacológicos dos compostos químicos em estudo. Os *software Molinspiration* fornece uma pontuação de atividade variando entre -3 e 3, para os alvos: Ligante de Receptor acoplado à proteína G, Modulador de canal iônico, Inibidor de quinase, Ligante do receptor nuclear, Inibidor de protease e Inibidor enzimático. Um “*score*” calculado acima de 0,00 sugere uma considerável atividade biológica para aquele alvo específico, enquanto que valores de “*score*” entre -0,50 e 0,00 indicam moderada atividade biológica para o alvo e, um

“score” abaixo de -0,50 sugere inatividade frente ao alvo farmacológico (Husain *et al.*, 2016). Os resultados de bioatividade dos compostos estão demonstrados na Tabela 15.

É possível observar que para a molécula [37], houveram quatro alvos farmacológicos com considerável atividade biológica, sendo o melhor deles como inibidor de protease. Para a molécula [33], apenas dois alvos se mostraram com considerável atividade biológica, sendo o melhor deles inibidor enzimático, seguido do inibidor de protease. Para a molécula [17], houveram quatro alvos farmacológicos com considerável atividade biológica, sendo o melhor deles como inibidor de protease.

Tabela 15 - Bioatividade dos compostos estimadas pelo software *Molinspiration*.

Alvo Farmacológico	Bioatividade		
	37	33	17
Ligante de Receptor acoplado à proteína G	0,07	- 0,42	0,14
Modulador de canal iônico	- 0,00	- 0,44	- 0,09
Inibidor de quinase	0,02	- 0,41	0,16
Ligante de receptor nuclear	- 0,14	- 0,86	- 0,07
Inibidor de protease	0,37	0,28	0,50
Inibidor enzimático	0,22	0,43	0,25

Fonte: Autora, 2023. As cores representam: verde: considerável atividade biológica; laranja: moderada atividade biológica, vermelho: inatividade.

Os inibidores de proteases (IP) atuam como inibidores de enzimas proteolíticas, interagindo com os sítios ativos das proteases, formando complexos estáveis. Os IPs são aplicados em diagnóstico e terapêutica, para tratar diversas doenças como hepatite, herpes, HIV, artrite, distrofia muscular, malária, câncer, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares. Os IPs também podem ser utilizados para controlar pragas herbívoras e infecções microbianas. O controle biológico dos IPs contra patógenos de plantas e pragas herbívoras pode ajudar a reduzir o uso extensivo de pesticidas químicos, reduzir grandes perdas na produção agrícola e melhorar a qualidade dos produtos (Marathe *et al.*, 2019).

A maioria dos inibidores de proteases provém de plantas e alguns têm origem animal ou microbiana. Eles exibem especificidade, inibem apenas proteases pertencentes a uma única classe mecanística (serina, cisteína, aspartil ou metaloproteases de matriz), ligam-se e bloqueiam o acesso ao sítio ativo de proteases alvo e exibem inibição competitiva. Os IPs das

plantas constituem uma parte importante do sistema de defesa da planta contra insetos fitófagos e fitopatógenos. Essa propriedade evita a proteólise das proteases presentes no intestino dos insetos ou secretadas pelos microrganismos patogênicos, o que leva à escassez de aminoácidos ou outros nutrientes essenciais para o crescimento de insetos e fitopatógenos (Marathe *et al.*, 2019).

A produção e isolamento destes IPs de plantas requer tempo e um alto investimento para a obtenção de grandes quantidade e de forma pura, porque é necessário um longo período para o cultivo/crescimento de plantas e para realizar técnicas de isolamento (Marathe *et al.*, 2019). O desenvolvimento de rotas sintéticas para a síntese destas moléculas pode favorecer este processo. O análogo [37] e [33] e o alcaloide [17] sintetizados apresentaram considerável atividade biológica para inibir proteases *in silico*, e podem se mostrar futuros biopesticidas.

4.2.3.2 Predição de toxicidade

O software *Osiris Property Explorer* foi utilizado para avaliar a predição de toxicidade dos compostos sintetizados. O programa *Osiris* prediz o risco da toxicidade aos efeitos mutagênico, tumorigênico, irritante e efeitos sobre o sistema reprodutor. O preditor de risco de toxicidade localiza fragmentos dentro de uma molécula, o que indica um risco potencial de toxicidade. Os alertas de risco de toxicidade são uma indicação de que a estrutura desenhada pode ser prejudicial à categoria de risco especificada (Tariq *et al.*, 2016). Os resultados dos compostos avaliados são mostrados na Tabela 16.

Tabela 16 - Predição de toxicidade dos compostos sintetizados.

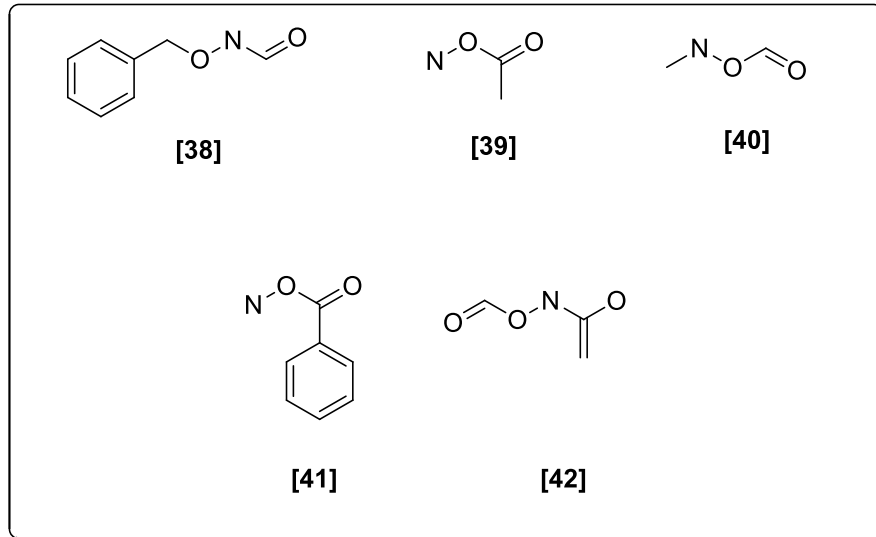
Parâmetros avaliados	Compostos		
	37	33	17
Mutagênico	*	*	*
Tumorigênico	*	*	*
Irritante	*	*	*
Efeito no sistema reprodutivo	*	*	*

Fonte: Autora, 2023. A cor verde representa risco baixo e cor vermelha representa alto risco para os parâmetros avaliados.

O intermediário de síntese [33], não demonstrou possuir risco de toxicidade nos parâmetros avaliados. No entanto, o intermediário [37], apresentou alto risco de ser mutagênico, por apresentar um fragmento [38] de alto risco de mutagenicidade. O alcaloide [17], apresentou

risco de mutagenicidade com os fragmentos [38], [39] e [40], e tumorigênico com os fragmentos [41] e [42], demonstrados na Figura 6.

Figura 6 - Fragmentos com alto risco de toxicidade dos compostos [37] e [17].



Fonte: Autora, 2023.

4.2.4 Avaliação da Atividade citotóxica

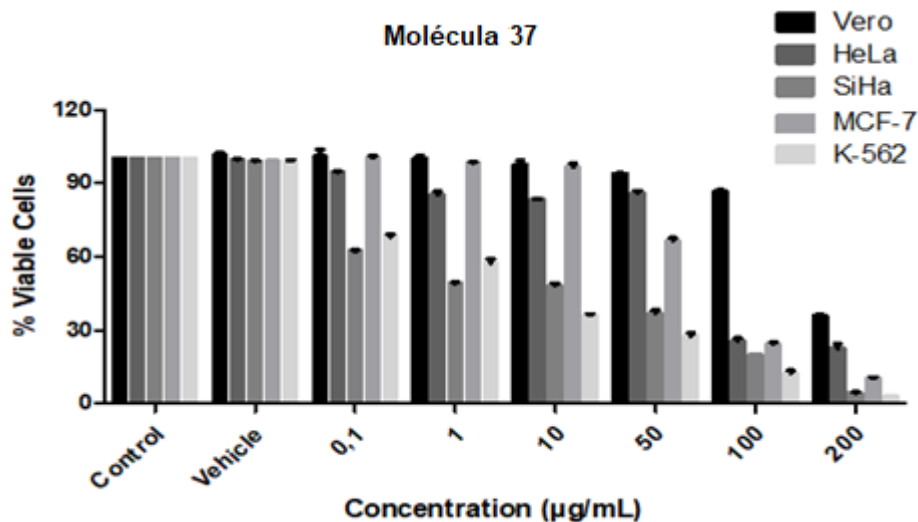
Os análogos de alcaloide [37] e [33] foram avaliados em células K-562, MCF-7, HeLa, SiHa e Vero. Para a linhagem celular K-562, ambas as moléculas apresentaram bons resultados. Apesar de as moléculas serem relativamente tóxicas para células Vero, especialmente [33], foi necessária uma concentração muito baixa dos compostos para exercer atividade citotóxica para células tumorais, proporcionando um bom índice de seletividade. Para as linhagens MCF-7 e HeLa, apesar da atividade demonstrada, a concentração necessária dos compostos para gerar atividade foi alta, ocasionado um índice de seletividade ruim. Em células SiHa, o composto [34] se mostrou melhor, pois seu índice de seletividade foi 6 vezes maior que o do composto [33], se mostrando promissor. No geral, as melhores atividades foram observadas na linhagem K-562 com o composto [33] e para a linhagem SiHa para o composto [34]. Os resultados estão demonstrados na Tabela 17.

Tabela 17 - Atividade citotóxica dos compostos em diferentes linhagens celulares.

Linhagem celular	Composto					
	37			33		
	ug/mL	uM	IS	ug/mL	uM	IS
K-562	1.49 ± 0.22	4,02 ± 0,59 ^a	113.69	0.46 ± 0.25	2,42 ± 1,31 ^b	150.25
MCF-7	65.59 ± 1.87	177,06 ± 5,05 ^a	2.58	19.59 ± 3.88	103,00 ± 20,40 ^b	3.57
HeLa	80.59 ± 2.07	217,55 ± 5,59 ^a	2.10	9.19 ± 0.64	48,32 ± 3,36 ^b	7.62
SiHa	1.27 ± 0.58	3,43 ± 1,57 ^a	133.38	3.20 ± 0.77	16,82 ± 4,05 ^b	21.89
Vero	169,40 ± 2,5	457,29 ± 6,75 ^a	-	70.05 ± 2.47	368,30 ± 12,99 ^b	-

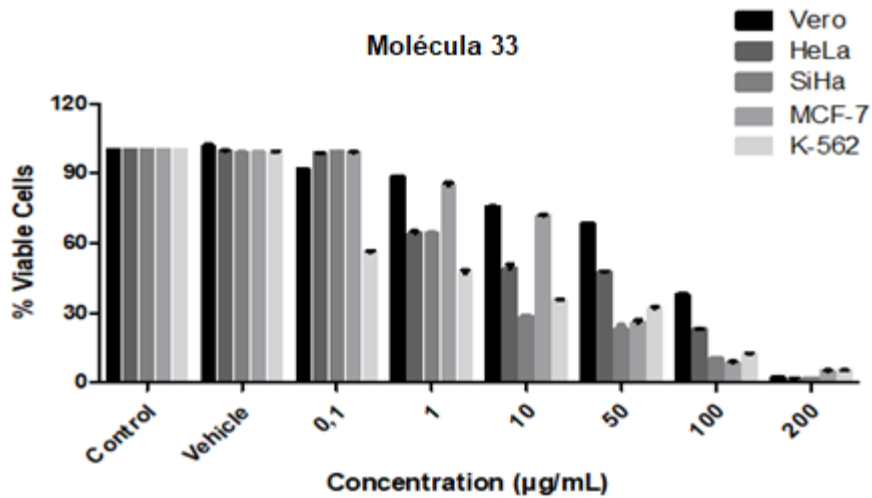
Fonte: Autora, 2023. IS: índice de seletividade. IS na cor vermelha indicam bons resultados. IC₅₀: Concentração necessária para causar a morte de 50% das células. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas na mesma linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Para a molécula [37], as linhagens que apresentaram resultados dose-dependente foram SiHa, e K-562. Para [33], todas as linhagens celulares foram dose dependentes. Os gráficos com os testes de diferentes doses dos compostos são demonstrados nos Gráficos 7 e 8.

Gráfico 7 - Efeito do composto [37] em diferentes linhagens celulares.

Fonte: Autora, 2023.

Gráfico 8 - Efeito do composto [33] em diferentes linhagens celulares.



Fonte: Autora, 2023.

Relacionando os resultados encontrados na avaliação *in silico* dos compostos e a avaliação biológica, um dos possíveis alvos biológicos das moléculas são como inibidores de proteases. As proteases têm um papel central em várias vias de sinalização; portanto, representam alvos potenciais de medicamentos para um grande conjunto de doenças, inclusive câncer.

Uma das principais características das células tumorais é a sua capacidade de atacar tecidos normais. Vários métodos estão envolvidos em processos de invasão e migração, por exemplo, a perda de adesão célula-célula e matriz celular ou a degradação de componentes da matriz extracelular (MEC). Após se libertarem do tumor primário, as células malignas começam a migrar para a MEC, uma rede densa composta por laminina, fibronectina e outras glicoproteínas, colágenos e proteoglicanos. As células malignas apresentam atividade proteolítica aumentada, que os ajuda a digerir a MEC. Tais células podem aderir a algumas moléculas de substância intercelular e ativar células para a síntese de diferentes enzimas degradantes, a fim de auxiliar a entrada das células tumorais no vaso sanguíneo através da MEC. Essa digestão é necessária para que as células cancerígenas invadam e migrem através da lâmina basal, que pode levar ao desenvolvimento de metástases em locais distantes. As proteases que degradam a MEC também desempenham um papel crítico na angiogênese, onde podem atuar como reguladores positivos e negativos da proliferação de células endoteliais e da morfogênese vascular. Novos vasos sanguíneos são vitais para a proliferação do tumor primário e para a formação de uma colônia metastática. As metástases são a principal causa de morte em pacientes com câncer. Portanto, a redução da progressão metastática é o maior desafio no

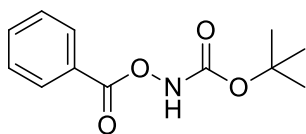
desenvolvimento de terapias anticancerígenas eficazes. Vários tumores demonstraram ter níveis aumentados de proteases em um estágio inicial que agora são indicados como envolvidos em muitos aspectos do câncer, como proliferação, respostas imunes, recrutamento de células inflamatórias, invasão tumoral, angiogênese, metástase, apoptose, transição epitelial para mesenquimal e mobilização de células normais de seus compartimentos teciduais para metástase (Trezza *et al.*, 2020). Sendo assim, inibidores de proteases podem ter a capacidade de reduzir a progressão da doença.

No entanto, o projeto da terapia com inibidores de protease é complicado, uma vez que diferentes tipos de câncer usam diferentes proteases nos estágios flutuantes do desenvolvimento do câncer e nenhum inibidor único pode ser usado em todas as classes de proteases. Por exemplo, há os inibidores de cisteína protease, que desempenham um papel importante no câncer. As cistatinas (inibidores de cisteína proteases) bloqueiam metástases ou invasão de diversos tipos de câncer. O papel principal das cistatinas como inibidores de protease é limitar a atividade extra da cisteína protease liberada pelos lisossomos ou gerada durante a inflamação. Como as cisteínas proteases desempenham papéis importantes no crescimento, desenvolvimento e metástase do tumor, as cistatinas devem mediar o controle desses processos (Eatemadi *et al.*, 2017).

Contudo, existem diversos mecanismos que podem exercer efeitos tumorais, e necessitam de estudos mais específicos para o descobrimento destes mecanismos. Inclusive, a uma mesma molécula pode apresentar mecanismos diferentes em diferentes linhagens de células tumorais.

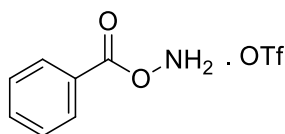
Neste trabalho, os melhores resultados dos análogos de alcaloide testados foram em células K-562. Anteriormente estudou-se o mecanismo de ação da matrina, um alcaloide, em células K-562. O tratamento com matrina resultou numa forte regulação negativa do fósforo-STAT3 tanto nos locais Tyr705 como Ser727 ou na expressão das proteínas fósforo-JAK2 sem efeitos significativos nas proteínas totais STAT3 e JAK2. Além disso, verificou-se que a expressão de Bcl-xL, Cyclin D1, c-Myc estava diminuída tanto ao nível da transcrição como ao nível da proteína nas células K-562 após o tratamento com matrina. O tratamento com matrina também resultou em uma diminuição significativa no nível de expressão de IL-6 em células K562. Observou-se que o tratamento com matrina poderia diminuir a regulação positiva das proteínas STAT3, JAK2, fósforo-STAT3 e fósforo-JAK2 após pré-tratamento com IL-6 em células K-562 (Ma *et al.*, 2015).

4.2.5 Dados Experimentais da Síntese



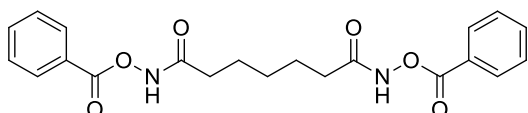
[35]

A uma solução de *N*-Boc-hidroxilamina (1,2 eq.) em DCM foi adicionado TEA (2,0 eq.) à temperatura ambiente sob atmosfera de argônio. Depois de resfriado a 0 °C, cloreto de benzoíla (1,0 eq.) foi adicionado à mistura reacional e agitado à 0 °C por 1 h. Após o consumo do material de partida, adicionou-se à mistura reacional, uma solução aquosa de NaHCO₃ e extraiu-se com DCM (3 vezes). A fase orgânica combinada foi seca com Na₂SO₄. Após a remoção do solvente, o resíduo foi purificado por cromatografia (AcOEt: hexano 1:9) para obter o composto desejado como um sólido branco. Rendimento: 98%. Os dados espectroscópicos encontrados estão de acordo com os valores da literatura. Dados relatados: ¹H NMR (600 MHz, Chloroform-d) δ 8.16 (s, 1H), 8.13 – 8.04 (m, 2H), 7.66 – 7.58 (m, 1H), 7.52 – 7.39 (m, 2H), 1.52 (s, 9H). ¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-d) δ 166.3, 155.7, 134.3, 130.1, 128.8, 127.1, 83.5, 28.2. HRMS (ESI⁺) m/z calculado para [C₁₂H₁₅NNaO₄]⁺: 260.0893, encontrado: 260.0891. PF: 84-86 °C (Jeon *et al.*, 2020).



[36]

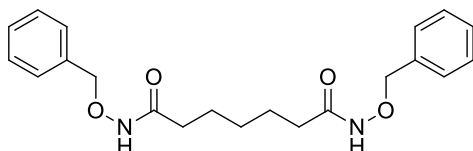
O composto [35] foi dissolvido em éter etílico e, em seguida, o ácido trifílico (1,1 eq.) foi adicionado gota a gota para acidificar e precipitar o produto a 0 °C. A mistura reacional continuou em agitação por 4 h. A mistura foi filtrada e lavada com éter de petróleo (3x) para obter o produto desejado. Rendimento: 92%. Os dados espectroscópicos encontrados estão de acordo com os valores da literatura. Dados relatados: ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 10.41 (s, 3H), 8.04 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.81 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.64 (t, J = 8.0 Hz, 2H). ¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): δ = 163.88, 135.13, 129.62, 129.50, 125.67, 120.87 (q, J = 319.6 Hz). ¹⁹F NMR (DMSO-d₆, 377 MHz): δ = -77.73 ppm (Liu *et al.*, 2017).



[17]

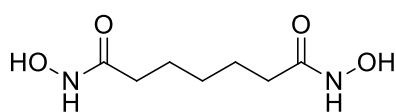
A uma suspensão de ácido pimélico (800 mg, 5,0 mmol), *O*-benzoil-hidroxilamina · TfOH [36] (3,5 g, 12,0 mmol, 2,4 eq.), tetrafluoroborato de *O*-(1*H*-benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametilurônio (TBTU) (3,9 g, 12,0 mmol, 2,4 eq.) em DMF (12 mL) a 0 °C foi adicionado lentamente diisopropiletilamina (DIEA) (3,85 mL, 22,0 mmol, 4,4 eq.). A mistura resultante foi agitada em temperatura ambiente durante a noite. A mistura reacional foi então vertida em HCl 1 M (100 mL) e o produto foi extraído com DCM (4 x 20 mL). O extrato foi lavado consecutivamente com HCl (2 x 50 mL) e solução de NaCl (50 mL).

Após a secagem (Na_2SO_4) e a evaporação do solvente sob pressão reduzida, a amida Weinreb desejada foi obtida como um sólido branco. O composto foi recristalizado em EtOH. Cristais brancos. PF: 176-178 °C. Massa = 1,68 g. Rendimento = 84 %. ^1H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ 11.91 (bs, 2H), 8.02 (d, $J = 7.4$ Hz, 4H), 7.74 (t, $J = 7.4$ Hz, 4H), 7.59 (t, $J = 7.4$ Hz, 4H), 2.22 (t, $J = 7.2$ Hz, 4H), 1.67-1.53 (m, 4H), 1.44-1.31 (m, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6): δ 170.1, 164.3, 134.4, 129.5, 129.2, 127.0, 31.8, 28.0, 24.6.



[37]

Em uma suspensão de ácido pimélico (2,67 g, 16,7 mmol), cloridrato de *O*-benzililhidroxilamina, (6,4 g, 40,2 mmol, 2,4 eq.), *O*-(1*H*-benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametilurônio tetrafluoroborato (TBTU) (12,9 g, 40,2 mmol, 2,4 eq.) em DMF (40 mL) a 0 °C foi lentamente adicionado diisopropiletilamina (DIEA) (12,8 mL, 73,7 mmol, 4,4 eq.). A mistura resultante foi agitada à temperatura ambiente durante a noite. A mistura de reação foi então vertida em HCl 1 M (150 mL) e o produto foi extraído com AcOEt (4 x 50 mL). A fase orgânica foi lavada consecutivamente com HCl (2 x 150 mL), solução aquosa de NaHCO_3 (150 mL) e solução saturada de NaCl. Após secagem (Na_2SO_4) e evaporação do solvente sob pressão reduzida, a amida de Weinreb desejada foi obtida como um sólido branco. O composto foi recristalizado em EtOH. Massa = 4 g, rendimento = 65 %. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.40-7.30 (m, 10H), 4.90 (bs, 4H), 2.12-2.00 (m, 4H), 1.67-1.52 (m, 4H), 1.36-1.26 (m, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 171.0, 135.5, 129.3, 128.8, 128.7, 78.2, 32.7, 28.2, 24.7; HRMS (ESI, m/z): Calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}$: 393.1785, encontrado $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 393.1786.



[33]

Em um balão equipado com agitador magnético adicionou-se o substrato [37] (1,0 g, 2,7 mmol) em metanol (50 mL). Foi adicionado Pd/C a 10 % (125 mg, 0,117 mmol, 0,05 eq) e a suspensão foi agitada sob H_2 (1 atm) à temperatura ambiente durante 4 h. A mistura reacional foi filtrada através de um tampão de Celite e o filtrado foi concentrado sob pressão reduzida. Obteve-se quantitativamente um sólido branco ($m = 530$ mg): p.f. = 170-172 °C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ 10.32 (bs, 2H), 8.65 (bs, 2H), 1.95-1.90 (m, 4H), 1.50-1.40 (m, 4H), 1.24-1.16 (m, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6): δ 169.3, 32.2, 28.2, 25.0; HRMS (ESI, m/z): Calculado para $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4\text{K}$: 229.0585, encontrado $[\text{M}^+\text{K}]^+$: 229.0584.

5 CONCLUSÃO GERAL

O presente trabalho contou com dois principais objetivos acerca do estudo da espécie *Allamanda cathartica*: avaliar o perfil fitoquímico, a atividade biopesticida e biológica dos extratos etanólicos e sintetizar derivados de alcaloides da espécie.

Enquanto análise fitoquímica, os extratos de *A. cathartica* apresentam ser ricos em compostos fenólicos e flavonoides, assim como apresentam quantidade representativa de alcaloides totais e uma pequena quantidade de taninos. Os compostos mais representativos identificados por CLAE foram o kaempferol, a quercetina-3- β -glicosídeo e a rutina. Novos compostos em menores quantidades também foram identificados, como a apigenina e a pinocembrina. Por CG/MS, os compostos mais identificados foram os ácidos graxos e os ésteres etílicos de ácido graxo. A capacidade antioxidante dos extratos é alta, principalmente das folhas e flores, que está relacionada com a quantidade de compostos fenólicos presentes.

Em altas concentrações (> 500 mg/L), os extratos podem ser tóxicos para o microcustráceo *Daphnia magna*. Em nível citotóxico, os extratos se apresentam seguros, com necessidade de altas concentrações (> 800 μ g/mL para flores e folhas e > 500 μ g/mL para galhos) para causar dano a células saudáveis (Vero). Em células tumorais, os extratos das flores (em K-562, HeLa, SiHa) e folhas (em K-562, MCF-7, HeLa, SiHa), apresentaram bons resultados. Em relação a atividade biopesticida, os extratos na concentração de 10 mg/mL não foram capazes de gerar resultados antifúngicos em *Botrytis cinerea*.

A rota proposta para a síntese do alcaloide do tipo *Allamanda* foi eficiente e com bons rendimentos, proporcionando a síntese da molécula [17] de forma inédita. A rota proposta para a síntese dos análogos de alcaloide também foi eficiente para produzir dois análogos, com bons rendimentos. A avaliação *in silico* das propriedades físico-químicas sugere que todos os compostos sintetizados apresentam boa predição de perfil de biodisponibilidade oral. Os compostos [37] e [17], apresentaram fragmentos potencialmente mutagênicos e tumorigênicos na avaliação *in silico*. O composto [33] não apresentou fragmentos toxicológicos *in silico*. Na avaliação citotóxica, os análogos de alcaloide [37] e [33], se apresentaram tóxicos em células saudáveis, mais em células tumorais K-562 e SiHa, apresentaram boa atividade citotóxica com bons índices de seletividade, devido à baixa concentração necessária para atuar nas células tumorais. Como perspectiva futura, estes análogos e o alcaloide sintetizado serão testados frente a atividade pesticida contra *B. cinerea*.

REFERÊNCIAS

- ABNT. **ABNT NBR 12713:2016. Ecotoxicologia aquática -Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera).** Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2016.
- ADAMA. **CAPTAN SC.** Londrina/: ADAMA BRASIL S/A 2020.
- AGAMI, C.; COUTY, F. The reactivity of the N-Boc protecting group: an underrated feature. **Tetrahedron**, v. 58, n. 14, p. 2701-2724, 2002.
- AIT-BALI, Y. *et al.* Pre-and postnatal exposure to glyphosate-based herbicide causes behavioral and cognitive impairments in adult mice: Evidence of cortical ad hippocampal dysfunction. **Archives of toxicology**, v. 94, p. 1703-1723, 2020.
- AIT BALI, Y.; BA-MHAMED, S.; BENNIS, M. Behavioral and immunohistochemical study of the effects of subchronic and chronic exposure to glyphosate in mice. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 11, p. 146, 2017.
- ALMEIDA, S. A. d. **Utilização dos Extratos de *Stryphnodendron adstringens* e *Allamanda cathartica* L. no Controle Fitopatogênico.** 2016. (Bacharel em Engenharia Ambiental) - Engenharia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão.
- ANADÓN, A. *et al.* Poisonous Plants of the Europe. *In*: GUPTA, R. C. (Ed.). **Veterinary Toxicology**. 3 ed.: Academic Press, 2018. p. 891-909.
- ANVISA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos Em Alimentos - Relatório das Análises de Amostras Monitoradas no Período de 2013 a 2015.** Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2016.
- ANVISA. **Anvisa aprova novo marco regulatório para agrotóxicos.** Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019a. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/pt_BR/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/anvisa-aprova-novo-marco-regulatorio-para-agrotoxicos/219201/pop_up?inheritRedirect=false&redirect=http%3A%2F%2Fantigo.anvisa.gov.br%2Fpt_BR%2Fnoticias%3Fp_p_id%3D101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU%26p_p_lifecycle%3D0%26p_p_state%3Dpop_up%26p_p_mode%3Dview%26p_r_p_564233524_tag%3Dagrot%25C3%25B3xicos. Acesso em: 31 jan. 2023.
- ANVISA. **Programa de Análises de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – Relatório das amostras analisadas no período de 2017-2018.** Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019b. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos/arquivos/3770json-file-1>. Acesso em: 09 mar. 2023.
- ANVISA. **Monografia de agrotóxicos autorizadas.** Brasília: Ministério da Saúde, 2022a. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas-por-letra>. Acesso em: 03 fev. 2023.

ANVISA. **Publicada reclassificação toxicológica de agrotóxicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2022b. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2019/publicada-reclassificacao-toxicologica-de-agrotoxicos>. Acesso em: 31 jan. 2023.

ANVISA. **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos**: Relatório dos resultados das análises de amostras monitoradas nos ciclos 2018-2019 e 2022. Brasília: Ministério da Saúde, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos/arquivos/relatorio-2018-2019-2022>. Acesso em: 15 dez. 2023.

APARICIO, V.; GERÓNIMO, E. d. Pesticide pollution in argentine drinking water: A call to ensure safe access. **Environmental Challenges**, v. 14, n. 100808, 2024.

APFEL, C. *et al.* Hydroxamic Acid Derivatives as Potent Peptide Deformylase Inhibitors and Antibacterial Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 12, p. 2324-2331, 2000.

ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. d. A.; GONSALVES, A. Acetilcolinesterase-AChE: uma enzima de interesse farmacológico. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 1818-1834, 2016.

BANASIK, M.; STEDEFORD, T. Plants, Poisonous (Humans). *In*: WEXLER, P. (Ed.). **Encyclopedia of Toxicology**. 3 ed.. Oxford: Academic Press, 2014. p. 970-978.

BARONAS, R. L. Agrotóxico versus pesticida: notas de leitura sobre polêmica e amemória discursiva. **Bakhtiniana: Revista de Estudos do Discurso**, v. 14, p. 62-87, 2019.

BARR, A. C. Household and Garden Plants. *In*: PETERSON, M. E. e TALCOTT, P. A. (Ed.). **Small Animal Toxicology**. 3 ed. Saint Louis: W.B. Saunders, 2013. p. 357-400.

BHATT, P. *et al.* Characterization of the role of esterases in the biodegradation of organophosphate, carbamate, and pyrethroid pesticides. **Journal of Hazardous Materials**, v. 411, n. 125026, 2021.

BOMBARDI, L. M. **Geografia do Uso de Agrotóxicos no Brasil e Conexões com a União Europeia**. São Paulo: FFLCH USP, 2017.

BONOMINI, T. J. *et al.* Neuropharmacological and acute toxicological evaluation of ethanolic extract of *Allamanda cathartica* L. flowers and plumieride. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 91, p. 9-19, 2017.

BOROSKI, M. *et al.* **Antioxidantes Princípios e Métodos Analíticos**. Curitiba: Appris, 2015. 137 p.

BRASIL. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Portaria Normativa nº 84, de 15 de outubro de 1996**. Estabelece procedimentos a serem adotados junto ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, para efeito de registro e avaliação do potencial de periculosidade ambiental - (PPA) de agrotóxicos, seus componentes e afins. Brasília, DF: IBAMA, 1996. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/sophia/cnia/legislacao/IBAMA/PT0084-151096.pdf>. Acesso em: 31 jan. 2023.

BRASIL. Presidência da República. **Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002**. Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Brasília, DF: Presidência da República, 2002. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm. Acesso em: 31 jan. 2023.

BRASIL. Conselho Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional. **Lei nº 11.346, de 15 de setembro de 2006**. Cria o Sistema Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional. SISAN com vistas em assegurar o direito humano à alimentação adequada e dá outras providências. Brasília, DF: Casa Civil, 2006. Disponível em: <http://www4.planalto.gov.br/consea/conferencia/documentos/lei-de-seguranca-alimentar-e-nutricional>. Acesso em: 19 jan. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. **RDC nº 26, de 13 de maio de 2014**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2014. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf. Acesso em: 26 jan. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Diretrizes brasileiras para o diagnóstico e tratamento de intoxicações agudas por agrotóxicos**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2020. Disponível em: https://renastonline.ensp.fiocruz.br/sites/default/files/arquivos/recursos/intoxicacoes_agudas_agrotoxicos_11_2020_isbn.pdf. Acesso em: 19 jan. 2023.

BRASIL. **Flora e Funga do Brasil: *Allamanda cathartica* L.** Rio de Janeiro: Jardim Botânico, 2023. Disponível em: https://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/BemVindoConsultaPublicaConsultar.do?invalidatePageControlCounter=2&idsFilhosAlgas=%5B2%5D&idsFilhosFungos=%5B1%2C11%2C10%5D&lingua=&grupo=6&familia=null&genero=&especie=&autor=&nomeVernaculo=&nomeCompleto=Apocynaceae+Allamanda+cathartica+L.&formaVida=null&substrato=null&ocorreBrasil=QUALQUER&ocorrencia=OCORRE&endemismo=TOCOS&origem=TOCOS®iao=QUALQUER&estado=QUALQUER&ilhaOceanica=32767&domFitogeograficos=QUALQUER&bacia=QUALQUER&vegetacao=TOCOS&mostrarAte=SUBESP_VAR&opcoesBusca=TOCOS_OS_NOMES&loginUsuario=Visitante&senhaUsuario=&contexto=consulta-publica. Acesso: 24 de Janeiro de 2023.

BRASIL, F. Q. D. **Malathion 1000 EC**: Concentrado Emulsionável. Campinas, SP: FMC QUIMICA DO BRASIL LTDA 2021.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12 ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.

CABRAL, I. K. **Avaliação de Extrato Etanólico de *Urochloa ruziziensis* no Cultivo da Soja**. 2021. (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente.

CARNEIRO, F. F. *et al.* **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde.** São Paulo: Expressão Popular, 2015.

CASANOVA, L. M.; COSTA, S. S. Interações sinérgicas em produtos naturais: potencial terapêutico e desafios. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 2, p. 575-595, 2017.

CATAS. *Allamanda cathartica* extract and application thereof in preparing pesticide. CN101669526A. Depósito: 09 out. 2009.

CHAN, E. W. C.; WONG, S. K.; CHAN, H. T. Apocynaceae species with antiproliferative and/or antiplasmodial properties: a review of ten genera. **Journal of Integrative Medicine**, v. 14, n. 4, p. 269-284, 2016.

CHANG, C.-C. *et al.* Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food Drug Analysis**, v. 10, n. 3, 2002.

CHEDEA, V. S.; POP, R. M. Total Polyphenols Content and Antioxidant DPPH Assays on Biological Samples. *In*: WATSON, R. R. (Ed.). **Polyphenols in Plants**. 2 ed. Massachusetts: Academic Press, 2019. p. 169-183.

CHEN, T. *et al.* *Botrytis cinerea*. **Current Biology**, v. 33, n. 11, p. R460-R462, 2023.

CHEN, X. *et al.* Reactive oxygen species induced by icaritin promote DNA strand breaks and apoptosis in human cervical cancer cells. **Oncology Reports**, v. 41, n. 2, p. 765-778, 2019.

CIATOX/SC. **Relatório Anual 2022 do Centro de Informação e Assistência Toxicológica de Santa Catarina.** Florianópolis: HU/UFSC, 2023. 64 p. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/249263>. Acesso em: 30 out. 2023.

CIMMINO, A. *et al.* Phytotoxic metabolites produced by *Diaporthe cryptica*, the causal agent of hazelnut branch canker. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 66, n. 13, p. 3435-3442, 2018.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. **Organic Chemistry**. 2 ed. Oxford: Oxford University Press, 2012.

COELHO, H. *et al.* Antioxidant and antimicrobial potential of phenolic compounds extracted from leaves and flowers of *Allamanda cathartica* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 3, p. 650-656, 2016.

CORRÊA, P. G. *et al.* Chemical and nutritional characterization of *Ambelania duckei* (Apocynaceae) an unexplored fruit from the Amazon region. **Food Research International**, v. 163, n. 112290, 2023.

CROPChem. **Panga 900WG Grânulos Dispersíveis em água.** CROPChem LTDA: Porto Alegre - RS, 2019.

DALLEGRAVE, A. **Inseticidas Piretróides: Do Desenvolvimento Analítico ao Nível de Resíduos em Alimentos de Origem Animal.** 2017. (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

DATASUS. **Intoxicação Exógena - Notificações Registradas no Sinan Net - Brasil**. Brasília: Sistema de Informação de Agravos de Notificação, 2023. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defptohtm.exe?sinanet/cnv/Intoxbr.def>. Acesso em: 15 dez. 2023.

DI LECCE, R. *et al.* Biochemical Analyses of Bioactive Extracts from Plants Native to Lampedusa, Sicily Minor Island. **Plants**, v. 11, n. 24, p. 3447, 2022.

DIKE, I. P.; OBEMBE, O. O.; ADEBIYI, F. E. Ethnobotanical survey for potential anti-malarial plants in south-western Nigeria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 3, p. 618-626, 2012.

DINESH, D. S. *et al.* The potentiality of botanicals and their products as an alternative to chemical insecticides to sandflies (Diptera: Psychodidae): A review. **Journal of vector borne diseases**, v. 51, n. 1, p. 1, 2014.

EATEMADI, A. *et al.* Role of protease and protease inhibitors in cancer pathogenesis and treatment. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 86, p. 221-231, 2017.

EGBUNA, C. *et al.* Phytochemicals and bioactive compounds effective against acute myeloid leukemia: A systematic review. **Food Science & Nutrition**, v. 11, n. 7, p. 4191-4210, 2023.

ENTWISTLE, I. D.; WOOD, W. W. Hydrogenolysis of Allyl and Benzyl Halides and Related Compounds. *In*: TROST, B. M. e FLEMING, I. (Ed.). **Comprehensive Organic Synthesis**. Oxford: Pergamon, 1991. p. 955-981.

EPA. **What are Biopesticides?** Washington: Environmental Protection Agency., 2022. Disponível em: <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/what-are-biopesticides#classes>. Acesso em: 08 fev. 2023.

FAGUNDES, P. M. **Aplicação dos princípios do RISK21 na avaliação do risco de inseticidas da classe dos piretróides**. 2021. (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia), Universidade de São Paulo, São Paulo.

FAO. **Pesticides use, pesticides trade and pesticides indicators**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2022. 13 p. Disponível em: <https://www.fao.org/3/cc0918en/cc0918en.pdf>. Acesso em: 03 fev. 2023.

FERLAY, J. *et al.* **Global Cancer Observatory: Cancer Today**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2024. Disponível em: <https://gco.iarc.who.int/today/en>. Acesso em: 01 mar. 2024.

FEULEFACK, J. *et al.* Parental Pesticide Exposure and Childhood Brain Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis Confirming the IARC/WHO Monographs on Some Organophosphate Insecticides and Herbicides. **Children**, v. 8, n. 12, 2021.

FLOEGEL, A. *et al.* Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 7, p. 1043-1048, 2011.

GAHUKAR, R. T. Evaluation of plant-derived products against pests and diseases of medicinal plants: A review. **Crop Protection**, v. 42, p. 202-209, 2012.

GARCÍA, S. V. *et al.* Evaluación preliminar de la actividad antiviral del extracto acuoso de *Phyllanthus orbicularis* frente al virus VHS-1. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 55, p. 169-173, 2003.

GATTO, N. M.; OGATA, P.; LYTLE, B. Farming, Pesticides, and Brain Cancer: A 20-Year Updated Systematic Literature Review and Meta-Analysis. **Cancers**, v. 13, n. 17, 2021.

GEIER, D. A.; GEIER, M. R. Urine glyphosate exposure and serum sex hormone disruption within the 2013–2014 National Health and Nutrition Examination survey (NHANES). **Chemosphere**, v. 316, p. 137796, 2023.

GONZAGA, C. W. P.; BALDO, M. P.; CALDEIRA, A. P. Exposição a agrotóxicos ou práticas agroecológicas: ideia suicida entre camponeses do semiárido no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 26, p. 4243-4252, 2021.

GOUAULT, N. *et al.* Synthesis of Substituted Pyrrolin-4-ones from Amino Acids in Mild Conditions via a Gold-Catalyzed Approach. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 74, n. 15, p. 5614-5617, 2009.

GRILLO, R. *et al.* Ecotoxicological and regulatory aspects of environmental sustainability of nanopesticides. **Journal of Hazardous Materials**, v. 404, n. 124148, 2021.

GUPTA, R. S. *et al.* Effects of Plumieride, an iridoid on spermatogenesis in male albino rats. **Phytomedicine**, v. 11, n. 2, p. 169-174, 2004.

GURGEL, A. M.; GUEDES, C. A.; FRIEDRICH, K. Flexibilização da regulação de agrotóxicos enquanto oportunidade para a (necro) política brasileira: avanços do agronegócio e retrocessos para a saúde e o ambiente. **Desenvolvimento e Meio ambiente**, v. 57, 2021.

HAMEED, A.; NAWAZ, G.; GULZAR, T. Chemical composition, antioxidant activities and protein profiling of different parts of *Allamanda cathartica*. **Natural Product Research**, v. 28, n. 22, p. 2066-2071, 2014.

HERNÁNDEZ, A. F. *et al.* Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: Their relevance to human health. **Toxicology**, v. 307, p. 136-145, 2013.

HESS, S. C.; NODARI, R. O.; LOPES-FERREIRA, M. Agrotóxicos: críticas à regulação que permite o envenenamento do país. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, v. 57, 2021.

HUI, Z. *et al.* Discovery of plant-derived anti-tumor natural products: Potential leads for anti-tumor drug discovery. **Bioorganic Chemistry**, v. 142, p. 1-28, 2024.

HUSAIN, A. *et al.* Synthesis, molecular properties, toxicity and biological evaluation of some new substituted imidazolidine derivatives in search of potent anti-inflammatory agents. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 1, p. 104-114, 2016.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Certificado de registro 2,4-D**. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, 2017. Disponível em: http://ibama.gov.br/phocadownload/agrotoxicos/agrotoxicos-de-uso-nao-agricola/registrados/2017/2017-09-05-troller_na.pdf. Acesso em: 07 fev. 2023.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Certificado de registro Glifosato**. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, 2021. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/phocadownload/agrotoxicos/agrotoxicos-de-uso-nao-agricola/registrados/2021/2021-07-08-Glifosato-Fersol-480-NA.pdf>. Acesso em: 03 fev. 2023.

IBAMA. **Avaliação ambiental para registro de agrotóxicos, seus componentes e afins de uso agrícola**. Brasília, DF: Ministério do Meio, 2022a. Disponível em: <https://www.gov.br/ibama/pt-br/servicos/avaliacao-e-destinacao/quimicos-e-biologicos/avaliacao-ambiental-para-registro-de-agrotoxicos-seus-componentes-e-afins-de-uso-agricola#:~:text=Classe%20I%20%2D%20Produto%20ALTAMENTE%20PERIGOSO,POUCO%20PERIGOSO%20ao%20meio%20ambiente>. Acesso: 31 jan. 2023.

IBAMA. **Painéis de informações de agrotóxicos**. Brasília: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2022b. Disponível em: <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/paineis-de-informacoes-de-agrotoxicos/paineis-de-informacoes-de-agrotoxicos#Painel-comercializacao>. Acesso: 19 de Janeiro de 2023.

INCA. **Agrotóxico**. Brasília: Instituto Nacional do Câncer, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/causas-e-prevencao-do-cancer/exposicao-no-trabalho-e-no-ambiente/agrotoxico>. Acesso: 08 de Março de 2023.

INTHI, P. *et al.* Anti-cancer Effect and Active Phytochemicals of *Houttuynia cordata* Thunb. against Human Breast Cancer Cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 24, n. 4, p. 1265-1274, 2023.

JEON, J. *et al.* NiH-Catalyzed Proximal-Selective Hydroamination of Unactivated Alkenes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 142, n. 48, p. 20470-20480, 2020.

JOSELIN, J. *et al.* Screening of select ornamental flowers of the family Apocynaceae for phytochemical constituents. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, n. 1, p. S260-S264, 2012.

KHURSHEED, A. *et al.* Plant based natural products as potential ecofriendly and safer biopesticides: A comprehensive overview of their advantages over conventional pesticides, limitations and regulatory aspects. **Microbial Pathogenesis**, v. 173, p. 105854, 2022.

KING, A. M.; AARON, C. K. Organophosphate and Carbamate Poisoning. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 133-151, 2015.

KLEIN, M. d. O. *et al.* Detection of anti-cancer drugs and metabolites in the effluents from a large Brazilian cancer hospital and an evaluation of ecotoxicology. **Environmental Pollution**, v. 268, p. 115857, 2021.

KNIGHT, E. R. *et al.* Spatial and temporal trends of 64 pesticides and their removal from Australian wastewater. **Science of The Total Environment**, v. 905, p. 166816, 2023.

KOGAN, M. Integrated pest management: historical perspectives and contemporary developments. **Annual review of entomology**, v. 43, n. 1, p. 243-270, 1998.

KOKKRUA, S. *et al.* Efficacy of berberine in controlling foliar rice diseases. **European Journal of Plant Pathology**, v. 156, p. 147-158, 2020.

KUPCHAN, S. M. *et al.* Isolation and structural elucidation of allamandin, an antileukemic iridoid lactone from *Allamanda cathartica*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 39, n. 17, p. 2477-2482, 1974.

KÜRTI, L.; CZAKÓ, B. **Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis**. London: Elsevier Academic Press, 2005.

KUSKOSKI, E. M. *et al.* Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Food Science and Technology**, v. 25, 2005.

LAITANO, K. d. S.; MATIAS, W. Testes de toxicidade com *Daphnia magna*: uma ferramenta para avaliação de um reator experimental UASB. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 1, n. 1, p. 43-47, 2006.

LI, A.-N. *et al.* Total phenolic contents and antioxidant capacities of 51 edible and wild flowers. **Journal of Functional Foods**, v. 6, p. 319-330, 2014.

LIPINSKI, C. A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1, p. 3-26, 2001.

LIU, J. *et al.* Fe-Catalyzed Amination of (Hetero)Arenes with a Redox-Active Aminating Reagent under Mild Conditions. **Chemistry**, v. 23, n. 3, p. 563-567, 2017.

LU, J. *et al.* Characterization of glyphosate-induced cardiovascular toxicity and apoptosis in zebrafish. **Science of The Total Environment**, v. 851, n. 158308, 2022.

LUSTRINO, D. *et al.* *Allamanda cathartica* L. (Apocynaceae) seeds induces changes on carbohydrates deposits of *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821)(Mollusca, Bradybaenidae). **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 10, n. 1, 2008.

MA, L. *et al.* Growth inhibition effect of matrine on K562 cells mediated by IL-6/JAK/STAT3 signaling pathway. **Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi**, v. 36, n. 5, p. 422-426, 2015.

MALANDRAKIS, A. A. *et al.* Fungicide resistance frequencies of *Botrytis cinerea* greenhouse isolates and molecular detection of a novel SDHI resistance mutation. **Pesticide Biochemistry Physiology**, v. 183, n. 105058, p. 1-11, 2022.

MANNAN, M. *et al.* In vitro antioxidant, antimicrobial, insecticidal and cytotoxic activities of the medicinal plants: *Allamanda cathartica* and *Mimusops elengi*. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 20, n. 4, p. 1-12, 2017.

MAO, Y. *et al.* Genetic variation of drug target CYP51 conferring resistance to ergosterol biosynthesis inhibitors in *Botrytis cinerea*, causing lily gray mould. **Industrial Crops and Products**, v. 208, p. 117797, 2024.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Hierarquização de pragas de maior risco fitossanitário do Brasil**. Brasília, DF: MAPA, 2022. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/mapa-divulga-lista-com-hierarquizacao-de-pragas-de-maior-risco-fitossanitario/1NotaTcnica_Hierarquizaodepragasdemaiorriscofitossanitario_.pdf. Acesso em: 10 fev. 2023.

MARATHE, K. R. *et al.* Protease Inhibitors and Their Applications: An Overview. In: ATTA UR, R. (Ed.). **Studies in Natural Products Chemistry**: Elsevier, 2019. v. 62, p. 211-242.

MAREČEK, V. *et al.* ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt. **Journal of Cereal Science**, v. 73, p. 40-45, 2017.

MELANDA, V. S. *et al.* Impact of Pesticides on Cancer and Congenital Malformation: A Systematic Review. **Toxics**, v. 10, n. 11, 2022.

MOLINSPIRATION. **Molinspiration Cheminformatics**. Slovak Republic: Molinspiration Cheminformatics, 2023. Disponível em: <https://www.molinspiration.com/>. Acesso: 16 de dez. 2023.

MONE, M. *et al.* Plumieride from *Allamanda cathartica* as an inhibitory compound to plant pathogenic fungi. **Archives of Phytopathology Plant Protection**, v. 47, n. 11, p. 1311-1326, 2014.

MORA, A. M. *et al.* Pesticide exposure and cortical brain activation among farmworkers in Costa Rica. **NeuroToxicology**, v. 93, p. 200-210, 2022.

MORAES, R. F. d. **Agrotóxicos no Brasil: padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória**. Rio de Janeiro: Ipea, 2019.

MORANDI, M. A. B.; MAFFIA, L. A. **Manejo integrado de mofo cinzento, causado por *Botrytis cinerea***. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2005. 35 p.

MÜNZE, R. *et al.* Pesticides from wastewater treatment plant effluents affect invertebrate communities. **Science of The Total Environment**, v. 599-600, p. 387-399, 2017/12/01/ 2017.

NAKAJIMA, M.; AKUTSU, K. Virulence factors of *Botrytis cinerea*. **Journal of General Plant Pathology**, v. 80, p. 15-23, 2014.

NASCIMENTO, C. A. A. d. *et al.* Efeito do extrato aquoso de folhas de *Allamanda cathartica* L. (Apocynaceae) sobre *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821)(Mollusca, Bradybaenidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zootecias**, v. 8, n. 1, 2006.

NAYAK, S. *et al.* Evaluation of wound healing activity of *Allamanda cathartica* L. and *Laurus nobilis* L. extracts on rats. **BMC Complementary Alternative Medicine**, v. 6, n. 1, p. 1-6, 2006.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020.

NIU, X. *et al.* Antifungal activity of ginsenoside CK against *Botrytis cinerea* by targeting sterol 14 α -demethylase cytochrome P450 (CYP51) and the application on cherry tomato preservation. **Postharvest Biology and Technology**, v. 199, p. 112294, 2023.

NORTOX. **2,4-D Concentrado Solúvel**. Arapongas, PR: NORTOX S/A 2019.

NORTOX. **Acefato Pó solúvel em água**. NORTOX S/A. Arapongas, PR 2020a.

NORTOX. **Mancozeb Grânulos dispersíveis em água**. Arapongas, PR: NORTOX S/A 2020b.

NORTOX. **Cletodim Concentrado Emulsionável**. NORTOX S/A. Arapongas, PR 2021a.

NORTOX. **Clorotalonil Suspensão Concentrada**. NORTOX S/A. Arapongas, PR 2021b.

NUR, A. K. *et al.* Screening for Antifungal Activity of *Allamanda cathartica* Stem Crude Extracts Against *Pyricularia oryzae*, Causal Agent of Rice Blast Disease. **Transactions of the Malaysian Society of Plant Physiology**, v. 26, p. 215-221, 2019.

ONU BRASIL. Organização das Nações Unidas no Brasil. **Os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável no Brasil: Fome zero e agricultura sustentável**. Brasília: ONU, 2023. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs/2>. Acesso em: 09 mar. 2023.

OTERO, R. *et al.* Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia: Part I: Traditional use of plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 3, p. 493-504, 2000.

PATRICK, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 5 ed. Reino Unido: Oxford University Press, 2013.

PANIS, C. *et al.* Widespread pesticide contamination of drinking water and impact on cancer risk in Brazil. **Environment International**, v. 165, n. 107321, 2022.

PAVAN, F. A. *et al.* Morphological, behavioral and genotoxic effects of glyphosate and 2,4-D mixture in tadpoles of two native species of South American amphibians. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 85, n. 103637, 2021.

PERES, F. M., J. C. **É veneno ou é remédio?: grotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2003.

PERTERRA. **Sulphur 800 WG: Grânulos Dispersíveis Água**. São Paulo, SP: Perterra, 2021.

PETRONILHO, E. C.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Agentes para Defesa Contra Guerra Química: Reativadores da Acetilcolinesterase Inibida com Organofosforados Neurotóxicos. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 3, p. 671-686, 2014.

POMPERMAIER, A. *et al.* Impaired initial development and behavior in zebrafish exposed to environmentally relevant concentrations of widely used pesticides. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 257, n. 109328, 2022.

PRABHADEVI, V. *et al.* Phytochemical studies on *Allamanda cathartica* L. using GC–MS. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 2, p. S550-S554, 2012.

QUISPE, A. M. *et al.* Efecto citotóxico selectivo *in vitro* de muricin H (acetogenina de *Annona muricata*) en cultivos celulares de cáncer de pulmón. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica**, v. 23, p. 265-269, 2006.

RADHAKRISHNAN, B.; PRABHAKARAN, P. Biocidal activity of certain indigenous plant extracts against red spider mite, *Oligonychus coffeae* (Nietner) infesting tea. **Journal of Biopesticides**, v. 7, n. 1, p. 29, 2014.

RICARDO, L. M. *et al.* Plants from the Brazilian Traditional Medicine: species from the books of the Polish physician Piotr Czerniewicz (Pedro Luiz Napoleão Chernoviz, 1812–1881). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 3, p. 388-400, 2017.

RODRIGUES, D. W. *et al.* Chemical variability of *Allamanda cathartica* L. flowers assessed by multivariate data analysis. **Química Nova**, v. 43, p. 201-205, 2020.

ROMANAZZI, G.; FELIZIANI, E. *Botrytis cinerea* (Gray Mold). In: BAUTISTA-BAÑOS, S. (Ed.). **Postharvest Decay**: Academic Press, 2014. p. 131-146.

SAMOISY, A. K.; MAHOMOODALLY, F. Ethnopharmacological appraisal of culturally important medicinal plants and polyherbal formulas used against communicable diseases in Rodrigues Island. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, p. 803-818, 2016.

SAMOISY, Anne K.; MAHOMOODALLY, M. F. Ethnopharmacological analysis of medicinal plants used against non-communicable diseases in Rodrigues Island, Indian Ocean. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 20-38, 2015.

SANTOS, A. V. d. Considerações linguísticas sobre as propostas de substituição do termo agrotóxico na legislação brasileira. **Panace**, v. 21, n. 52, p. 107-118, 2020.

SARKAR, R. D.; KALITA, M. C. Se nanoparticles stabilized with *Allamanda cathartica* L. flower extract inhibited phytopathogens and promoted mustard growth under salt stress. **Heliyon**, v. 8, n. 3, 2022.

SARKER, R. *et al.* In vitro antioxidant, total phenolic, membrane stabilizing and antimicrobial activity of *Allamanda cathartica* L.: A medicinal plant of Bangladesh. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 8, n. 1, p. 63-67, 2014.

SHAMSA, F. *et al.* Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. **The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 32, n. 1, p. 17-20, 2008.

SHARMA, A. *et al.* Global trends in pesticides: A looming threat and viable alternatives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 201, p. 110812, 2020.

SHINOHARA, N. K. S. *et al.* Insegurança alimentar no uso indiscriminado de agrotóxicos. **Higiene Alimentar**, p. 17-21, 2017.

SHUKLA, R. *et al.* Antifungal, aflatoxin inhibitory and free radical-scavenging activities of some medicinal plants extracts. **Journal of Food Quality**, v. 35, n. 3, p. 182-189, 2012.

SIDDIQUI, J. A. *et al.* Phytochemicals for breast cancer therapy: current status and future implications. **Current Cancer Drug Targets**, v. 15, n. 2, p. 116-135, 2015.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SINGH, A. K. *et al.* Antifungal activity of securinine against some plant pathogenic fungi. **Mycobiology**, v. 36, n. 2, p. 99-101, 2008.

SMERIGLIO, A. *et al.* Polyphenolic profile and biological activities of black carrot crude extract (*Daucus carota* L. ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.). **Fitoterapia**, v. 124, p. 49-57, 2018.

SMITH, G. V.; NOTHEISZ, F. Hydrogenolysis. *In*: SMITH, G. V. e NOTHEISZ, F. (Ed.). **Heterogeneous Catalysis in Organic Chemistry**. San Diego: Academic Press, 1999. p. 119-218.

SPORLEDER, M.; LACEY, L. A. Biopesticides. *In*: ALYOKHIN, A. V., C.; GIORDANENGO, P (Ed.). **Insect Pests of Potato**. Cambridge: Academic Press, 2013. p. 463-497.

SUNG, H. *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 71, p. 209-249, 2021.

SUKUMAR, D. S. D. Isolation and Phytochemical Studies of Quercetin and Quercetin 3-O-Rhamnoside. **International Journal of Pharma Bio Sciences**, v. 4, p. 519-524, 2013.

SYNGENTA. **Dual gold Concentrado Emulsionável**. São Paulo, SP: Syngenta Proteção de Cultivos Ltda 2022.

TAIWO, A. M. A review of environmental and health effects of organochlorine pesticide residues in Africa. **Chemosphere**, v. 220, p. 1126-1140, 2019.

TAREAU, M. A.; PALISSE, M.; ODONNE, G. As vivid as a weed... Medicinal and cosmetic plant uses amongst the urban youth in French Guiana. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 203, p. 200-213, 2017.

TARIQ, M. *et al.* Pharmacological investigations and Petra/Osiris/Molinspiration (POM) analyses of newly synthesized potentially bioactive organotin(IV) carboxylates. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 158, p. 174-183, 2016.

TIWARI, T. N.; PANDEY, V. B.; DUBEY, N. K. Plumieride from *Allamanda cathartica* as an antidermatophytic agent. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 4, p. 393-394, 2002.

TOMA, W. *et al.* Safflower oil: an integrated assessment of phytochemistry, antiulcerogenic activity, and rodent and environmental toxicity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 5, p. 538-544, 2014.

TRAMONTIN, D. P. **Extração de compostos bioativos de sementes de *Artocarpus heterophyllus*: experimentação e modelagem matemática**. 2020. (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

TRAMONTIN, D. P. *et al.* Biological activity and chemical profile of Brazilian jackfruit seed extracts obtained by supercritical CO₂ and low pressure techniques. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 152, n. 104551, 2019.

TREZZA, A. *et al.* Potential roles of protease inhibitors in anticancer therapy. In: GUPTA, S. P. (Ed.). **Cancer-Leading Proteases**: Academic Press, 2020. p. 13-49.

UMDALE, S. *et al.* Phytochemical composition, and antioxidant potential of *Frerea indica* Dalz.: A critically endangered, endemic and monotypic genus of the Western Ghats of India. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 35, n. 102080, 2021.

VÁSQUEZ, J. *et al.* Snakebites and ethnobotany in the Eastern region of Antioquia, Colombia - The traditional use of plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, n. 2, p. 449-455, 2013.

VUCKOVIC, D. *et al.* Pharmaceuticals, pesticides, and ultraviolet filters in wastewater discharges to San Francisco Bay as drivers of ecotoxicity. **Environmental Pollution**, v. 336, p. 122432, 2023.

WU, Y. *et al.* Recent advances for alkaloids as botanical pesticides for use in organic agriculture. **International Journal of Pest Management**, v. p. 1-11, 2021.

XIAO, L. *et al.* Streptomyces sp. FX13 inhibits fungicide-resistant *Botrytis cinerea* *in vitro* and *in vivo* by producing oligomycin A. **Pesticide Biochemistry Physiology**, v. 175, n. 104834, p. 1-10, 2021.

YAMAUCHI, K.; MITSUNAGA, T.; BATUBARA, I. Isolation, identification and tyrosinase inhibitory activities of the extractives from *Allamanda cathartica*. **Natural Resources**, v. 2, n. 3, p. 167, 2011.

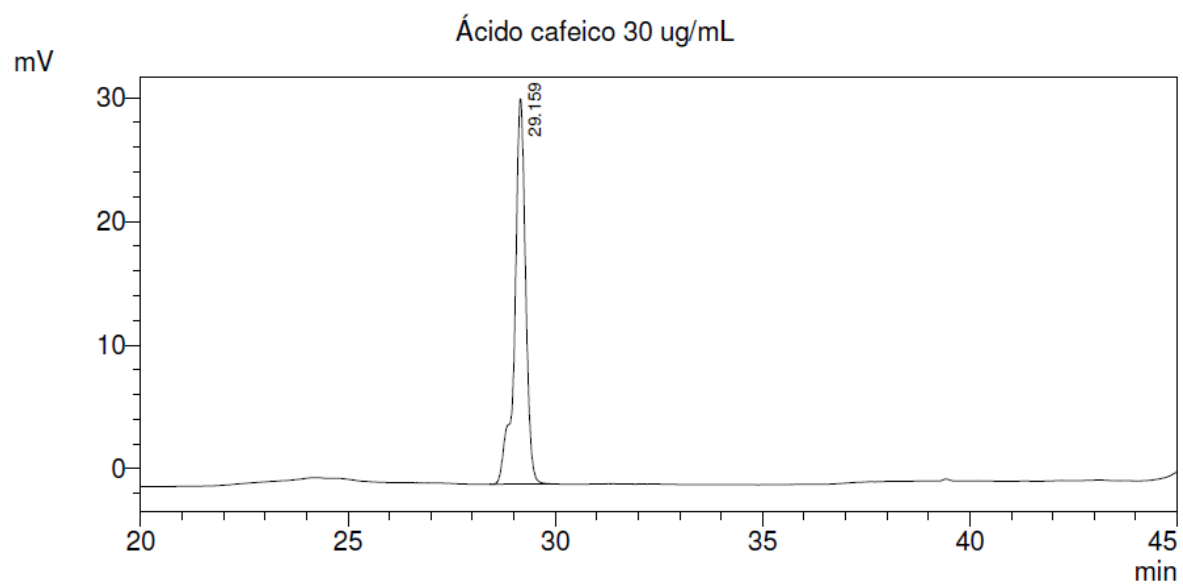
YANG, D. *et al.* The antifungal potential of the chelating agent EDTA against postharvest plant pathogen *Botrytis cinerea*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 388, p. 110089, 2023.

YURTTAŞ, L. *et al.* New chromanone derivatives containing thiazoles: Synthesis and antitumor activity evaluation on A549 lung cancer cell line. **Drug Development Research**, v. 83, n. 2, p. 470-484, 2022.

ZHANG, D. *et al.* Chlorogenic acid induces endoplasmic reticulum stress in *Botrytis cinerea* and inhibits gray mold on strawberry. **Scientia Horticulturae**, v. 318, p. 112091, 2023.

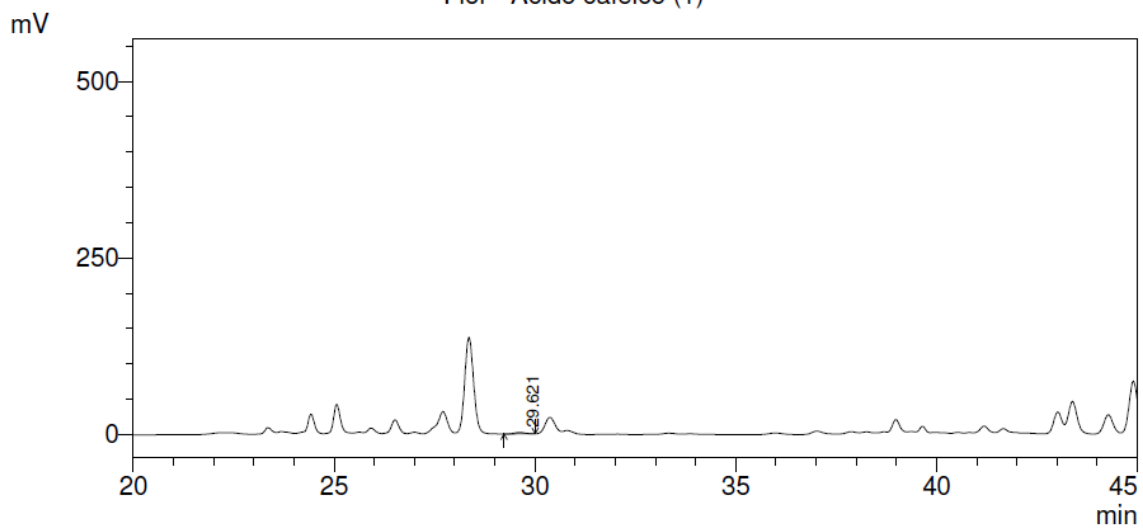
APÊNCIDES

APÊNDICE A - CROMATOGRAMA DO PADRÃO ÁCIDO CAFEICO

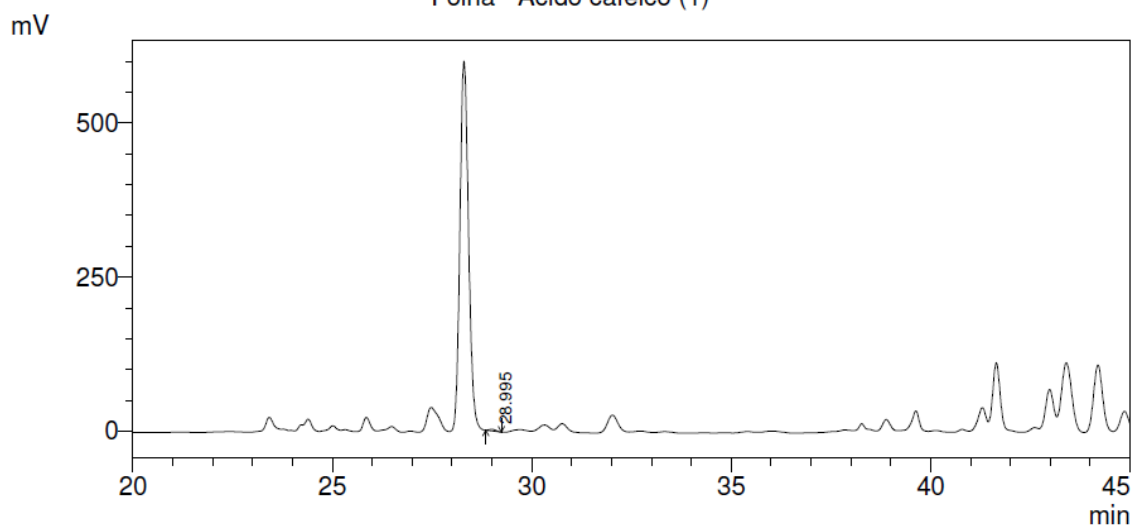


APÊNDICE B - CROMATOGRAMA DOS EXTRATOS (ÁCIDO CAFEICO)

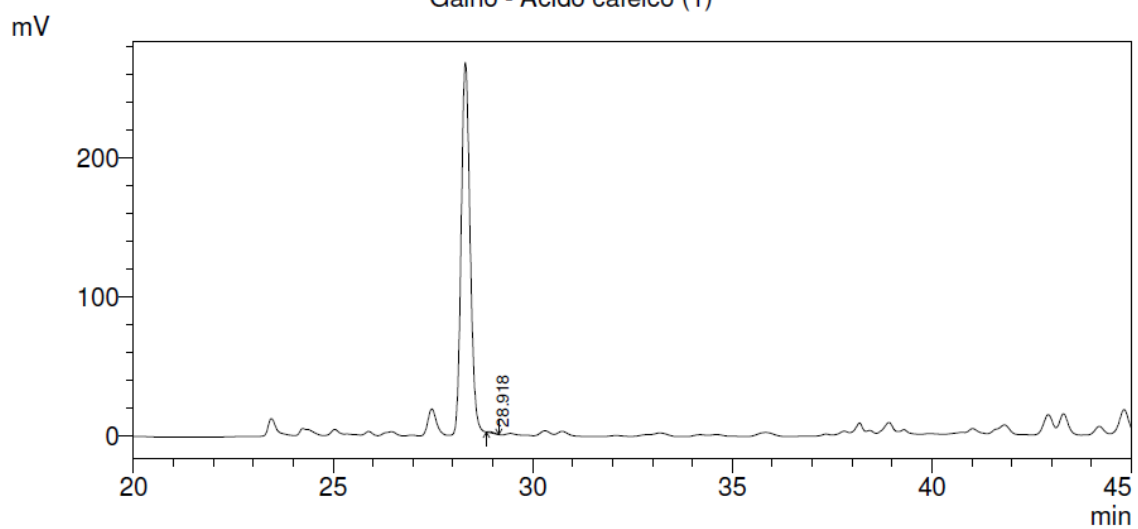
Flor - Ácido cafeico (1)

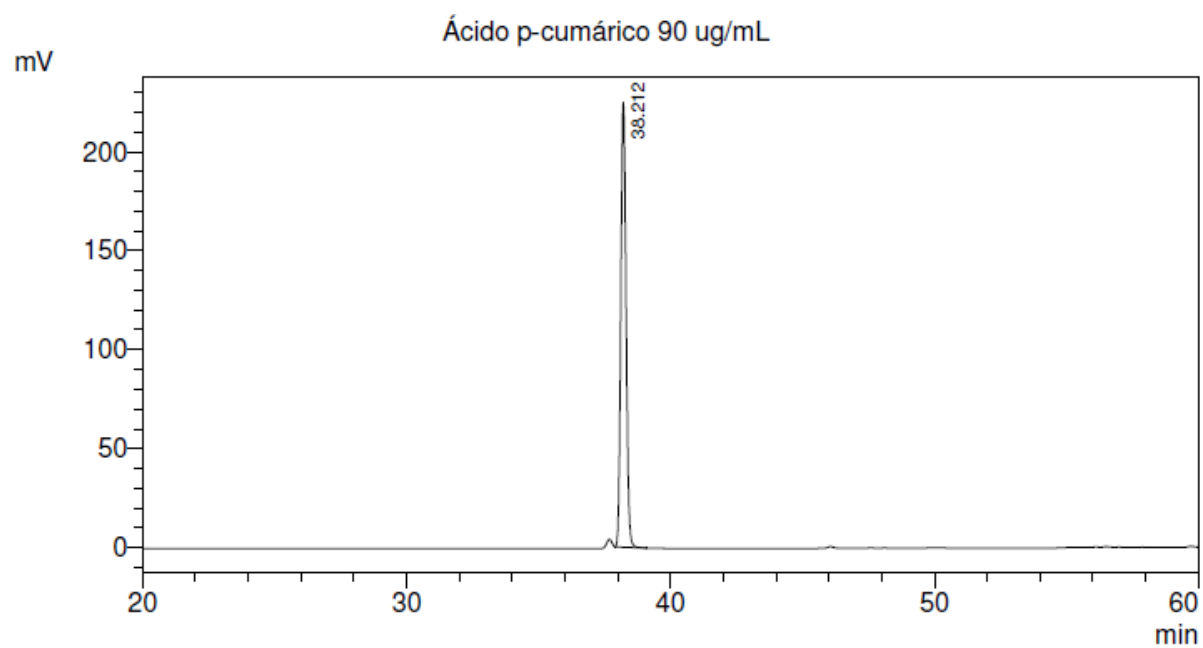


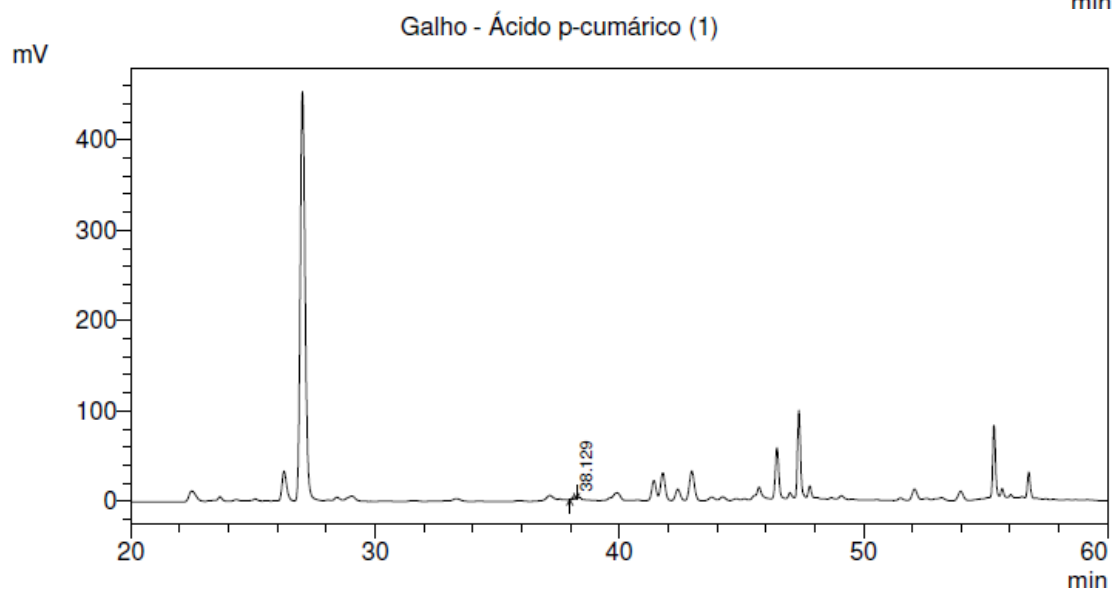
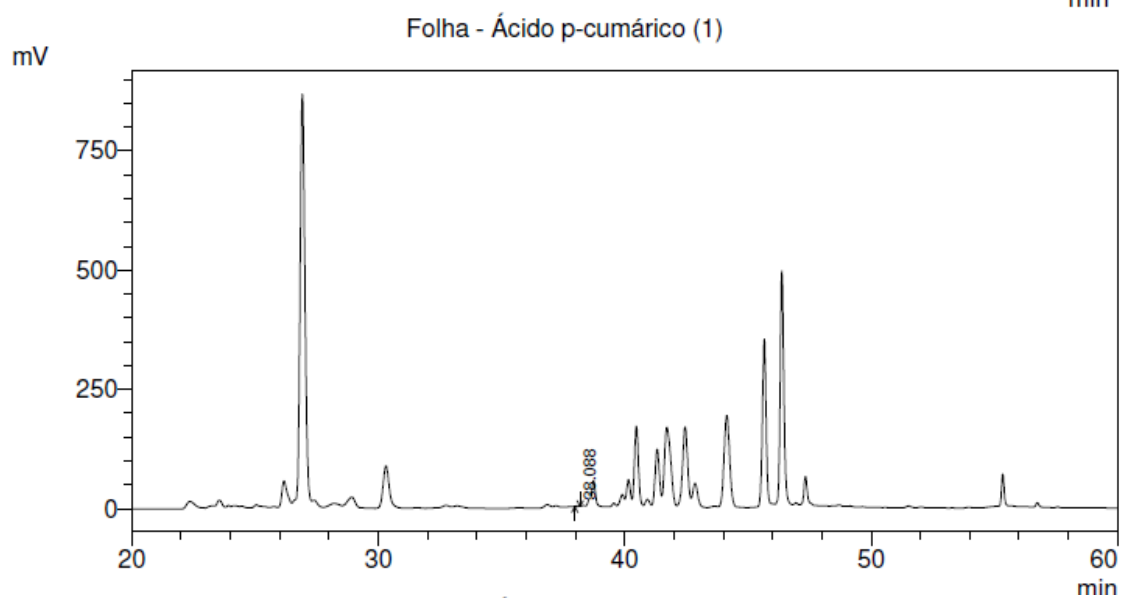
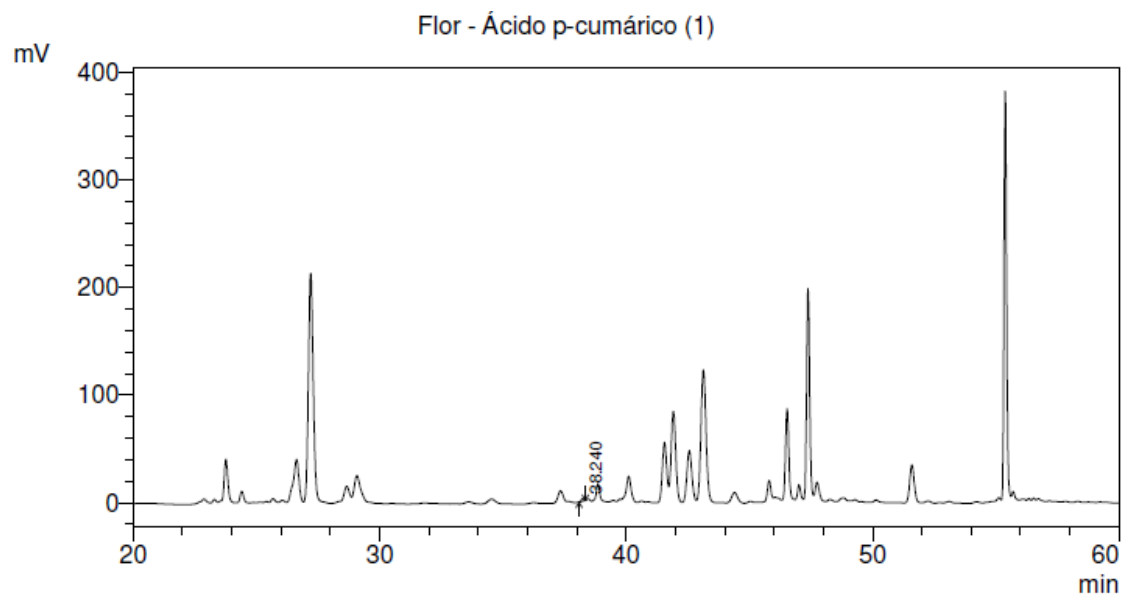
Folha - Ácido cafeico (1)



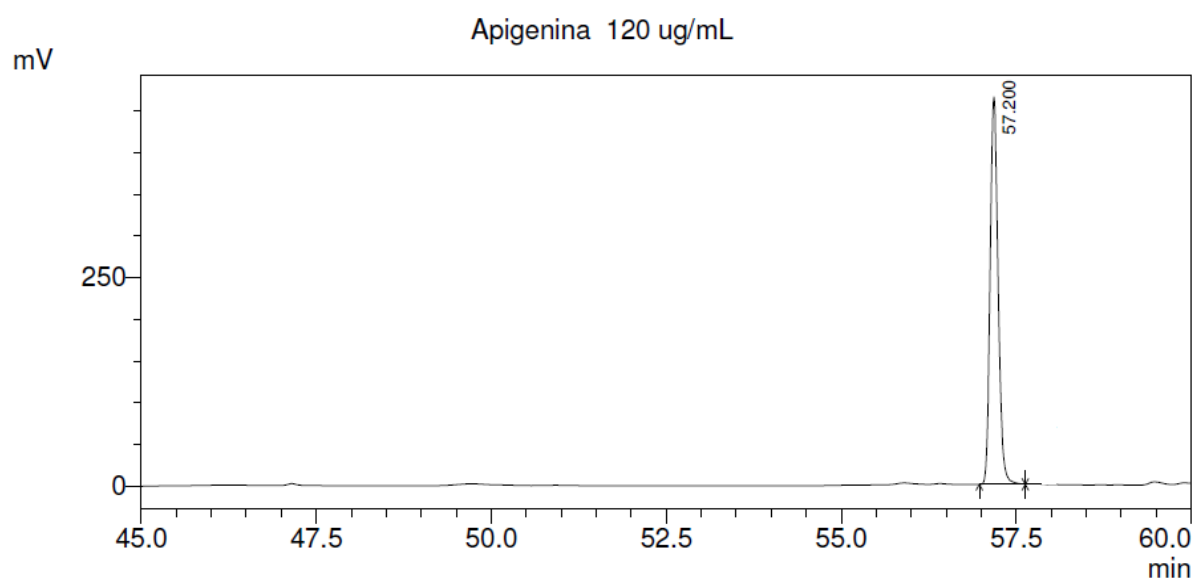
Galho - Ácido cafeico (1)



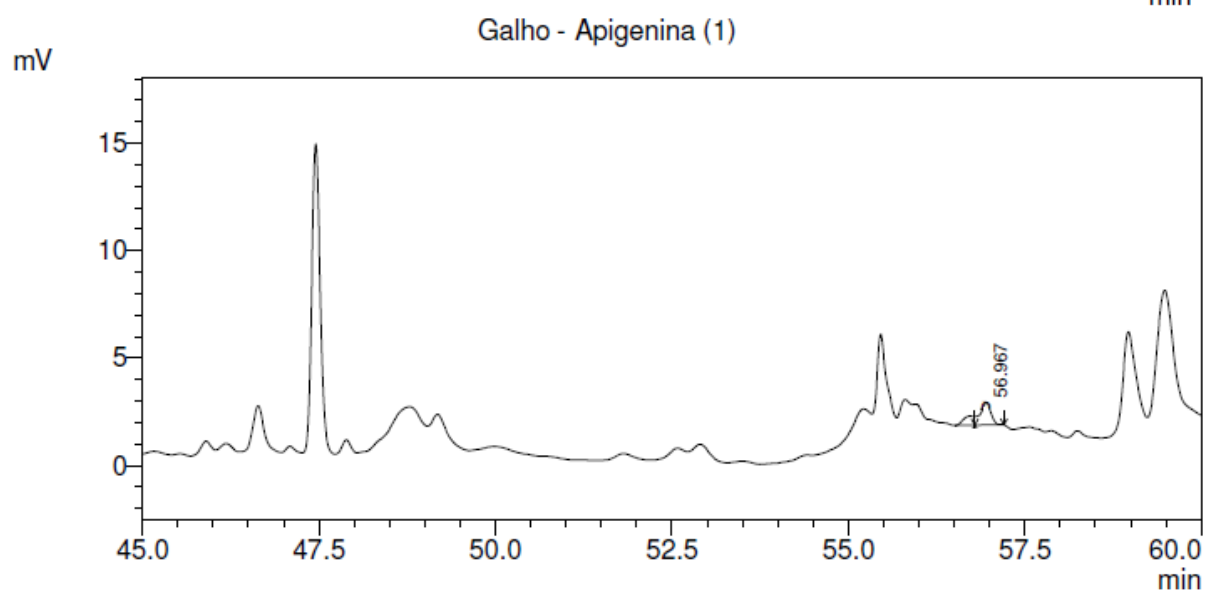
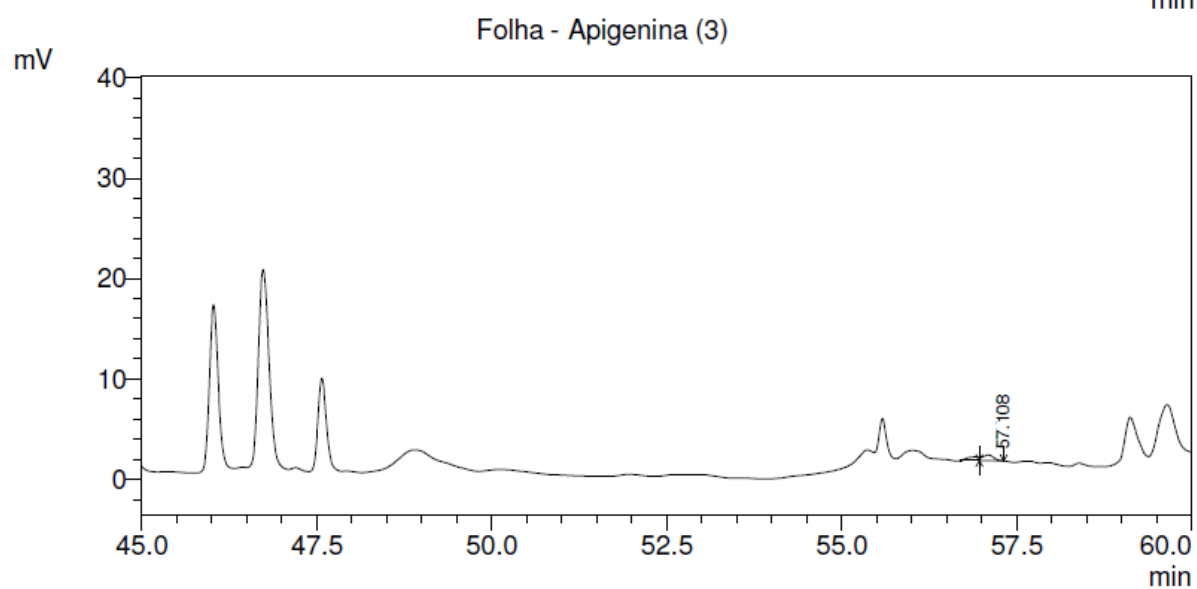
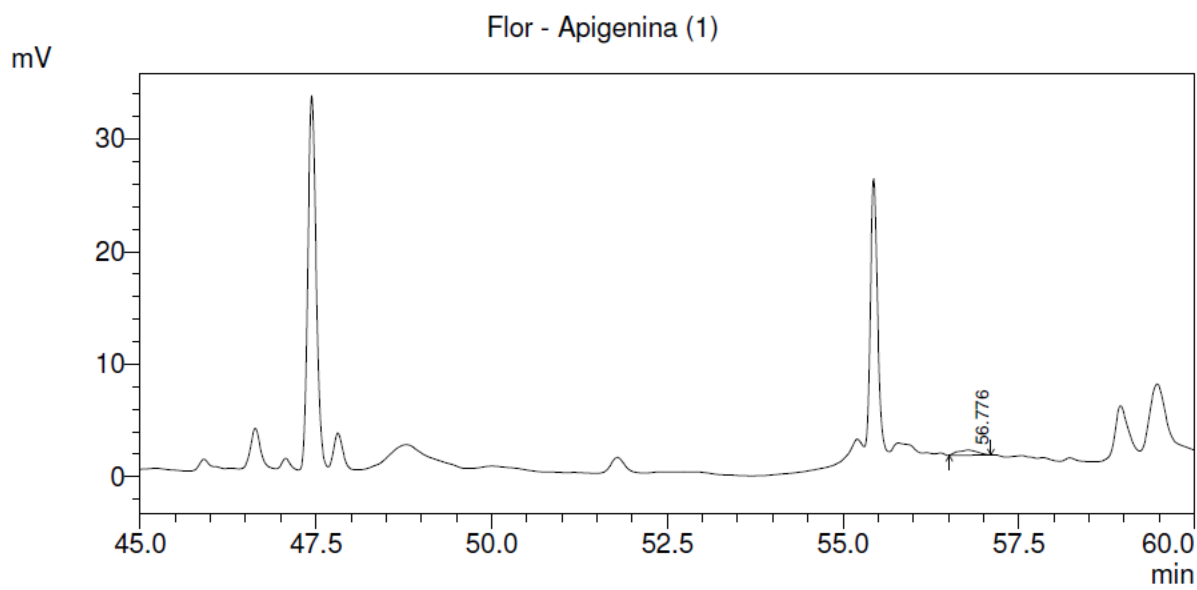
APÊNDICE C - CROMATOGRAMA DO PADRÃO ÁCIDO *P*-CUMÁRICO

APÊNDICE D - CROMATOGRAMA DOS EXTRATOS (ÁCIDO *P*-CUMÁRICO)

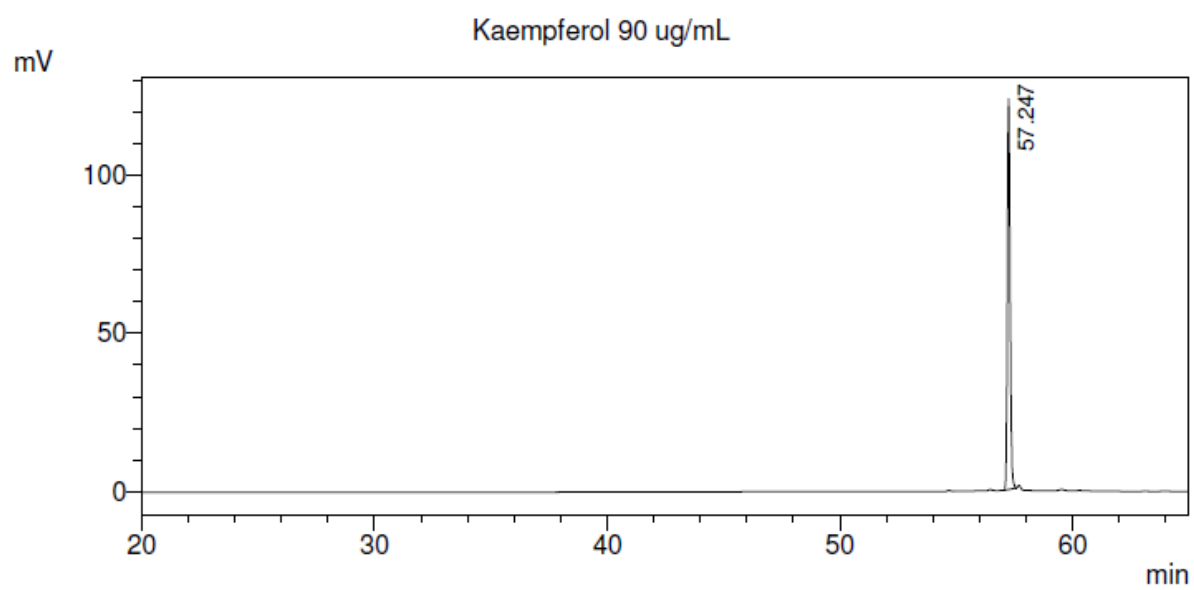
APÊNDICE E - CROMATOGRAMA DO PADRÃO APIGENINA



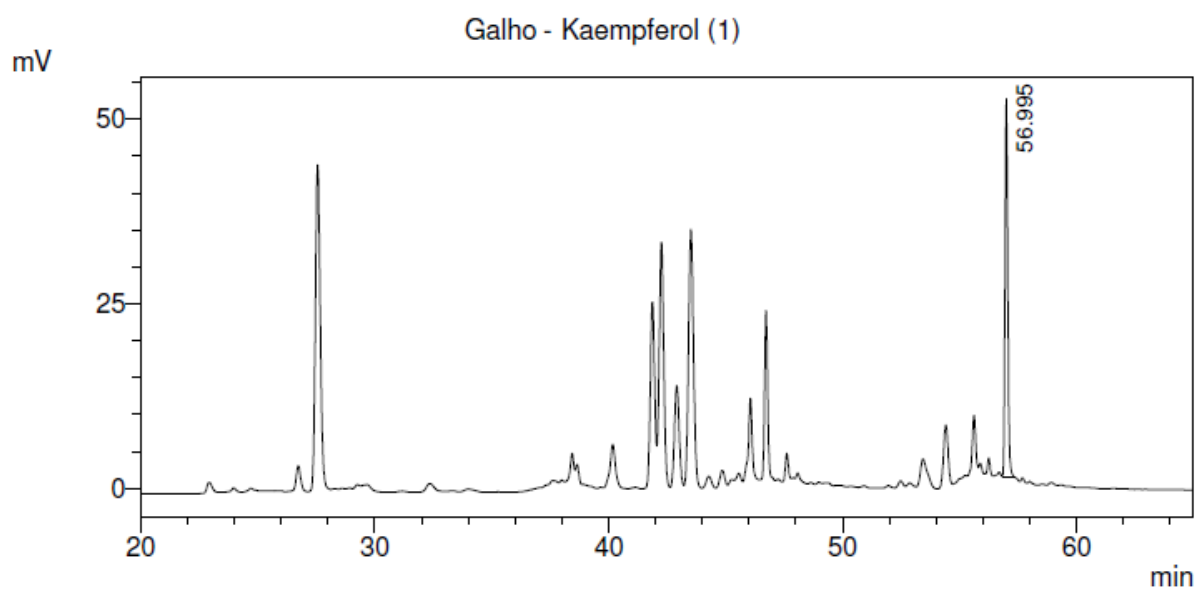
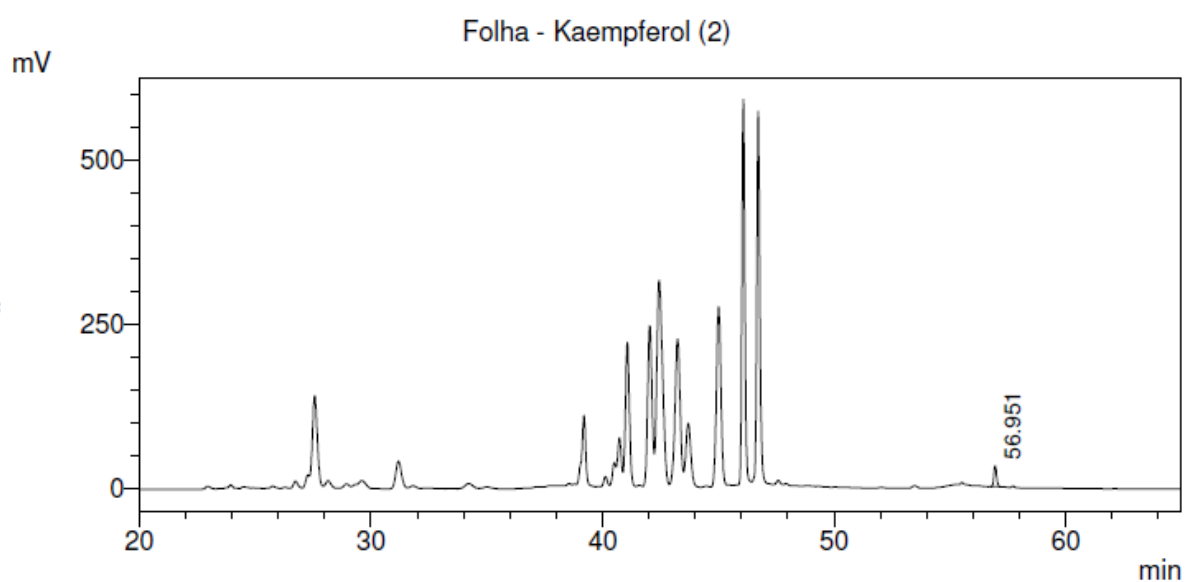
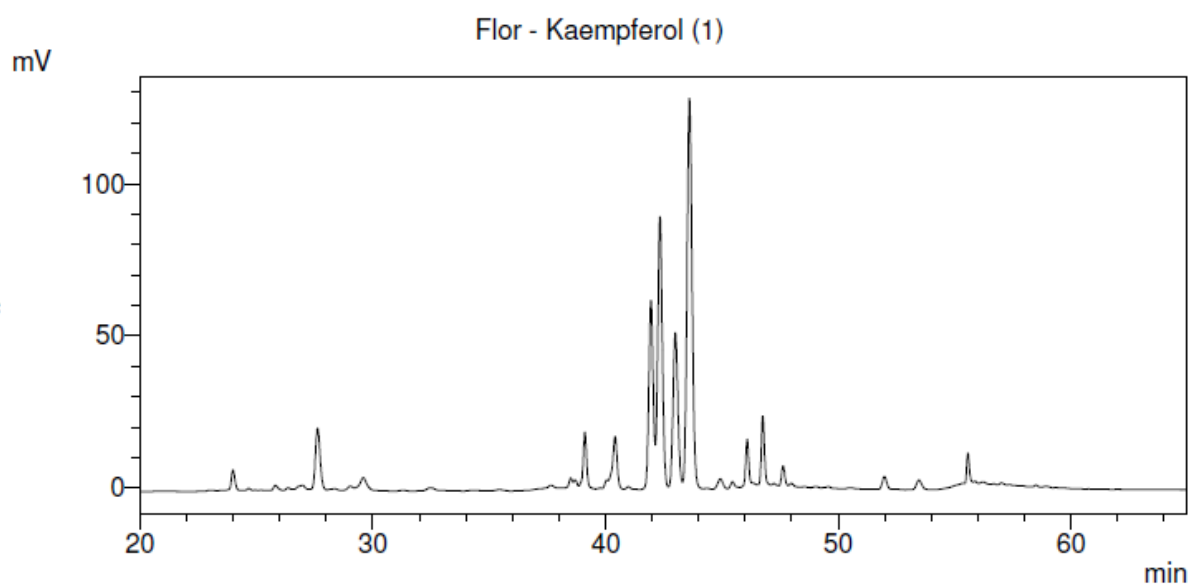
APÊNDICE F - CROMATOGRAMA DOS EXTRATOS (APIGENINA)



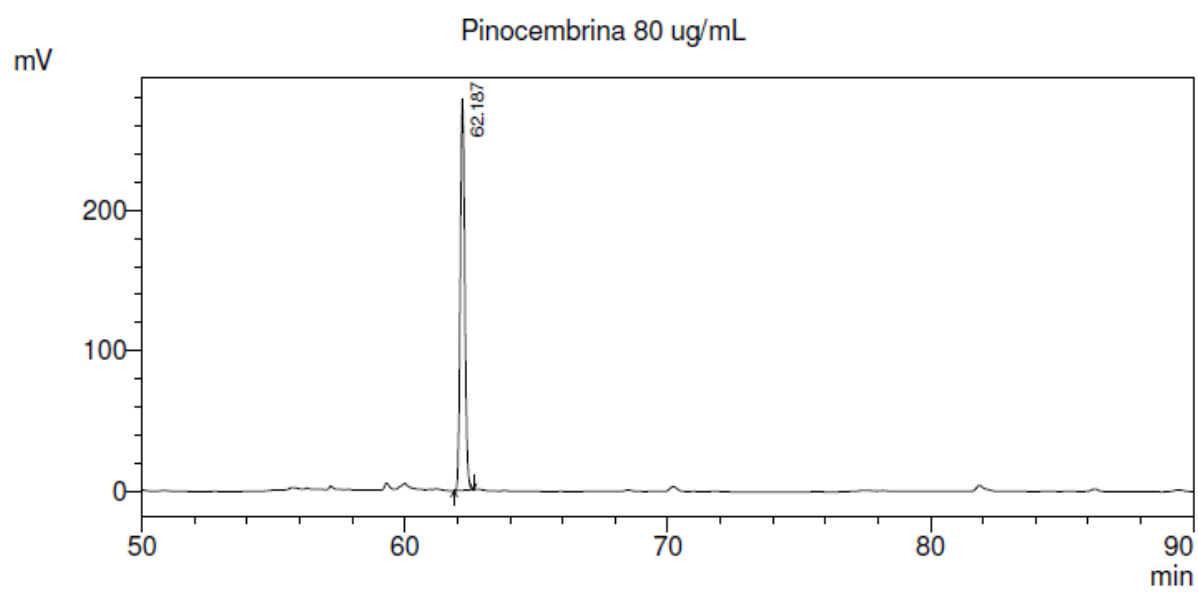
APÊNDICE G - CROMATOGRAMA DO PADRÃO KAEMPFEROL



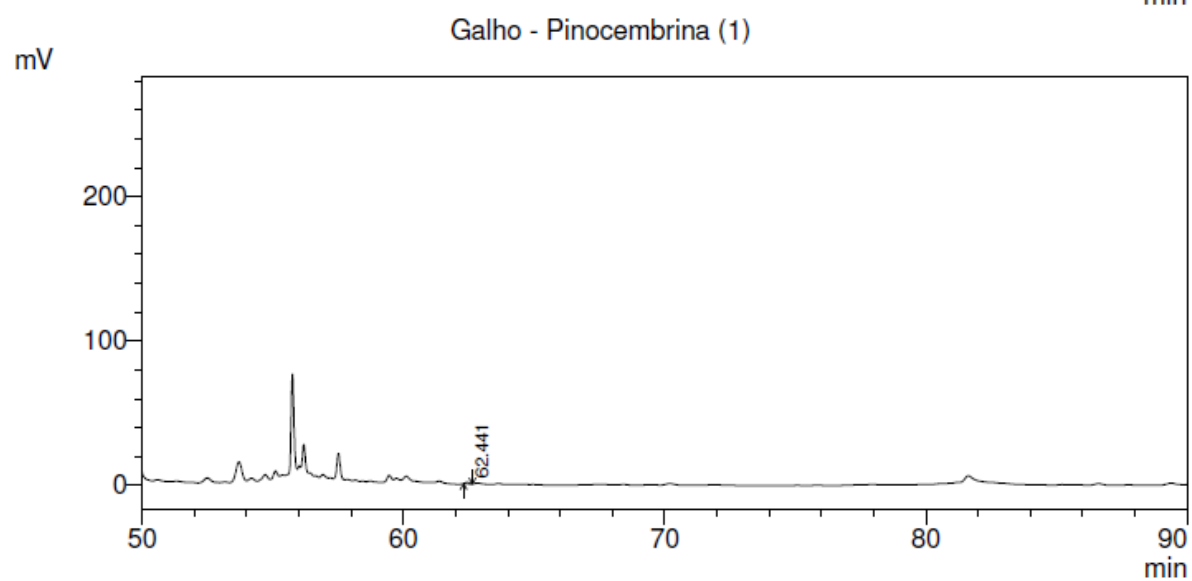
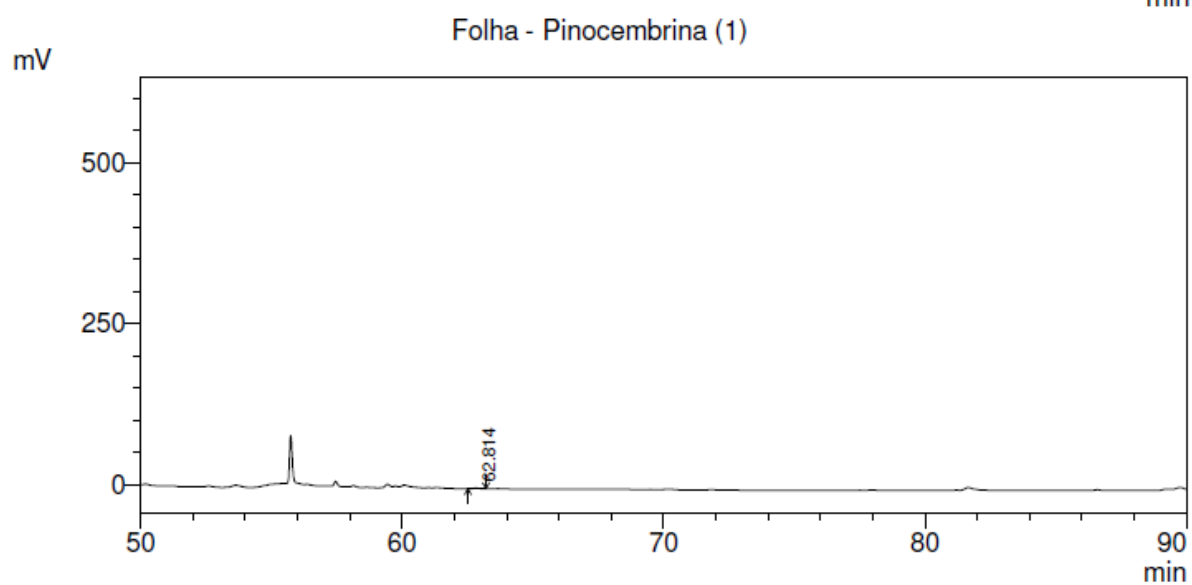
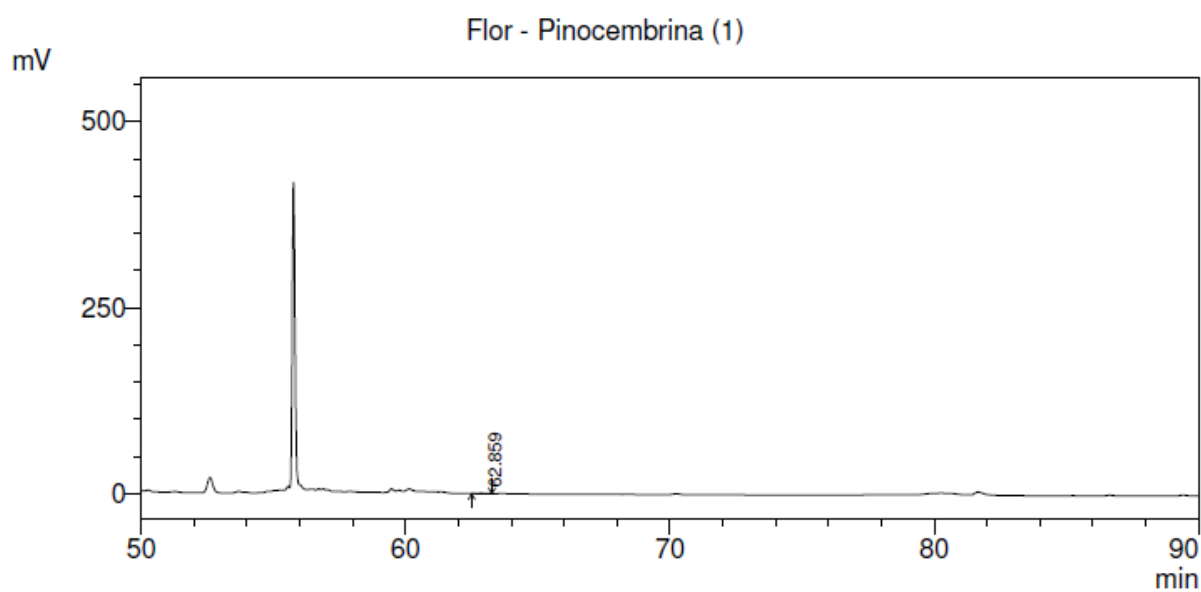
APÊNDICE H - CROMATOGRAMA DOS EXTRATOS (KAEMPFEROL)



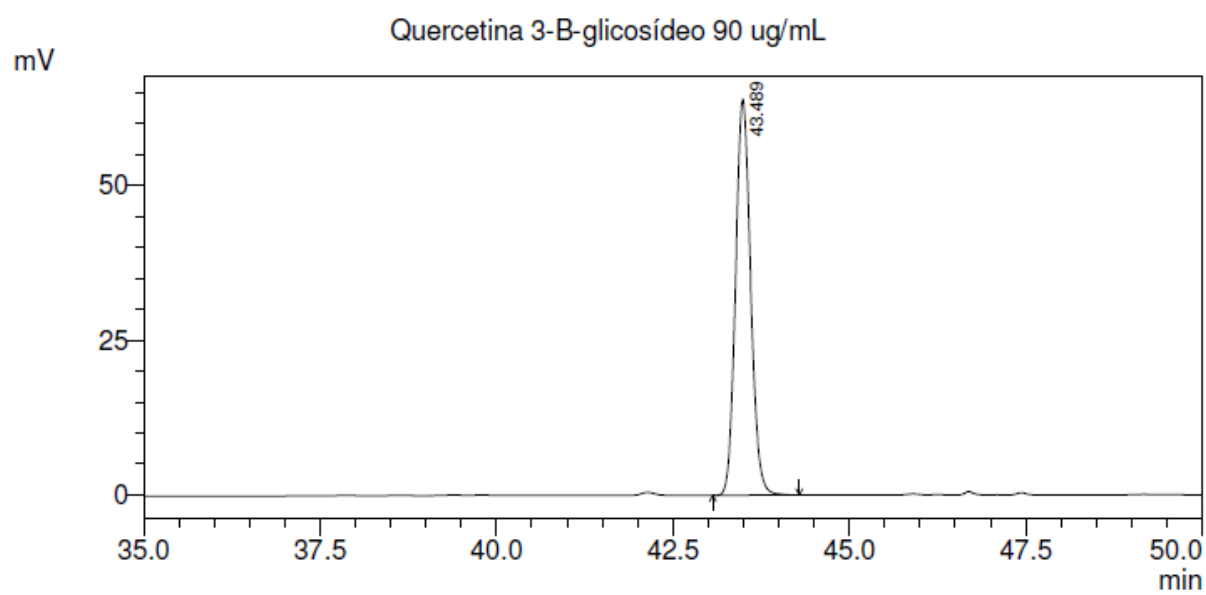
APÊNDICE I - CROMATOGRAMA DO PADRÃO PINOCEMBRINA



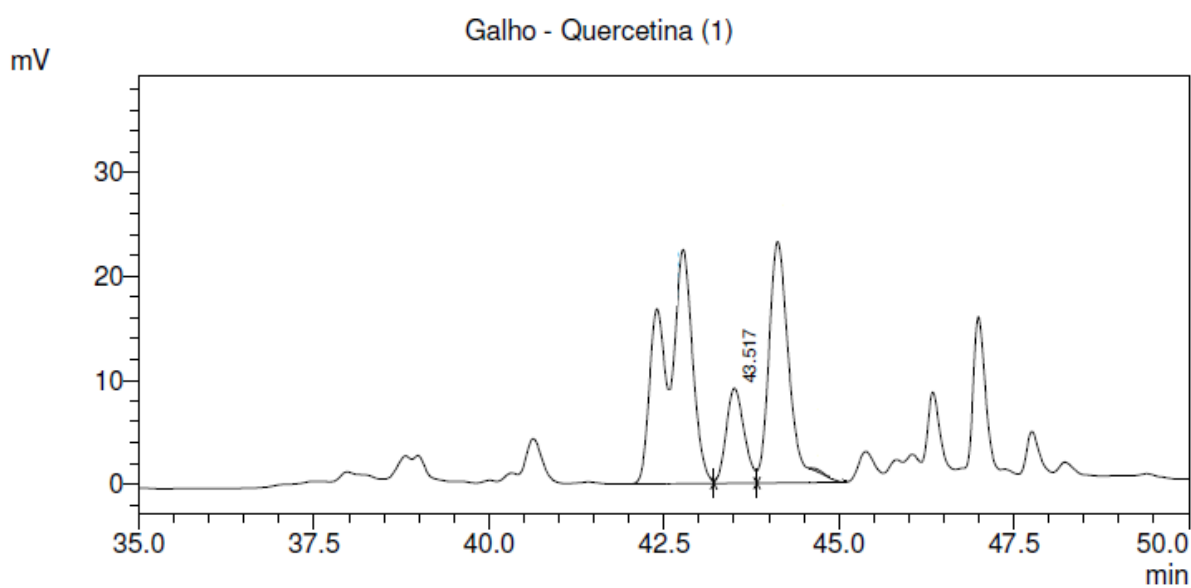
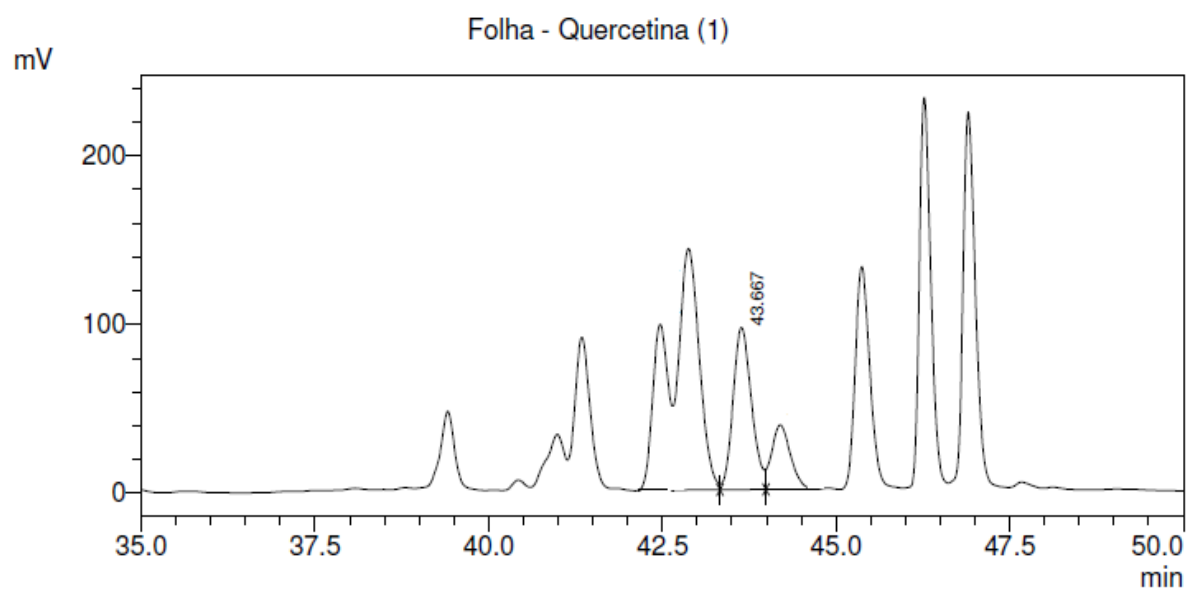
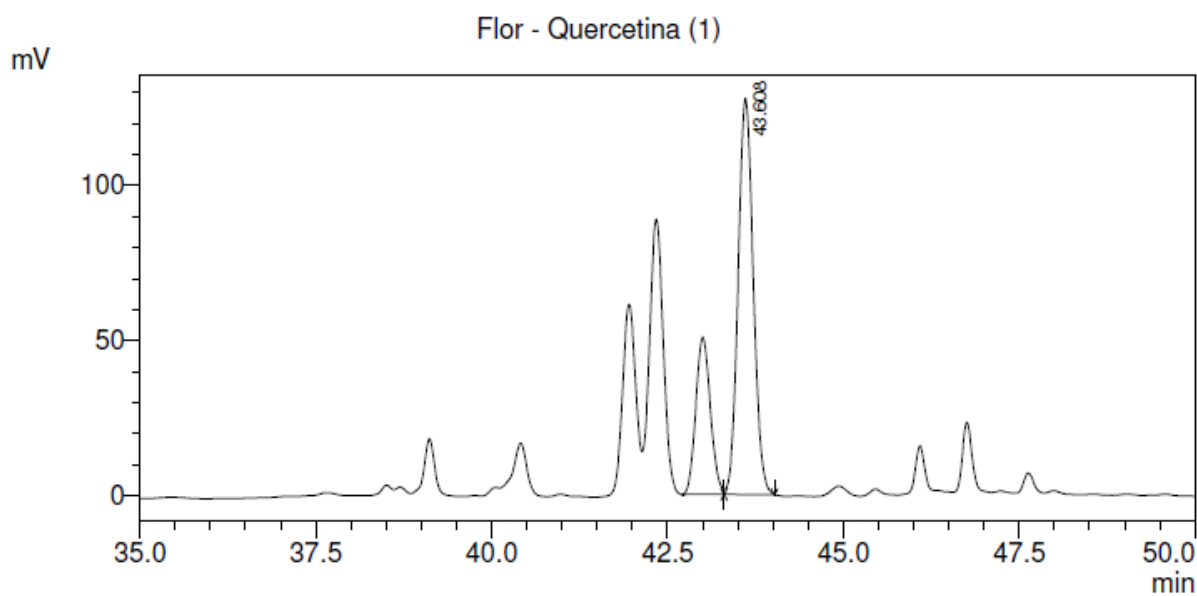
APÊNDICE J - CROMATOGRAMA DOS EXTRATOS (PINOCEMBRINA)



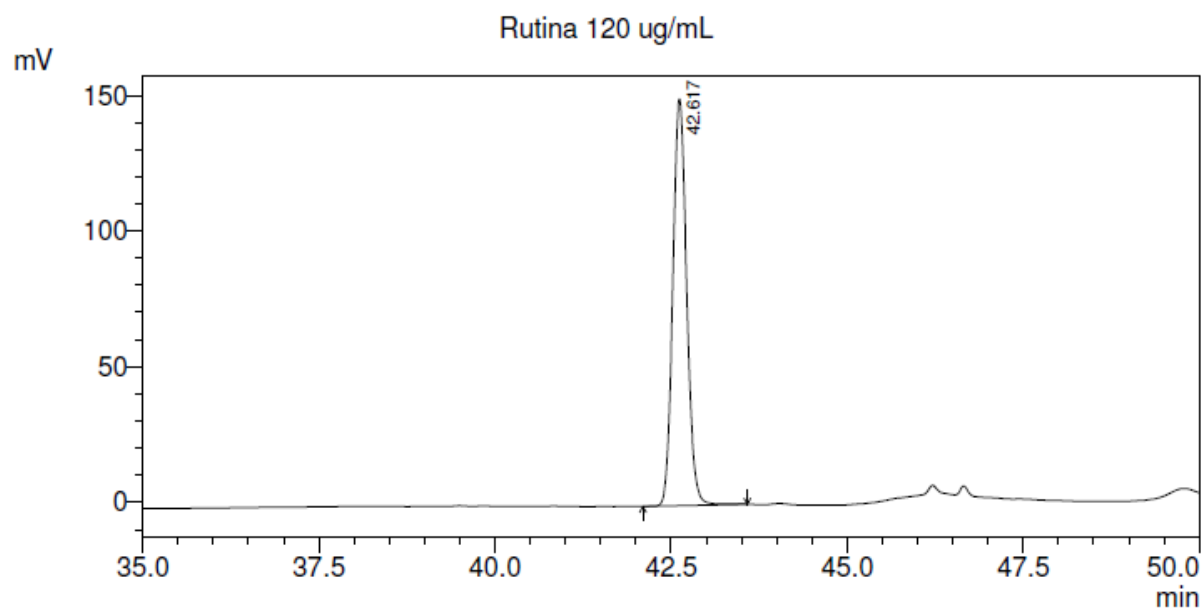
APÊNDICE K - CROMATOGRAMA PADRÃO QUERCETINA-3-B-GLICOSÍDEO



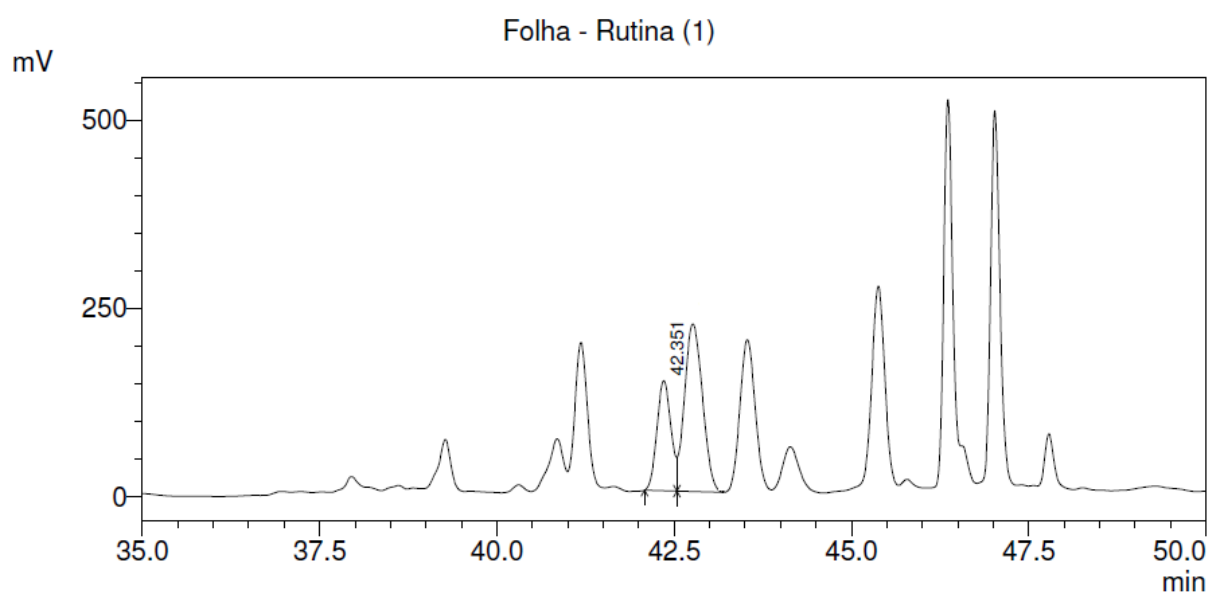
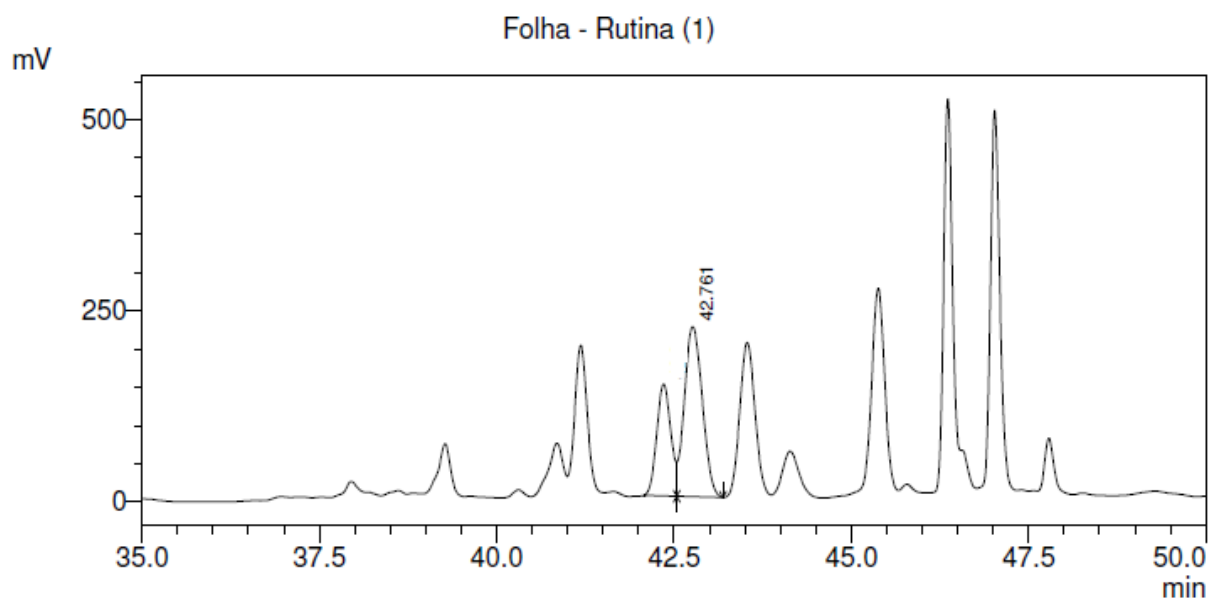
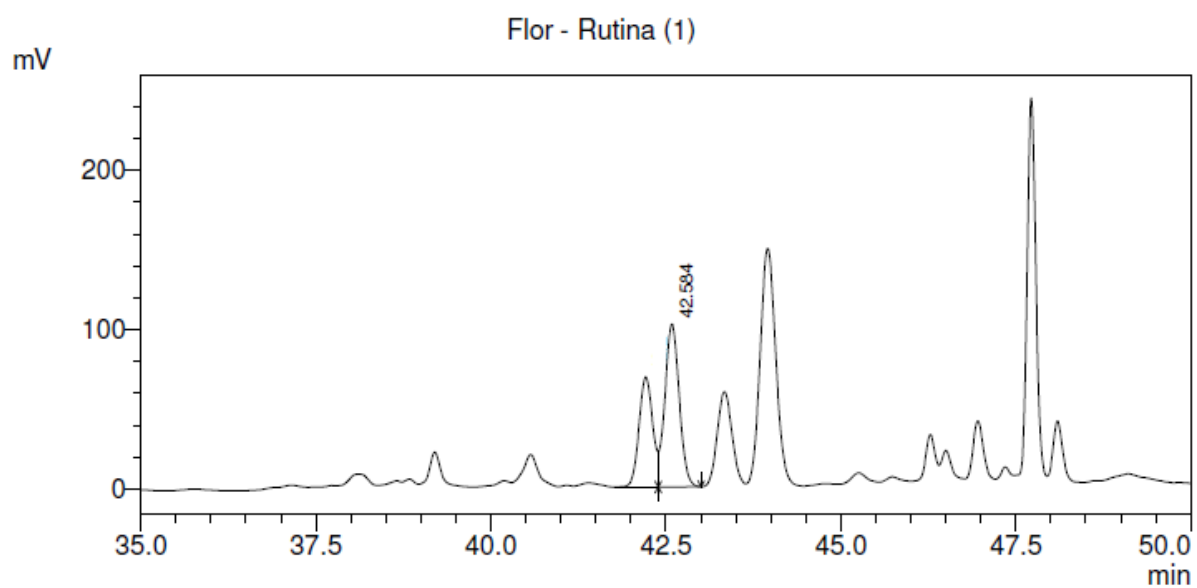
APÊNDICE L - CROMATOGRAMA EXTRATOS (QUERCETINA-3-B-GLICOSÍDEO)



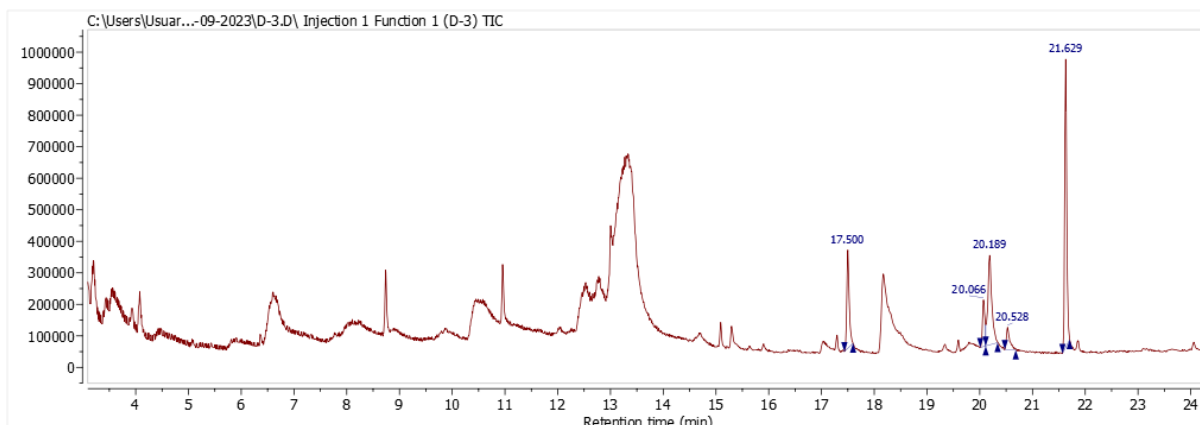
APÊNDICE M - CROMATOGRAMA DO PADRÃO RUTINA



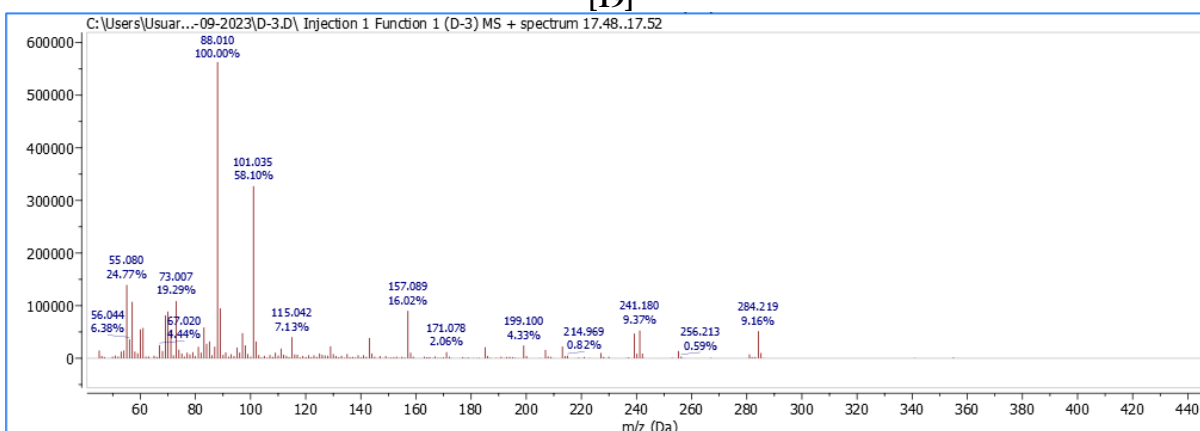
APÊNDICE N - CROMATOGRAMA DOS EXTRATOS (RUTINA)



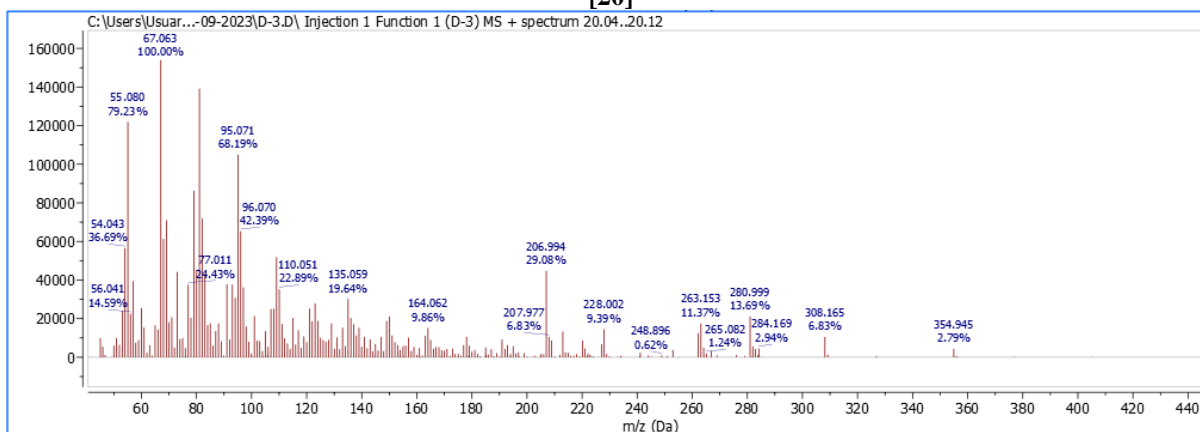
APÊNDICE O – CROMATOGRAMA CG FLORES E MS DOS COMPOSTOS



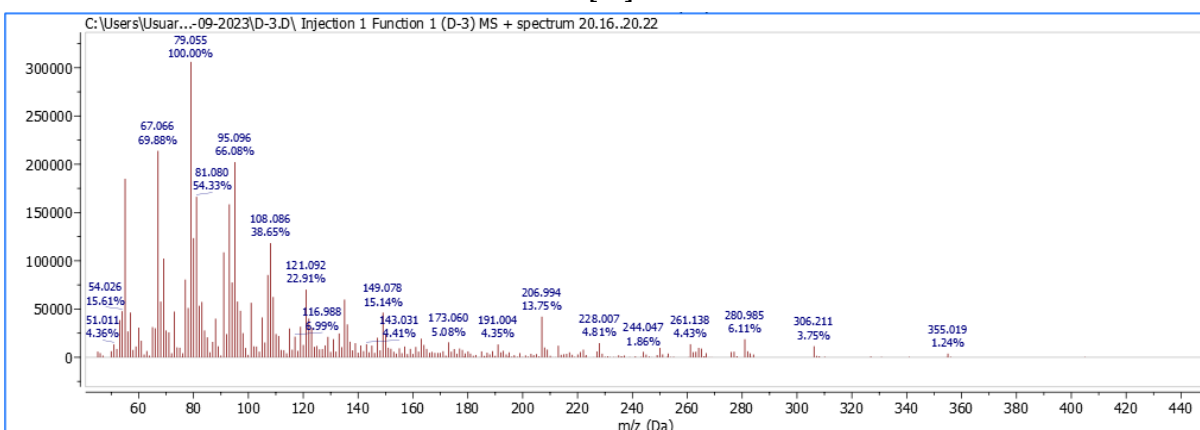
[19]



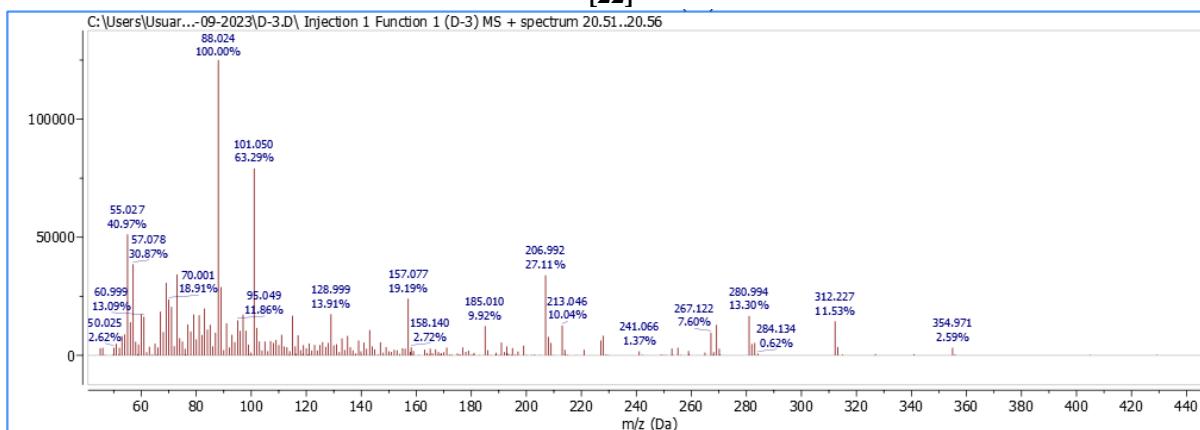
[20]



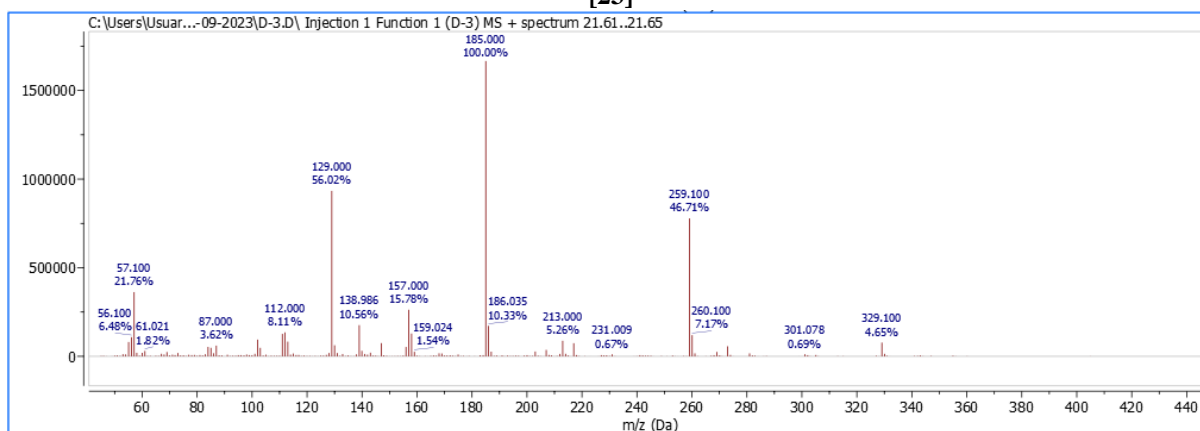
[21]



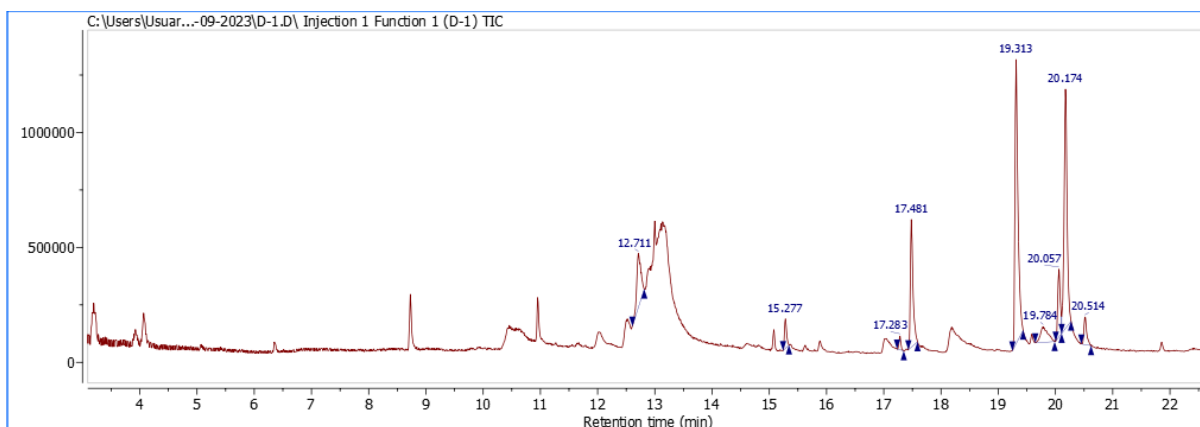
[22]



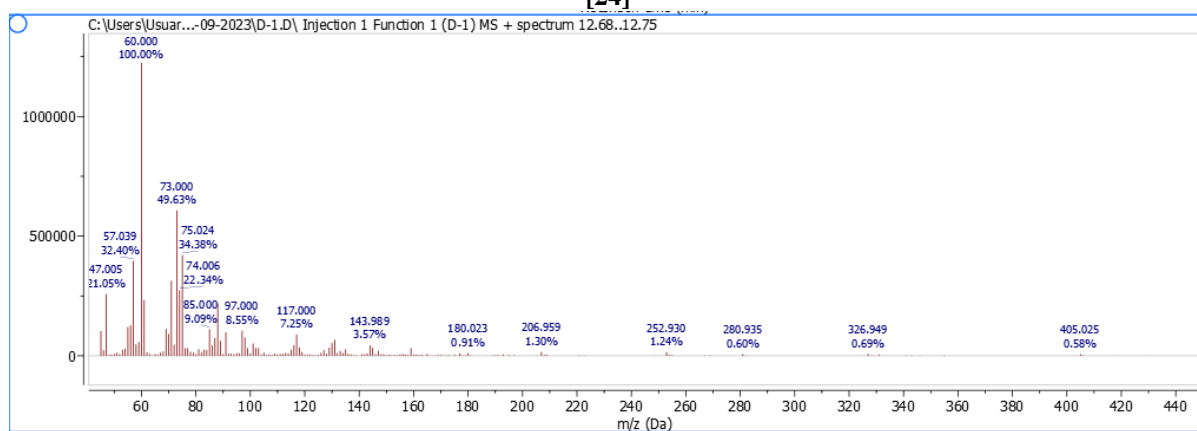
[23]



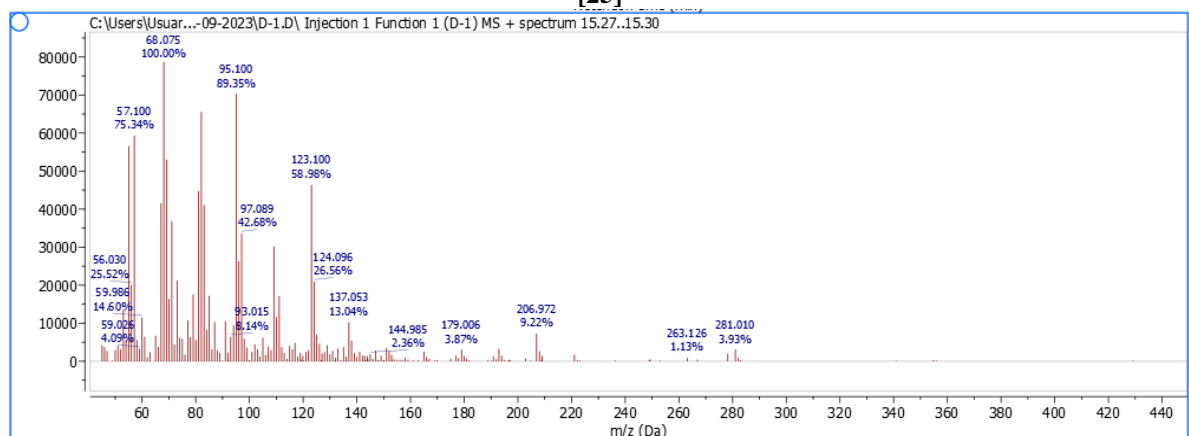
APÊNDICE P – CROMATOGRAMA CG FOLHAS E MS DOS COMPOSTOS



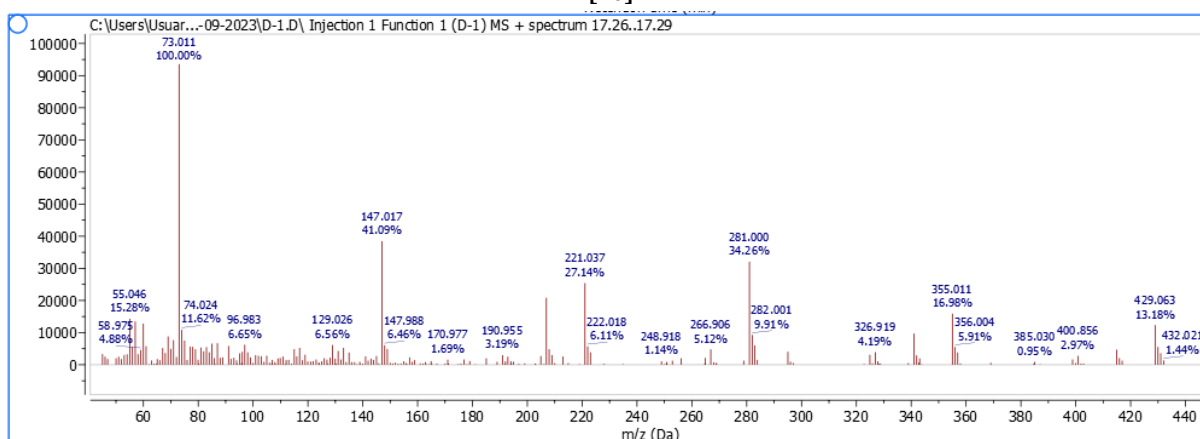
[24]



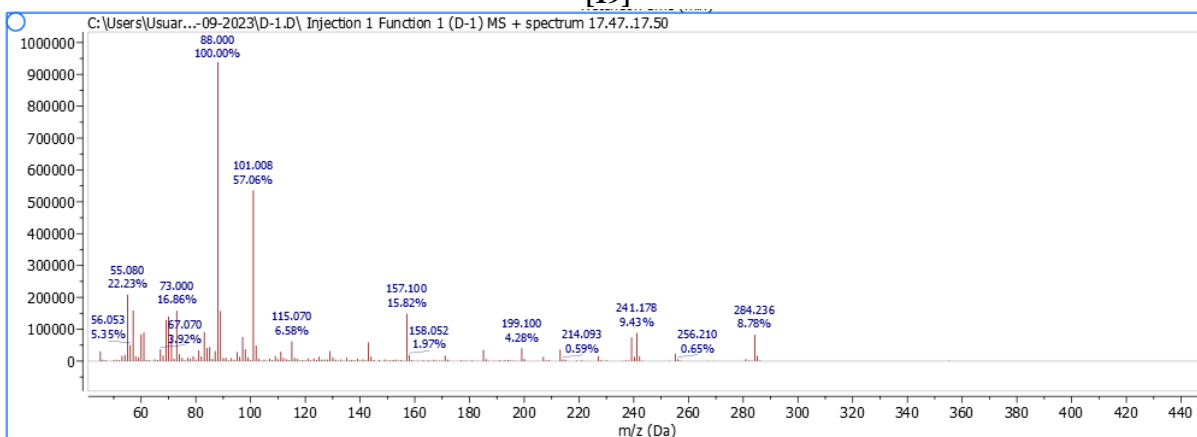
[25]



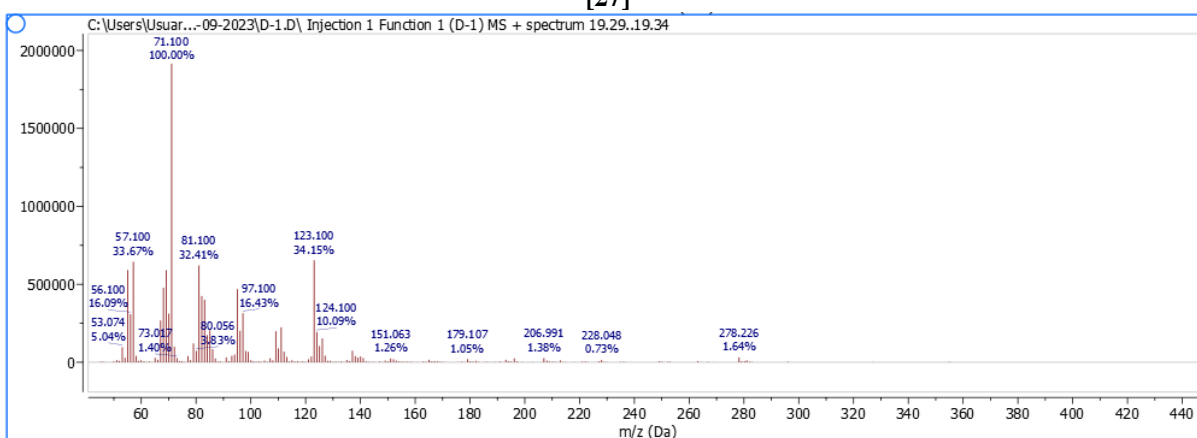
[26]



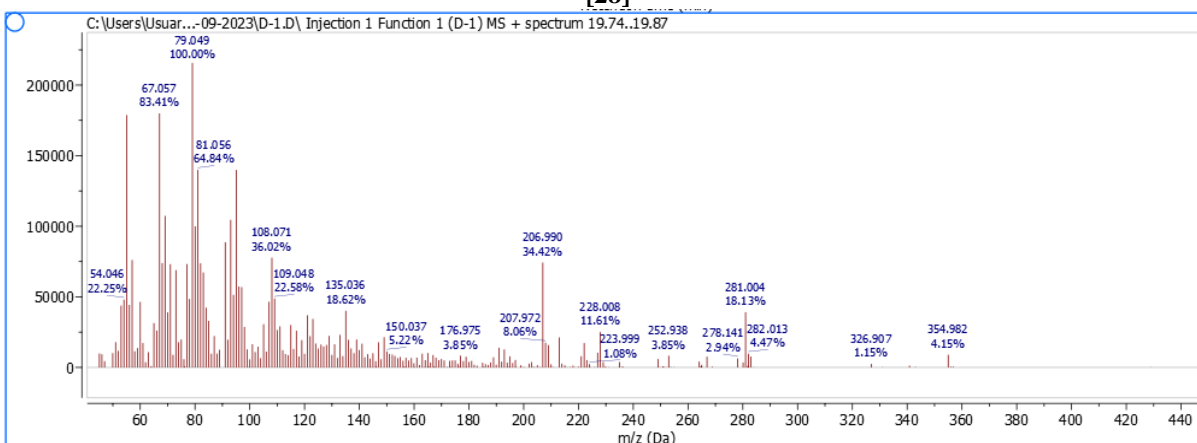
[19]



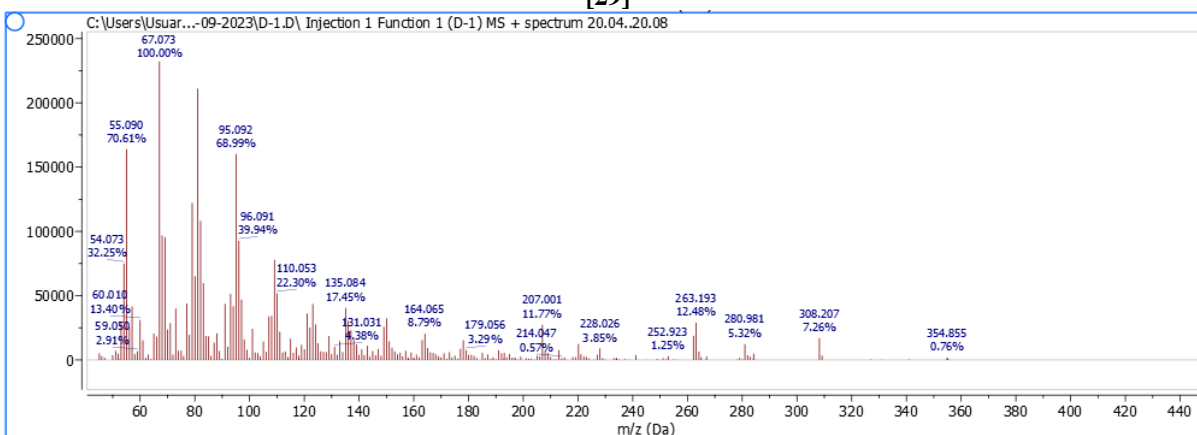
[27]



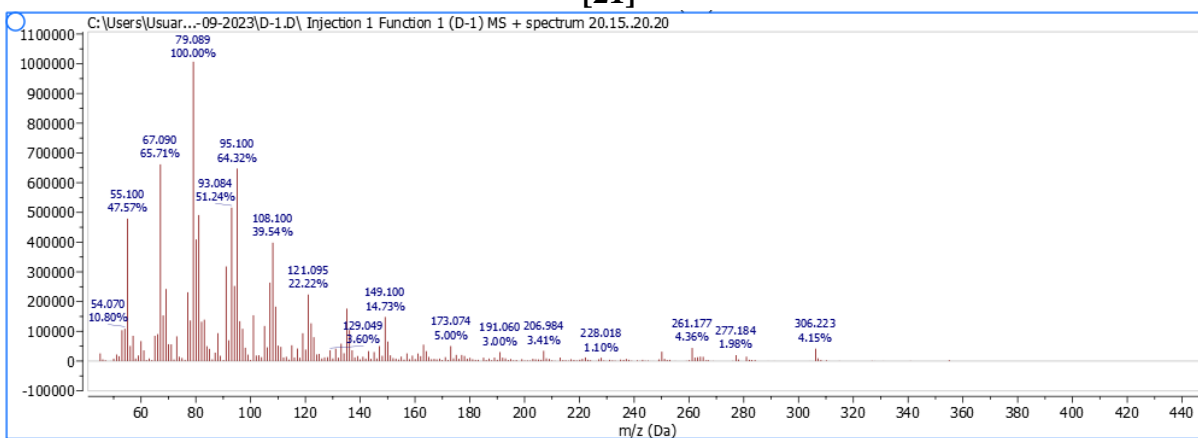
[28]



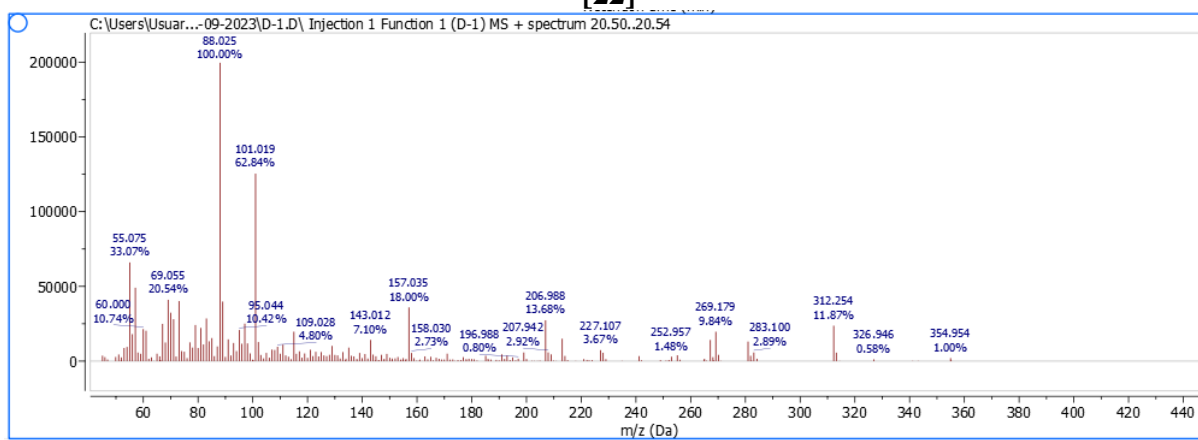
[29]



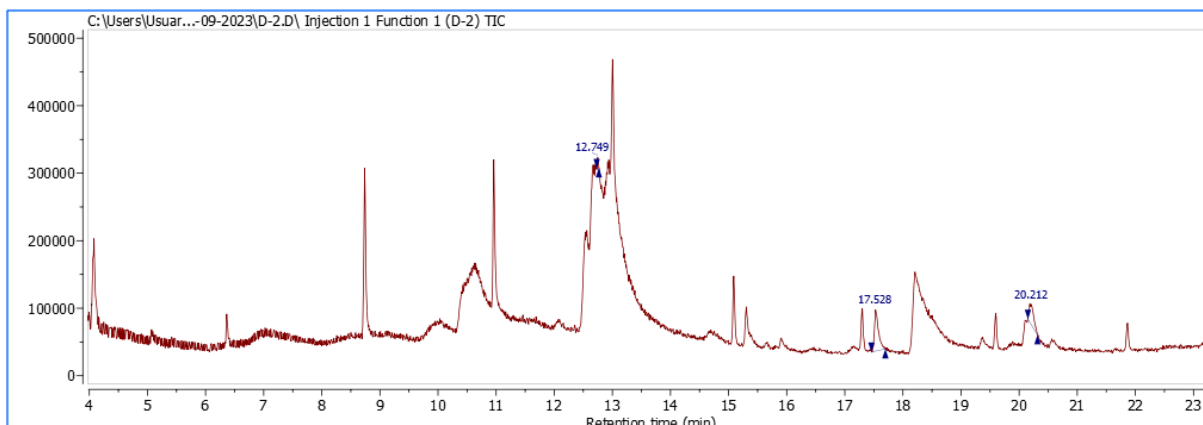
[21]



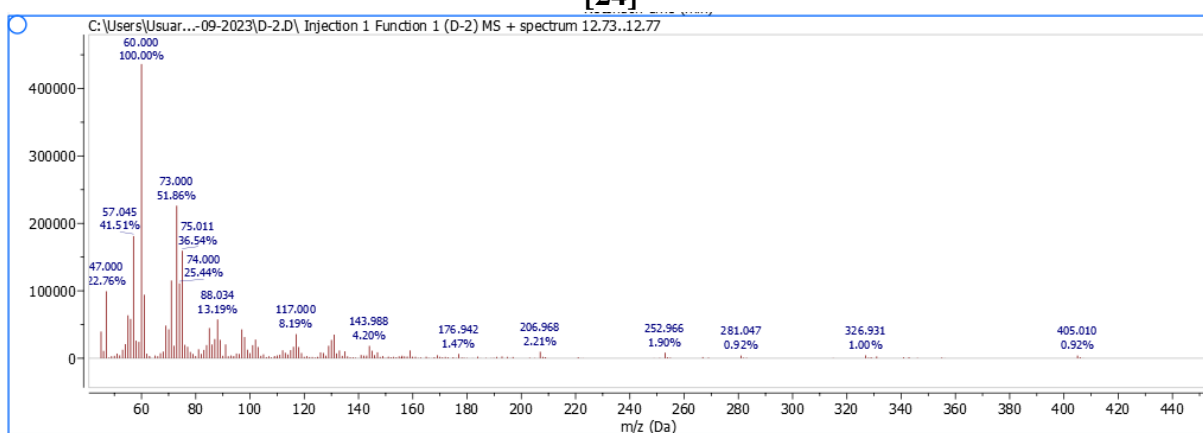
[22]



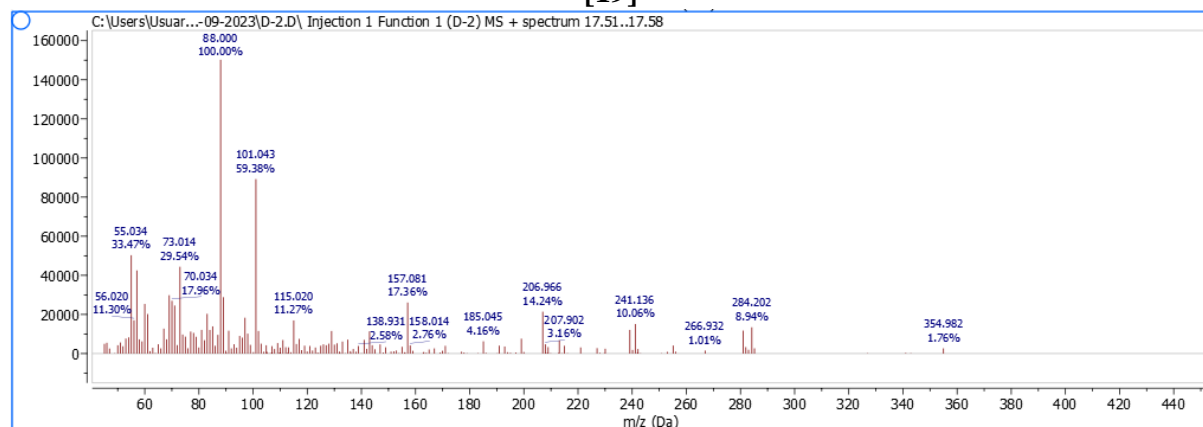
APÊNDICE Q – CROMATOGRAMA CG FOLHAS E MS DOS COMPOSTOS



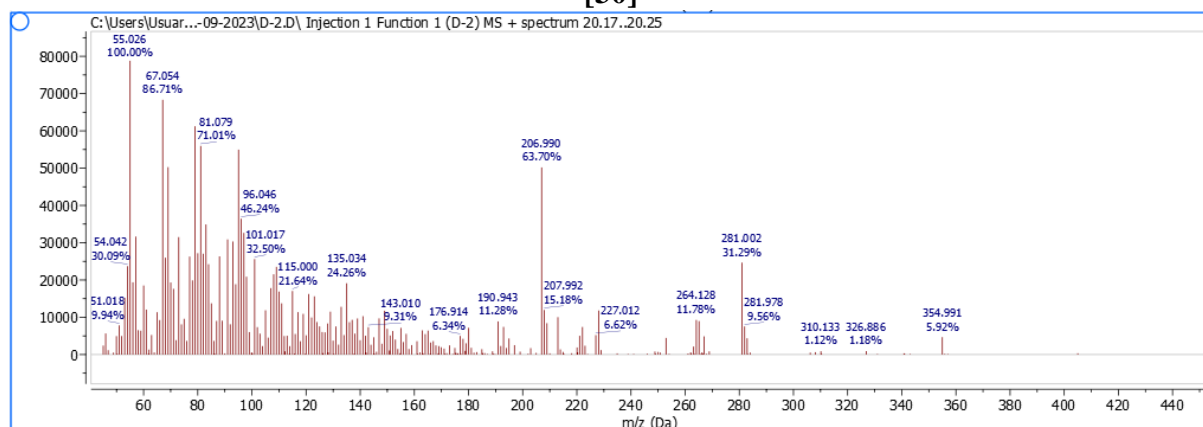
[24]



[19]



[30]



ANEXOS

ANEXO A – EXSICATA DE *Allamanda cathartica*