

MESTRADO

Toxicologia Analítica Clínica e Forense

Pesquisa e caracterização de inseticidas naturais em células de insetos

Ana Margarida Jorge da Costa

M

2020





Pesquisa e caracterização de inseticidas naturais em células de insetos

Dissertação

Mestrado em Toxicologia Analítica Clínica e Forense

Ana Margarida Jorge da Costa

Orientador: Prof. Doutor David M. Pereira

Co-orientadora: Prof.^a Doutora Paula B. Andrade

Porto, Julho 2020

De acordo com a legislação em vigor, não é permitida a reprodução de qualquer parte desta dissertação.

According to the law, is not allowed to reproduce any part of this dissertation.

Agradecimentos

Terminado este trabalho, que representa no seu todo, dois anos de muitas aprendizagens, muita dedicação e muita vontade de o concluir, sinto, simultaneamente, uma enorme sensação de alívio e de saudade.

Tenho plena consciência de que devo muito ao saber e à paciência dos professores e colegas que me acompanharam e por isso vão para eles os meus primeiros agradecimentos.

- Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. David Pereira pela paciência e pelos conhecimentos transmitidos na área biológica, e à minha co-orientadora Prof.^a Dr.^a Paula Andrade pela enorme ajuda na área da química dos compostos fitoquímicos, na qual eu me sentia mais insegura;
- Agradeço também aos meus coordenadores do Mestrado, Prof.^a Dr.^a Maria Lourdes Bastos, Prof. Dr. Fernando Remião e Prof.^a Dr.^a Helena Carmo pela oportunidade que me deram de o poder realizar;
- Agradeço ainda aos restantes professores que, durante o 1º ano, me forneceram o suporte e as bases de que precisava;
- Agradeço à Cristina e ao Rui, sempre disponíveis quando eu precisava da sua ajuda, à Andreia e à Mariana, à Vera e aos outros colegas de laboratório, já em trabalhos de doutoramento, que tantas vezes me tiraram dúvidas e ampararam inseguranças.

Não posso deixar de agradecer também, à minha família, muito particularmente à minha mãe, pelas constantes palavras de apoio e estímulo e ao meu tio Jorge, o tio especial, com quem sabia que podia sempre contar, mesmo à distância.

Para todos o meu MUITO OBRIGADA!

Resumo

Esta dissertação tem como objetivo a pesquisa e caracterização de inseticidas naturais e o seu efeito em células de insetos.

É do conhecimento geral que a maior arma contra pragas de insetos usada, ainda hoje, na agricultura são os inseticidas sintéticos, apesar de já conhecidos e devidamente investigados, os perigos que acarretam para outros seres vivos, nomeadamente agricultores ou outros consumidores e o meio ambiente em geral.

Daí os numerosos estudos levados a cabo atualmente no sentido de os substituir por inseticidas naturais reconhecidamente menos poluentes e menos lesivos para pessoas e ambiente.

Para melhor compreender esta questão e ampliar aprendizagens sobre o tema foi escolhido este estudo como objeto de trabalho neste mestrado.

O trabalho foi sendo realizado com suporte na vasta literatura já existente sobre esta temática, tentando chegar a conclusões e utilizando, para isso, quatro espécies de plantas (*Ageratum conyzoides* [Linnaeus, 1753], *Chelidonium majus* [Linnaeus, 1753], *Juglans regia* [Linnaeus, 1753], *Ruta graveolens* [Linnaeus, 1753]) que, por serem consideradas medicinais, poderão, eventualmente, vir a ser utilizadas como inseticidas de origem vegetal.

Inicialmente foram preparados extratos hidrometanólicos, de diclorometano e acetato de etilo, sendo as células de inseto Sf9 usadas para avaliar a viabilidade celular quando estas fossem expostas aos diferentes extratos. Efetuaram-se ainda testes gerais de fitoquímicos nas espécies de plantas em estudo quer nas suas diferentes partes secas quer também nos seus extratos. Por último fizeram-se análises de HPLC-DAD nos extratos que apresentaram ação inseticida.

Nas espécies *A. conyzoides*, *C. majus*, *J. regia* e *R. graveolens* os extratos hidrometanólicos não apresentaram ação inseticida. No entanto, os extratos diclorometano e acetato de etilo das espécies *A. conyzoides* e *R. graveolens* apresentaram ação inseticida. Foi observado que nos testes gerais de fitoquímicos houve espécies de plantas que não apresentaram algumas classes químicas, embora estes testes só tenham sido efetuados nos extratos hidrometanólicos. As análises de HPLC-DAD realizaram-se nos extratos que apresentaram ação inseticida e onde se conseguiram identificar três compostos: o 8-metoxipsoraleno, o psoraleno e o bergapteno, por comparação dos seus tempos de

retenção (TRs) e dos seus espectros UV/vis (forma e máximos de absorvância) com as substâncias de referência.

Em conclusão, os extratos hidrometanólicos parecem não serem os mais indicados para avaliar a ação inseticida, enquanto os extratos de diclorometano e acetato de etilo já apresentaram essa ação. As espécies *A. conyzoides* e *R. graveolens* mostraram ser promissoras no que se refere à sua utilização como inseticidas de origem vegetal, o que deixa perspectivas para novas pesquisas.

Palavras-chave: *Ageratum conyzoides*, *Chelidonium majus*, *Juglans regia*, *Ruta graveolens*, ação inseticida, extratos, solventes, extração, HPLC-DAD, Sf9.

Abstract

This dissertation aims to research and characterize natural insecticides and their effect on insect cells.

It is common knowledge that the greatest weapon against insect pests used, even today, in agriculture are synthetic insecticides, although already known and properly researched, the dangers they cause to other living beings, namely farmers or other consumers and the environment in general.

Hence the numerous studies currently being carried out to replace them with natural insecticides known to be less polluting and less harmful to people and the environment.

In order to better understand this issue and expand learning on the subject, this study was chosen as the object of work in this master's degree.

The work was carried out with support in the vast literature already existing on this theme, trying to reach conclusions and using four species of plants (*Ageratum conyzoides* [Linnaeus, 1753], *Chelidonium majus* [Linnaeus, 1753], *Juglans regia* [Linnaeus, 1753], *Ruta graveolens* [Linnaeus, 1753]) that, because they are considered medicinal, may eventually be used as insecticides of plant origin.

Initially, hydromethane, dichloromethane and ethyl acetate extracts were prepared and the Sf9 insect cells were used to evaluate the cellular viability when they were exposed to the different extracts. General phytochemical tests were also performed on the plant species under study, both in their different dry parts and in their extracts. Finally, HPLC-DAD analyses were performed on the extracts that showed insecticidal action.

In the species *A. conyzoides*, *C. majus*, *J. regia* and *R. graveolens* the hydromethanolic extracts did not present insecticide action. However, dichloromethane and ethyl acetate extracts from *A. conyzoides* and *R. graveolens* species showed insecticidal action. It was observed that in general phytochemical tests there were plant species that did not present some chemical classes, although these tests were only performed in hydromethanolic extracts. HPLC-DAD analyses were performed on extracts that showed insecticidal action and where three compounds were identified: 8-methoxypsoralene, psoralene and bergaptene, by comparing their retention times (TRs) and their UV/vis spectra (form and absorbance maxima) with the reference substances.

In conclusion, hydromethanolic extracts do not seem to be the most indicated to evaluate the insecticide action, while dichloromethane and ethyl acetate extracts have already shown

this action. The species *A. conyzoides* and *R. graveolens* have shown to be promising as regards their use as insecticides of plant origin, which leaves perspectives for further research.

Keywords: *Ageratum conyzoides*, *Chelidonium majus*, *Juglans regia*, *Ruta graveolens*, insecticide action, extracts, solvents, extraction, HPLC-DAD, Sf9.

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo	ii
Abstract.....	iv
Índice de Figuras	viii
Índice de Tabelas	x
Lista de Abreviaturas	xi
1. Introdução	1
1.1. Mecanismos de ação dos inseticidas de origem vegetal	1
1.2. Principais inseticidas de origem vegetal	3
1.2.1. Alcaloides	3
1.2.2. Fenóis.....	6
1.2.3. Terpenos.....	8
1.3. Mecanismos de defesa dos insetos	17
1.4. Espécies de plantas em estudo	17
1.4.1. <i>Ageratum conyzoides</i> (Linnaeus).....	17
1.4.2. <i>Chelidonium majus</i> (Linnaeus).....	20
1.4.3. <i>Juglans regia</i> (Linnaeus)	22
1.4.4. <i>Ruta graveolens</i> (Linnaeus)	25
2. Materiais e Métodos	28
2.1. Reagentes e Substâncias de referência.....	28
2.2. Amostragem	28
2.3. Preparação dos extratos	29
2.4. Cultura celular	30
2.5. Células de inseto Sf9 expostas aos diferentes extratos	31
2.6. Avaliação da viabilidade celular.....	32
2.7. Análise estatística.....	32
2.8. Técnica de microscopia de fluorescência	32
2.9. Testes gerais de pesquisa fitoquímica.....	32
2.9.1. Teste de alcaloides.....	32
2.9.2. Teste de taninos.....	33
2.9.3. Teste de flavonoides	34
2.9.4. Teste de saponósidos.....	35
2.10. Análise cromatográfica.....	36
3. Resultados	37
3.1. Viabilidade celular e análise estatística	37

3.2.	Impacto dos extratos mais potentes na morfologia celular	38
3.3.	Testes gerais de pesquisa fitoquímica: Resultados.....	40
3.3.1.	Teste de alcaloides	40
3.3.2.	Teste de taninos.....	42
3.3.3.	Teste de flavonoides	45
3.3.4.	Teste de saponósidos	50
3.4.	Análise de cromatográfica: Resultados	52
3.4.1.	Cromatograma do extrato diclorometano da espécie <i>R. graveolens</i>	53
3.4.2.	Cromatograma do extrato acetato de etilo da espécie <i>R. graveolens</i> ..	56
3.4.3.	Cromatograma do extrato de diclorometano a 20 mg/mL da espécie <i>A. conyzoides</i>	59
4.	Discussão.....	63
4.1.	Extratos	63
4.2.	Viabilidade celular.....	63
4.3.	Impacto dos extratos mais potentes na morfologia celular	65
4.4.	Testes gerais de fitoquímicos	66
4.4.1.	Teste de alcaloides	66
4.4.2.	Teste de taninos.....	66
4.4.3.	Teste de flavonoides	67
4.4.4.	Teste de saponósidos	68
4.5.	Análise de HPLC	68
5.	Conclusão	70
6.	Bibliografia.....	73

Índice de Figuras

Figura 1: Estrutura química da nicotina.....	4
Figura 2: Estruturas químicas da rianodina (1) e 2- 9,21- desidrorianodina (2).	5
Figura 3: Estrutura química do alcaloide do tipo veratrinas: cevadinha (3) e veratridina (4).	6
Figura 4: Estrutura química da rotenona.	7
Figura 5: Estruturas químicas das: piretrina I (5), cinerina I (6), jasmolina I (7), piretrina II (8), cinerina II (9) e jasmolina II (10).	9
Figura 6: Estruturas químicas dos compostos bioativos da árvore neem: azadiractina ou azadiractina A (11), azadiractina B (12), azadiractina D (13), salanina (14), nimbina (15) e nimbidina (16).	11
Figura 7: Estruturas químicas de compostos presentes em óleos essenciais: 1,8 cineol ou eucaliptol (17), eugenol (18), timol (19) e mentol (20).	12
Figura 8: Os constituintes de OE inibem a atividade da acetilcolinesterase (AChE). ACh- Acetilcolina; nAChr- recetores nicotínicos de acetilcolina; OE- constituintes de óleos essenciais. Adaptado de (83).	13
Figura 9: Estruturas químicas de monoterpenos presentes em óleos essenciais (21) limoneno, (22) linalol, (23) mircenol, (24) terpineol e (25) pulegona.	14
Figura 10: Os constituintes de OE aumentam o fluxo de cloro (Cl ⁻) através da modelação dos recetores GABA. GABA- Ácido gama-aminobutírico; GABA _A - recetores de GABA; OE- constituintes de óleos essenciais. Adaptado de (83).	14
Figura 11: Estrutura química da octopamina.	15
Figura 12: Os constituintes de óleos essenciais bloqueiam os recetores de octopamina. OE- constituintes de óleos essenciais; OAR- recetores octopamina; G- proteína G; cAMP- adenosina monofosfato cíclica; Ca ²⁺ - iões de cálcio; ↑- aumento do nível da molécula. Adaptado de (83).	15
Figura 13: Estruturas químicas da quassina (1) e neoquassina (2).	16
Figura 14: Gráfico da viabilidade celular das células Sf9 em %. As células quando expostas aos extratos hidrometanólicos (A1, A2, A3, A4, A5, A8, A9, A10, A11, A12 e A14) na concentração de 0,5 mg/mL apresentaram viabilidade, enquanto as células expostas aos extratos de diclorometano (A6 e A13), acetato de etilo (A7) e ao clorpirifos (CPF) na concentração 0,1 mg/mL apresentaram uma menor viabilidade.	37
Figura 15: Células Sf9 expostas aos extratos diclorometano e acetato de etilo da espécie <i>R. graveolens</i> , tendo sido incubadas durante 24 horas e a ampliação utilizada foi de 40x. A cromatina foi marcada com DAPI e a actina foi marcada com a faloidina. As setas amarelas indicam a fragmentação da cromatina. Autoria do Prof. Dr. David Pereira.	39
Figura 16: Dois exemplos dos resultados dos testes de alcaloides nas diferentes partes das plantas secas. (a) Resultado Positivo- 1-Reagente de Dragendorff formação de um precipitado laranja; 2- Reagente de Mayer formação de um precipitado amarelo; 3- Reagente de Bertrand formação de um precipitado branco e 4- controlo. (b) Resultado Negativo- 1- Reagente de Drangedorff formação de um precipitado laranja; 2- Reagente de Mayer não houve formação de um precipitado amarelo; 3- Reagente de Bertrand não houve formação de um precipitado branco e 4- controlo. Fotografias da autoria da própria.	41
Figura 17: Teste de alcaloides nos extratos hidrometanólicos. (a) Extrato hidrometanólico de A2 resultado positivo, 1- Reagente de Bertrand formação de um precipitado branco, 2- Reagente de Mayer formação de um precipitado amarelo; 3- Reagente de Dragendorff formação de um precipitado laranja, 4- controlo; (b) Extrato hidrometanólico A3 resultado negativo, 1- Controlo, 2- Reagente de Dragendorff formação de um precipitado laranja, 3- Reagente de Mayer formação de um precipitado amarelo, 4- Reagente de Bertrand sem a formação de um precipitado branco; (c) extrato hidrometanólico A8 resultado negativo, 1- Controlo, 2- Reagente de Dragendorff formação de um precipitado laranja, 3- Reagente de Mayer sem a formação de um precipitado amarelo, 4- Reagente de Bertrand sem a formação de um precipitado branco e (d) Extrato hidrometanólico A9 resultado positivo, 1- Controlo, 2- Reagente de Dragendorff formação de um precipitado laranja, 3- Reagente de Mayer formação de um precipitado amarelo, 4- Reagente de Bertrand formação de um precipitado branco. Fotografias da autoria da própria.	42

Figura 18: Testes negativos nas amostras (A3, A4, A5, A8, A9, A10, A11 e A12) para a reação com a gelatina (a), teste positivo na amostra A14 e no extrato hidrometanólico de A14 (b). Fotografias da autoria da própria.	43
Figura 19: Resultados positivos na reação com os sais metálicos, nas amostras e no extrato hidrometanólico A14. Fotografia da autoria da própria.	44
Figura 20: Resultados positivos na amostra A14 e no extrato hidrometanólico A14 na reação com o acetato de chumbo. Fotografias da autoria da própria.	45
Figura 21: Resultados positivos da amostra A14 e extrato hidrometanólico A14 na reação com o formol clorídrico. Fotografias da autoria da própria.	45
Figura 22: Resultados nas amostras das diferentes partes das plantas secas. 1- controlo, 2- reação com os hidroxilos alcalinos, 3- reação com os sais metálicos e 4- reação da cianidina. Fotografias da autoria da própria.	48
Figura 23: Resultados positivos nos diferentes extratos hidrometanólicos. (a), (b), (c), (d), (e), (g), (j) e (k) 1- controlo; 2- reação com os hidroxilos alcalinos, 3- reação com os sais metálicos e 4- reação da cianidina. (h) e (i) 1- reação cianidina; 2- reação com os sais metálicos; 3- reação com os hidróxidos alcalinos e 4- controlo. (f) 1- reação com os hidróxidos alcalinos; 2- reação com os sais de ferro; 3- reação da cianidina e 4- controlo. Fotografias da autoria da própria.	49
Figura 24: Resultados da reação oxalo-bórica. (a) Amostras que não se obteve fluorescência e uma que obteve fluorescência. (b) Amostra A10 que adquiriu fluorescência vermelha. (c) Amostra A8 que adquiriu fluorescência. (d) Extrato hidrometanólico A8 adquiriu fluorescência. (e) Extrato hidrometanólico A1 adquiriu fluorescência e (f) Extrato hidrometanólico A2 adquiriu fluorescência. Fotografias da autoria da própria.	50
Figura 25: Resultados dos testes de saponósidos nas amostras das diferentes partes das plantas secas e no extrato hidrometanólico A14. Resultados positivos estão nos retângulos vermelhos. ...	52
Figura 26: Cromatograma completo do extrato diclorometano a 20 mg/mL da espécie <i>R. graveolens</i> e a 250 nm.	53
Figura 27: Cromatograma parcial do extrato diclorometano a 20 mg/mL da espécie <i>R. graveolens</i> e a 250 nm. 1- Psoraleno. *8-Metoxipsoraleno.	54
Figura 28: Cromatograma completo do extrato diclorometano a 20 mg/mL da espécie <i>R. graveolens</i> e a 320 nm.	54
Figura 29: Cromatograma parcial do extrato diclorometano a 20 mg/mL da espécie <i>R. graveolens</i> e a 320 nm.	55
Figura 30: Espectros UV/vis do extrato diclorometano da espécie <i>R. graveolens</i> . Pico identificado: Pico 1- psoraleno.	55
Figura 31: Cromatograma completo do extrato de acetato de etilo a 20 mg/mL da espécie <i>R. graveolens</i> a 250 nm.	56
Figura 32: Cromatograma parcial do extrato de acetato de etilo a 20 mg/mL da espécie <i>R. graveolens</i> a 250 nm. 1-Psoraleno.	57
Figura 33: Cromatograma completo do extrato de acetato de etilo a 20 mg/mL da espécie da <i>R. graveolens</i> a 320 nm.	57
Figura 34: Cromatograma parcial do extrato de acetato de etilo a 20 mg/mL da espécie <i>R. graveolens</i> a 320 nm.	58
Figura 35: Espectros UV/vis do extrato de acetato de etilo da espécie <i>R. graveolens</i> . Pico identificado: Pico 1-psoraleno	58
Figura 36: Cromatograma completo do extrato diclorometano a 20 mg/mL da espécie <i>A. conyzoides</i> a 250 nm.	59
Figura 37: Cromatograma parcial do extrato de diclorometano a 20 mg/mL da espécie <i>A. conyzoides</i> a 250 nm. 1-Psoraleno. 2-Bergapteno.	60
Figura 38: Cromatograma completo do extrato de diclorometano a 20 mg/mL da espécie <i>A. conyzoides</i> a 320 nm.	60
Figura 39: Cromatograma parcial do extrato de diclorometano a 20 mg/mL da espécie <i>A. conyzoides</i> a 320 nm.	61
Figura 40: Espectros UV/vis do extrato de diclorometano da espécie <i>A. conyzoides</i> . Picos identificados: Pico 1- psoraleno e Pico 2: bergapteno.	61

Índice de Tabelas

Tabela 1: Mecanismos/Alvos de ação de inseticidas de origem vegetal. Adaptado de (13).	2
Tabela 2: Compostos bioativos da espécie <i>A. conyzoides</i> .	19
Tabela 3: Compostos bioativos de <i>C. majus</i> .	21
Tabela 4: Compostos bioativos de <i>J. regia</i> .	23
Tabela 5: Compostos bioativos de <i>R. graveolens</i> .	25
Tabela 6: Espécies das plantas utilizadas e o seu peso seco em gramas (g).	29
Tabela 7: Identificação dos extratos brutos pelo código alfanumérico e suas massas em miligramas (mg).	30
Tabela 8: Preparação dos tubos de ensaio para o teste dos saponósidos.	35
Tabela 9: Resultados da viabilidade celular em % dos diferentes extratos a diferentes concentrações.	38
Tabela 10: Resultados do teste de alcaloides nas diferentes partes das plantas secas em estudo.	40
Tabela 11: Resultados do teste de alcaloides nos extratos hidrometanólicos.	41
Tabela 12: Resultados do teste de taninos nas diferentes partes das plantas secas e no extrato hidrometanólico.	43
Tabela 13: Resultados do teste de flavonoides nas diferentes partes das plantas secas.	46
Tabela 14: Resultados do teste de flavonoides nos extratos hidrometanólicos, diclorometano e acetato de etilo (A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12, A13 e A14).	47
Tabela 15: Resultados do teste dos saponósitos nas diferentes partes das plantas secas e no extrato hidrometanólico A14.	51
Tabela 16: Cromatograma do extrato diclorometano da espécie <i>R. graveolens</i> a 20 mg/mL e respectivos picos estão assinalados na Figura 27.	53
Tabela 17: Cromatograma do extrato de acetato de etilo a 20 mg/mL da espécie <i>R. graveolens</i> e respectivos picos estão assinalados na Figura 32.	56
Tabela 18: Cromatograma do extrato de diclorometano da espécie <i>A. conyzoides</i> e respectivos picos estão assinalados na Figura 37.	59

Lista de Abreviaturas

AChE- Acetilcolinesterase

ATP- Adenosina trifosfato

ATPases- Adenosinatrifosfatases

Ca²⁺- iões de cálcio

CE- Comunidade Europeia

CPF- Clorpirifos

DL₅₀- Dose letal 50

K⁺- iões de potássio

Na⁺- iões de sódio

DDT- Diclorodifeniltricloroetano

DMSO- Dimetilsulfóxido

MeOH- Metanol

MTC- Medicina Tradicional Chinesa

nAChRs- Recetores nicotínicos de acetilcolina

NADH- Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzido

OA- Octopamida

OE- Óleos essenciais

P-GP- Glicoproteína P

ROS- Espécies reativas de oxigénio

SBF- Soro bovino fetal

SNC- Sistema nervoso central

TRs- Tempos de retenção

1. Introdução

Os pesticidas inseticidas sintéticos são, ainda hoje, a principal “arma” contra pragas de insetos na agricultura, apesar de apresentarem efeitos adversos graves para organismos não-alvo nos quais podem surgir resistências, como tem vindo a ser demonstrado em vários estudos efetuados (1–7).

Apresentam, inclusivamente, riscos de intoxicação para agricultores ou outros consumidores/utilizadores, para além de serem dispendiosos e revelarem deficiências nos estudos de impacto ambiental (1–7).

Dadas essas desvantagens, a tendência atual é o uso de inseticidas de origem natural, por serem considerados menos tóxicos ou não tóxicos, embora a extensão dessa toxicidade continue a ser o objeto de estudo de diversos trabalhos de investigação (2,8).

1.1. Mecanismos de ação dos inseticidas de origem vegetal

Algumas espécies de plantas sintetizam uma ampla gama de compostos de defesa moderadamente tóxicos, ou um pequeno número de substâncias com elevada toxicidade. Alguns insetos herbívoros, alimentam-se de uma variedade de plantas, as quais possuem substâncias tóxicas com efeitos inespecíficos numa gama alargada de alvos moleculares (Tabela 1). Os alvos variam entre proteínas (enzimas, recetores, canais iónicos, proteínas estruturais), ácidos nucleicos, membranas, metabolitos secundários com interações específicas ou inespecíficas e outros componentes celulares (9). Os metabolitos secundários das plantas, como por exemplo os alcaloides, podem interferir nos neuro-recetores (através da inibição competitiva da ligação do ligando por um alcaloide antagonista ou por ativação agonista de um recetor por um alcaloide com estrutura química semelhante ao ligando endógeno), mas também podem interferir com certos componentes do sistema de sinalização celular numa enzima vital ou na sinalização do sistema nervoso (como a síntese, o armazenamento, a libertação, a ligação e a recaptção de neurotransmissores) (10). Os inseticidas fitoquímicos normalmente apresentam mecanismos de ação que podem ser diferentes, como ação de inibição da muda, redução do crescimento, perda de fertilidade e inibição respiratória (11–13).

Tabela 1: Mecanismos/Alvos de ação de inseticidas de origem vegetal. Adaptado de (13).

Sistema	Mecanismos /Alvos de ação	Composto	Fonte vegetal	Referências
Sistema colinérgico	Inibe a acetilcolinesterase (AChE)	Componentes dos óleos essenciais	<i>Azadirachtina indica</i> (Jussieu, 1832), <i>Mentha</i> spp. <i>Lavandula</i> spp.	(14–18)
	Recetor nicotínico de acetilcolina colinérgico agonista / antagonista	Nicotina	<i>Nicotiana</i> spp. (Linnaeus, 1753), <i>Delphinium</i> spp. (Linnaeus, 1753), <i>Haloxylon salicornicum</i> (Boissier, 1879), <i>Stemona japonicum</i> (Blume, 1867)	(19,20)
Sistema GABA	Canal de cloro controlado por GABA	Timol, silfenenos	<i>Thymus vulgaris</i> (Linnaeus, 1753)	(21–23)
	Interrompe a troca de iões de sódio e potássio	Piretrina	<i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i> (Linnaeus, 1753)	(24)
Sistema mitocondrial	Inibidor da respiração celular (inibidor do transporte de eletrões do complexo mitocondrial I ou METI)	Rotenona	<i>Lonchocarpus</i> spp. (Kunth, 1824)	(25–28)
	Afeta os canais de cálcio	Rianodina	<i>Ryania</i> spp. (Vahl, 1797)	(29)
	Afeta a ação da membrana da célula nervosa	Sabadila	<i>Schoenocaulon officinale</i> (Schltdl. & Cham., 1840)	(30)
Sistema octopaminérgico	Recetores octopaminérgicos	Componentes dos óleos essenciais	<i>Cedrus</i> spp. (Trew, 1757), <i>Pinus</i> spp. (Linnaeus, 1753), <i>Citronella</i> spp. (D. Don, 1832), <i>Eucalyptus</i> spp. (L'Héritier, 1789)	(31–33)
	Bloqueia os recetores da octopamina, trabalhando através da cascata de recetores de tiramina	Timol	<i>Thymus vulgaris</i> (Linnaeus, 1753)	(31,34)
Diversos	Rutura do equilíbrio hormonal	Azadiractina	<i>Azadiractina indica</i> (Jussieu, 1832)	(35,36)

1.2. Principais inseticidas de origem vegetal

Entre os inseticidas de origem vegetal mais importantes encontram-se a nicotina, o composto bioativo principal encontrado no extrato de *Nicotiana tabacum* (Linnaeus, 1753), a rianodina, composto bioativo da *Ryania speciosa* (Vahl, 1797), a sabadila, um dos compostos bioativos do *Schoenocaulon officinale* (Schltld. & Cham., 1840), a rotenona, composto bioativo do *Lonchocarpus utilis* (A. C. Sm., 1937), a piretrina, metabolito secundário do piretro dalmata *Tanacetum cinerariifolium* (Sch.Bip., 1844), a azadiractina, o composto bioativo do neem (*Azadirachta indica* [Jussieu, 1832]), os óleos essenciais (óleos de alecrim, de eucalipto, de cravo-da-índia, de tomilho de jardim e de hortelã-verde, entre outros) e a quassina e neoquassina, compostos bioativos da *Quassia amara* (Linnaeus, 1762), (1–7,37).

1.2.1. Alcaloides

1.2.1.1. Nicotina

A nicotina (Figura 1) é um alcaloide (de núcleos piridínico e pirrolidínico) obtido das folhas da planta do tabaco (*Nicotiana tabacum* [Linnaeus, 1753]) com um longo historial de uso como inseticida (38). É, provavelmente, o mais conhecido e foi isolado pela primeira vez em 1828 por Posselt e Reimann, mas a sua estrutura química foi determinada por Pinner em 1893. A nicotina, tal como a nornicotina e a anabasina são agressores sinápticos que imitam o neurotransmissor acetilcolina. A intoxicação por nicotina é muito semelhante à provocada pela acetilcolina porque os recetores de nicotina e de acetilcolina não conseguem distinguir uma da outra, havendo, por isso, uma interação que leva à estimulação do sistema nervoso central (SNC). A nicotina pode exercer efeitos farmacológicos ou tóxicos em insetos e mamíferos, ativando os recetores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) (39,40). Nos insetos esses efeitos expressam-se no SNC e nos mamíferos nas junções neuromusculares do sistema nervoso periférico (SNP) e no SNC. A inativação do recetor resulta na interação da nicotina com nAChRs, produzindo uma grande estimulação que provoca a despolarização prolongada e, em doses altas, uma estimulação parassimpática e um bloqueio ganglionar e neuromuscular. Nos vertebrados a nicotina apresenta uma toxicidade oral aguda alta, com a LD₅₀ abaixo dos 50 mg/Kg. Devido à sua rápida absorção pode provocar a morte em poucos minutos após a intoxicação, por insuficiência respiratória e paralisia dos músculos respiratórios. A

intoxicação por nicotina pode ser resultado da exposição a produtos de tabaco, goma ou emplastos e apresenta, nos humanos, sinais e sintomas como náuseas, vômitos, fraqueza muscular, problemas respiratórios, dor de cabeça, letargia e taquicardia. A doença do tabaco verde ocorre nos trabalhadores que cultivam, colhem ou manipulam o tabaco devido à absorção dérmica de nicotina. Em ratos, na exposição aguda a sulfato de nicotina, a DL_{50} oral é de 83 mg/Kg e a DL_{50} dérmica é de 285 mg/Kg (11,13,41–43).

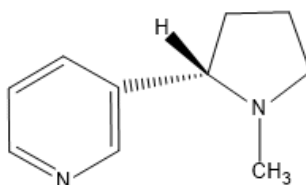


Figura 1: Estrutura química da nicotina.

1.2.1.2. Rianodina

A planta *Ryania speciosa* (Vahl, 1797), contem, nos caules e raízes, alcaloides designados por rianodina e por 9,21-desidrorianodina (Figura 2), os quais são responsáveis pela atividade inseticida desta planta. A rianodina liga-se e bloqueia os canais de cálcio (Ca^{2+}) provocando a inibição da contração muscular (esquelética e cardíaca) e as junções neuromusculares o que a torna eficaz tanto pelo contacto como pela ingestão, onde atua como um agressor de ação lenta para o estômago inibindo a capacidade alimentar das espécies lagarta-da-espiga de milho (*Helicoverpa zea*; [Boddie, 1850]), broca-do-milho (*Ostrinia nubilalis*; [Hübner, 1796]) e mariposa (*Cydia pomonella*, [Linnaeus, 1758]) (13,42,44). Nos vertebrados e invertebrados as propriedades fisiológicas e toxicológicas apresentadas pela rianodina levam à ativação dos canais de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático do músculo esquelético e cardíaco provocando o fluxo de íões de cálcio para as células e a morte segue-se muito rapidamente (43,45). A própria rianodina já foi utilizada como inseticida, mas como apresentou toxicidade em mamíferos deixou de ser usada. As diamidas (poliaminas, compostos orgânicos) ativam os recetores de rianodina, que pertencem à família de canais de cálcio. Quando a diamida entra no sistema nervoso ativa os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem levando a um aumento do cálcio intracelular e desencadeando a ativação dos recetores de rianodina localizados no retículo sarcoplasmático. Estes, por sua vez, provocam a libertação dos reservatórios do cálcio e modificam o início da contração muscular. Nos insetos, estes recetores são ativados porque as diaminas se ligam num local diferente da rianodina. As espécies do género

Ryania que contém rianodina têm uma toxicidade baixa em mamíferos. As preparações de *Ryania* sp. estão disponíveis como inseticidas de origem vegetal (45). Os compostos de rianodina purificada são cerca de setecentas vezes mais tóxicos do que a própria *Ryania* sp. e também possuem uma atividade residual mais longa que outros inseticidas de origem vegetal. No composto ativo rianodina, a LD₅₀ é de 0,39 mg/Kg em adultos da espécie *Musca domestica* (Linnaeus, 1758). As vantagens do uso destes compostos é a baixa toxicidade para humanos e a falta de persistência e bioacumulação. Não existem evidências destes compostos serem genotóxicos, carcinogênicos, neurotóxicos ou de apresentarem toxicidade reprodutiva ou de desenvolvimento, além de terem uma toxicidade aguda baixa (DL₅₀ oral = 2000-5000 mg/Kg) (4,11,42,43,45).

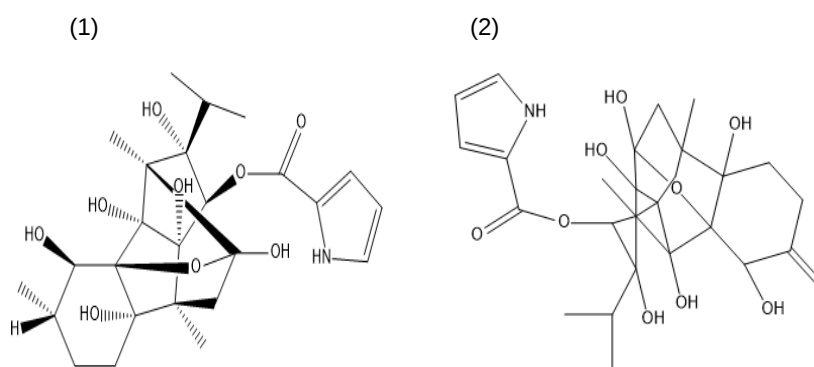


Figura 2: Estruturas químicas da rianodina (1) e 2- 9,21- desidrorianodina (2).

1.2.1.3. Sabadila

A sabadila é um inseticida botânico que pode ser obtido das sementes de lírio sabadila da espécie *Schoenocaulon officinale* (Schltdl. & Cham, 1925). Tem sido utilizada para controle de pragas há vários séculos. Os alcaloides que se obtêm da sabadila são geralmente conhecidos por veratrinas, das quais as principais são a veratridina e a cevadinha (Figura 3) (3,4,46). O seu modo de ação é semelhante ao das piretrinas, mas estruturalmente não é similar a forma como afeta os canais de sódio voltagem dependentes dos axónios nervosos (13). A sabadila afeta as membranas das células nervosas originando perda da função nervosa, paralisia e morte. Esta é eficaz quando ingerida ou em contacto com as larvas, tripes e percevejos. A sabadila é muito tóxica para as abelhas, mas degrada-se rapidamente quando exposta ao ar e à luz solar e possui apenas uma toxicidade residual. Dayan e os colaboradores consideram a sabadila menos tóxica que outros inseticidas botânicos uma vez que apresenta uma DL₅₀ de 4000 a 5000 mg/Kg em mamíferos (4,13,42,43,47).

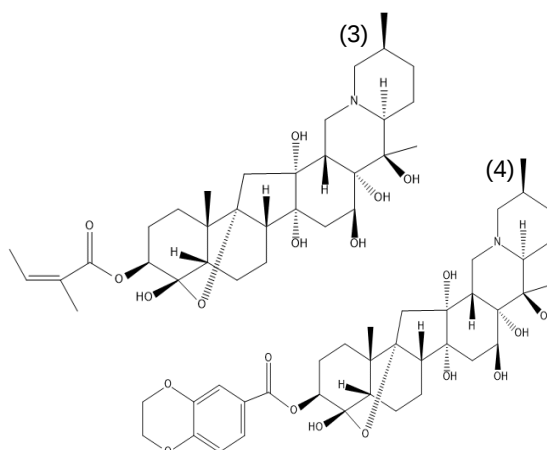


Figura 3: Estrutura química do alcaloide do tipo veratrinas: cevadinha (3) e veratridina (4).

A veratridina, pseudoalcaloide esteroídico, pode ser encontrado em espécies de plantas, como o Heléboro branco europeu (*Veratrum album* [Linnaeus, 1753]). A veratridina possui maior ação inseticida causando aumento na duração do potencial de ação, disparo repetitivo e despolarização da membrana nervosa. Os alcaloides veratrinos, quando puros, apresentam uma toxicidade elevada para os mamíferos com a DL_{50} oral de 13 mg/Kg em ratos (42). Estes compostos são eficazes contra a lagarta-da-espiga de milho (*H. zea*), broca-do-milho (*O. nubilalis*) e tripses da ordem Thysanoptera (Haliday, 1836) quer pelo efeito de contacto, quer pelo efeito da ingestão do produto. São considerados agressores de ação lenta no estômago porque impedem os insetos de se alimentarem, logo após a sua ingestão (4,13,43,44,47).

A cevadinha, quando pura, é também um pseudoalcaloide esteroídico e, como tal, considerada extremamente tóxica para os mamíferos, apresentando uma DL_{50} oral de 50 mg/Kg em ratazanas (42).

1.2.2. Fenóis

1.2.2.1. Rotenona

A rotenona (Figura 4) é um isoflavonoide, cromanocromanona que pode ser encontrado em 65 espécies de plantas, entre elas, o cubé ou barbasco (*Lonchocarpus utilis* [A. C. Sm.,1937]) e a Derris (*Derris elliptica* [Wall. Benth,1860]) que pertencem há família das (Fabeaceae [Lindl, 1836]). Começou a ser utilizada como inseticida há mais de 150 anos atuando como inibidor metabólico e como veneno ou toxina neurotóxicos (3,4). A rotenona, presente por exemplo nas espécies *D. elliptica* e *L. utilis*, interrompe o metabolismo energético das mitocôndrias celulares, inibe o sistema de transporte de eletrões e

desacopla o sistema de transporte de ATP (trifosfato de adenosina) (44). Também bloqueia a transferência de elétrons dos centros de Ferro-Enxofre do complexo I para a ubiquinona, impedindo a síntese da energia utilizável (ATP) (48) e interfere com o sistema de transporte de elétrons entre a NADH desidrogenase (NADH-ubiquinona oxidorreductase ou Complexo I) e a coenzima Q no complexo I (conservador de energia), mas também com a piericidina-A (inibidor da NADH desidrogenase), causando uma redução severa no consumo de oxigênio (49,50).

Nos insetos, a rotenona é convertida em metabolitos muito tóxicos, mas nos mamíferos ela é destoxificada. O envenenamento por inseticida ocorre também por afetar a atividade da fosforilação de proteínas (H-ATP: bomba de prótons) ou outro sistema de enzimas (como a adenosinatrifosfatases ou ATPase) (13,50).

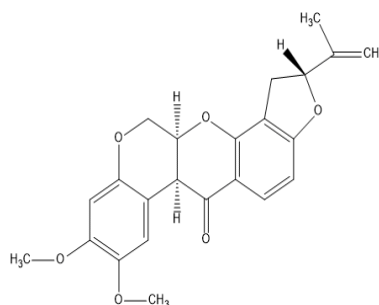


Figura 4: Estrutura química da rotenona.

A rotenona apresenta um comportamento semelhante ao da piretrina, embora possuindo uma ação mais forte e maior persistência. A sua eficácia deve-se à ação neurotóxica rápida nos insetos que é designada por “efeito *knockdown*” (51). É utilizada contra pulgões, tripes (bicho da madeira) e outro tipo de insetos da fruta e vegetais. Aumenta a mortalidade dos insetos e a sua reprodução é afetada negativamente. Alguns estudos demonstraram que a ação da rotenona e dos seus derivados faz com que os insetos deixem de se alimentar. É considerada um agressor estomacal, uma vez que tem de ser ingerida para ser eficaz (48,51). As espécies de insetos Lepidoptera (Linnaeus, 1758) apresentam uma sensibilidade diferente a este composto. Quando existe a ingestão de rotenona parece diminuir a quantidade de alimento absorvido pelas larvas e também a capacidade de conversão do alimento absorvido em biomassa. A rotenona é um composto inseticida tóxico para as abelhas se usado em conjunto com a piretrina, mas quando utilizado isoladamente controla pragas de ácaros *Varroa jacobsoni* (Oudemans, 1904) que afetam as suas colônias (4,51).

A rotenona apresenta toxicidade para os mamíferos ou vertebrados que pode ser comparada ao uso de diclorodifeniltricloroetano (DDT) nos ratos e a sua DL_{50} por via oral é de 132 mg / kg, mas as suas formulações apresentam muito menos toxicidade. Recentemente a segurança da rotenona foi questionada em função de relatos controversos na exposição aguda em ratos. Alguns trabalhos referem que produz lesões cerebrais semelhantes às encontradas em humanos e outros animais com doença de *Parkinson*, pela sua persistência nas culturas alimentares depois dos tratamentos (49).

A rotenona tem uma toxicidade aguda alta em roedores e cães e é menos tóxica em coelhos e aves (52). Os sintomas de intoxicação são o aumento inicial das taxas cardíacas e respiratórias, espasmos clónico-tónicos e depressão muscular, seguida por depressão respiratória. Em humanos a intoxicação aguda é rara, tendo sido relatados apenas dois casos. Num dos estudos efetuados em ratos, verificou-se que a rotenona tinha danificado a via dopaminérgica nigrostriatal devido à formação de espécies reativas de oxigénio (ROS), de forma muito semelhante à que foi observada no 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP^+ , o metabolito ativo de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina [MPTP]) que é o composto químico causador do parkinsonismo e também da inibição do complexo I (53). Foram efetuados estudos onde se demonstrou que a administração de rotenona (2-3 mg/kg por dia durante uma a cinco semanas) em ratos, causava a degeneração nigrostriatal seletiva e a inibição do complexo I em todo o cérebro uniformemente (54–56). Concluíram, assim, que existe uma associação entre o uso de rotenona e o aumento do risco de doença de *Parkinson* (7,11,42,43,51,57).

Na Europa, as formulações que contêm rotenona são utilizadas como agentes de proteção na agricultura biológica, embora em alguns países europeus, como a Áustria, Itália, Espanha e Suíça, a sua utilização seja parcialmente limitada (4,42,43).

1.2.3. Terpenos

1.2.3.1. Piretrinas

As piretrinas estão registadas como pesticidas que podem ser encontrados em mais de 2000 produtos comercializados em todo o mundo. As piretrinas, tal como outros inseticidas piretroides, são neurotóxicos. As piretrinas naturais têm excelentes propriedades inseticidas para controlar os insetos nocivos nos agregados familiares e nas explorações agrícolas. A utilização de piretrinas naturais é também permitida na produção biológica, nos termos do Regulamento (CE) n.º 889/2008 (CE, 2008) (58).

A piretrina é um metabolito secundário das plantas piretro dalmata (*Tanacetum cinerariifolium* [Trev./Schultz Bip., 1844]) e crisântemos (*Chrysanthemum cinerarifolium* [Linnaeus, 1753]) (3,47,59). O piretro é uma mistura de vários compostos (piretrina I e II, cinerina I e II e jasmolina I e II) (Figura 5), os quais são terpenos formados a partir da esterificação de retronolona com o ácido crisantêmico ou ácido piretrico (4,60–62). Tal como a piretrina, o piretro afeta o SNC dos insetos, bloqueando as junções nervosas que são fechadas através dos canais de sódio (Na^+), provocando a diminuição dos impulsos nervosos. As piretrinas I e II são as que apresentam atividade inseticida. A piretrina I é muito tóxica para os insetos e atua em poucos minutos, quando usada isoladamente. A piretrina II demora algumas horas a fazer efeito e provoca a queda dos organismos, mas não a morte imediata. Os insetos têm capacidade de metabolizar a piretrina II o que, em alguns deles, facilita a sua recuperação (47).

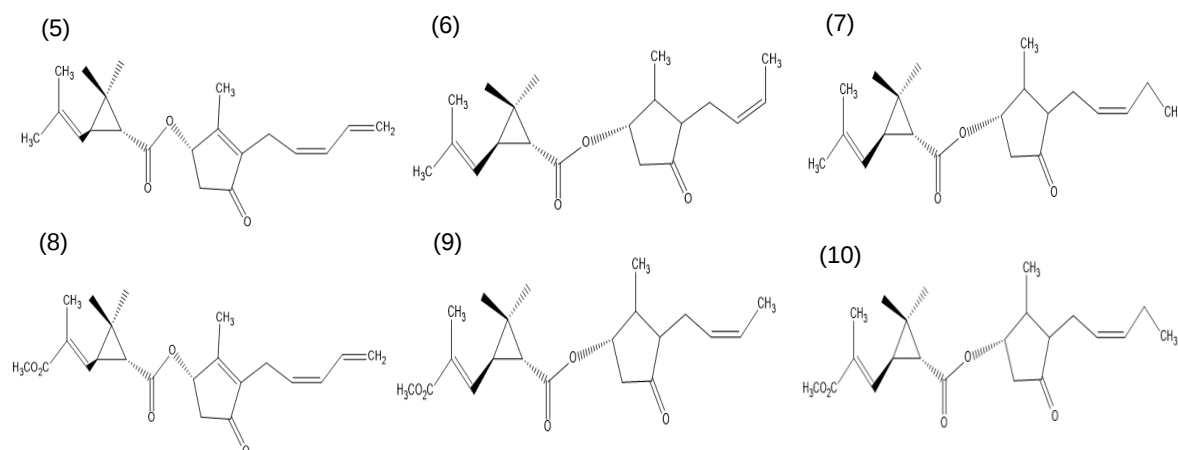


Figura 5: Estruturas químicas das: piretrina I (5), cinerina I (6), jasmolina I (7), piretrina II (8), cinerina II (9) e jasmolina II (10).

As piretrinas são consideradas agressores de contacto, mas também penetram rapidamente no SNC. A piretrina I perturba o sistema nervoso do inseto, agindo sobre o canal de sódio (Na^+) dependente de voltagem nos axónios nervosos, provocando o bloqueio das junções nervosas e causando os efeitos de colapso, paralisia e morte (15,44). A piretrina I tem um efeito "knockdown" e a piretrina II provoca alguma hiperatividade seguida de convulsões (4,43,48,63,64). As piretrinas atuam nas membranas nervosas, provocando a modificação dos canais de sódio (Na^+), (prolongando a sua abertura, do que resulta um maior fluxo de sódio [Na^+] e de potássio (K^+) nos neurónios e, desse modo, a despolarização das membranas (65,66). O resultado deste bloqueio leva a uma libertação significativa de acetilcolina a nível sináptico. O aumento de acetilcolina provoca a dessensibilização dos recetores pós-sinápticos e desencadeia, através de uma alimentação negativa dos recetores pré-sinápticos, uma inibição da libertação de acetilcolinesterase. A transmissão sináptica é então bloqueada, o que leva à paralisia do

inseto seguida da sua morte (39). As piretrinas apresentam uma toxicidade baixa nos mamíferos, uma vez que estes possuem enzimas microssomais hepáticas e esterases que levam à sua degradação. Nos testes de toxicidade em ratos a DL₅₀ aguda é de 1500 mg/Kg e a DL₅₀ oral varia entre 350 a 500 mg/Kg. As fórmulas comerciais são consideravelmente as menos tóxicas (1500 mg/Kg) (4,42,48). As piretrinas provocam reações como dermatites de contato e reações respiratórias alérgicas, mas estas devem-se a outros constituintes das formulações. Os sintomas de intoxicação por piretrinas são caracterizados por hiperexcitabilidade, convulsões e por fim a morte (4,13,41–43). Existem poucos estudos sobre os efeitos das piretrinas naturais a nível celular e sobre os mecanismos moleculares subjacentes às mesmas, tendo sido a autofagia um desses mecanismos. Os efeitos tóxicos dos piretroides para as células incluem danos no DNA, inibição do complexo mitocondrial I, e indução da acumulação de espécies reativas de oxigénio (ROS) (67).

1.2.3.2. Azadiractina

O neem ou lilás indiano (*Azadirachta indica* [Jussieu, 1832]) é uma árvore que apresenta vários compostos bioativos como azadiractina (azadiractina A), salanina, nimbina, nimbidina, 3-tigloilazadiractol (azadiractina B) e 1-tigloil-3-acetil-11-hidroxi-mielcarpina (azadiractina D) sendo todos limonoides, tetranortriterpenos (Figura 6) (4,36,42,51,64,68). Estes compostos têm bioatividade descrita contra mais de 550 espécies de insetos, principalmente Coleoptera (Linnaeus, 1758; [besouros e gorgulhos]), Dictyoptera (Latreille, 1829; [baratas e louva-a-deus]), Diptera (Linnaeus, 1758; [moscas]), Heteroptera (Latreille, 1810; [percevejo]), Homoptera (Boisduval, 1829 [pulgões, vespas e formigas]), Isoptera (Brullé, 1832 [térmitas]), Lepidoptera (mariposas e borboletas), Orthoptera (Latreille, 1793 [gafanhotos]), Siphonaptera (Latreille, 1825 [pulgas]) e Thysanoptera (tripes) (4,48). Mais de 100 formulações comerciais de neem são utilizadas em todo o mundo e as fórmulas comerciais funcionam como agressores estomacais, embora possam causar intoxicação por contacto, quando aplicadas em doses mais elevadas (4,69). Após a exposição à azadiractina surge supressão imediata do apetite, bem como envenenamento sistémico e inibição da ecdise (42). Pode também induzir atraso ou mesmo interrupção no desenvolvimento pós-embrionário, oviposição defeituosa, infertilidade, inibição da síntese enzimática e da formação de quitina (48,70). Os dois efeitos primários da azadiractina parecem ser o bloqueio dos canais de cálcio e a apoptose pela via mitocondrial das células (39,71,72). Estas duas ações induzem o bloqueio da mitose e uma redução na síntese de proteínas de insetos das espécies de traça do exército (*Spodoptera frugiperda* [J.E. Smith,

1797)], de lagarta do tabaco (*Spodoptera litura* [Fabricius, 1775]), de traça *Trichoplusia ni* [Hübner, 1803]) e de mosquito tigre asiático (*Aedes albopictus* [Skuse, 1894]), entre outras (71,73,74).

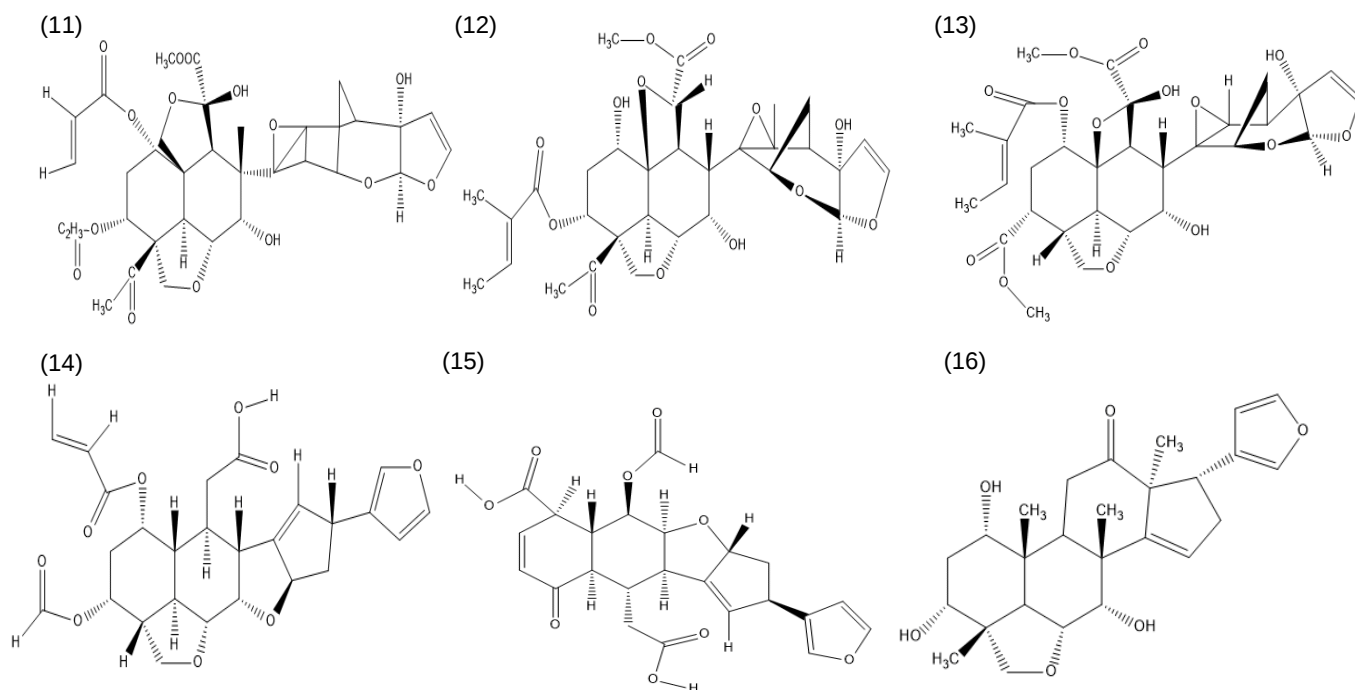


Figura 6: Estruturas químicas dos compostos bioativos da árvore neem: azadiractina ou azadiractina A (11), azadiractina B (12), azadiractina D (13), salanina (14), nimbina (15) e nimbidina (16).

A azadiractina foi isolada em 1968, mas a sua estrutura química só foi determinada vários anos depois. É responsável por diversas atividades inseticidas, fungicidas, nematicidas, bactericidas e repelentes e inibe a atividade da AChE na (*Nilaparvata-lugens* [Stål, 1854]) (cigarrinha marron do arroz) (13). A inibição da AChE provoca a acumulação de acetilcolina nas sinapses, provocando um estado de estimulação permanente na membrana pós-sináptica, o que resulta em ataxia, ou seja, falta geral de coordenação no sistema neuromuscular, e eventual morte (13).

A azadiractina é um inseticida anti-mitótico (fase G2/M da divisão celular) (75) e vários estudos com a azadiractina radiomarcada, indicaram especificamente a sua localização no corpo cardíaco (76,77). Apresenta efeitos na regulação de crescimento e na alimentação em algumas espécies de insetos (13). Também interfere no seu sistema neuro-endócrino, onde interrompe o crescimento, a muda e a metamorfose, bloqueia a reprodução (redução da fertilidade, fecundidade e oviposição) e pode causar anorexia. A azadiractina ou azadiractina A atua na glândula protorácica e inibe a síntese e a liberação das hormonas da muda (ecdisona), o que leva a uma ecdise incompleta dos insetos imaturos (42). Um mecanismo semelhante ocorre levando à esterilidade das fêmeas adultas (13). Apresenta

o efeito anti-mitótico também em diferentes linhas celulares de mamíferos como as células de ovário de hamster chinês (78).

A azadiractina apresenta uma baixa toxicidade aguda nos mamíferos e os ratos podem apresentar uma DL_{50} superior a 5000 mg/Kg (48). Dependendo das plantas tratadas com azadiractina e das condições ambientais, os seus efeitos podem durar entre 4 a 8 dias. Apresenta também efeitos reduzidos nos organismos não-alvo mas a ingestão de azadiractina pode levar a efeitos fisiológicos deletérios como por exemplo a não alimentação e não apresenta efeitos tóxicos quando administrada topicamente e por injeção (7,43,51).

1.2.3.3. Óleos essenciais

Os óleos essenciais (OE) são matrizes naturais que estão presentes em várias famílias (Lamiaceae [Adanson, 1820], Myrtaceae [Jussieu, 1789], Asteraceae [Bercht & Presl, 1820], Rutaceae [Jussieu, 1789], Apiaceae [Lindley, 1836], Laureaceae [Jussieu, 1789], Cupressaceae [Sweet, 1822], Poaceae [Barnhart, 1895], Zingiberaceae [Martinov, 1820] e Piperaceae [Engler, 1792]) e possuem um grande potencial inseticida (4,79). São produzidos comercialmente como inseticidas, fungicidas e herbicidas para aplicações agrícolas e industriais, utilizando como ingredientes ativos 1,8-cineol ou eucaliptol, o principal constituinte dos óleos de alecrim (*Rosmarinus officinalis* [Linnaeus, 1753]) e de eucalipto (*Eucalyptus globulus* [La Billardiére, 1800]), o eugenol do óleo de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* [L./ Merrill & Perry, 1939]), o timol do tomilho de jardim (*Thymus vulgaris* [Linnaeus, 1753]) e o mentol de várias espécies de hortelã-verde (*Mentha spicata* [Linnaeus, 1753]) (Figuras 7) (5).

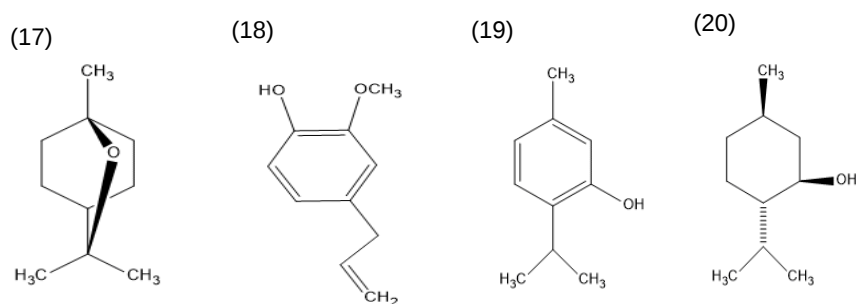


Figura 7: Estruturas químicas de compostos presentes em óleos essenciais: 1,8 cineol ou eucaliptol (17), eugenol (18), timol (19) e mentol (20).

A eficácia dos óleos essenciais no controlo dos insetos depende diretamente da sua composição química a qual, por sua vez, está relacionada com as práticas de cultivo, as condições ambientais, os processos extrativos e a própria espécie em causa (48). São basicamente matrizes lipofílicas que atuam como toxinas ou como dissuasores da alimentação, do acasalamento e da oviposição de uma grande variedade de pragas de insetos (80). Podem afetar os processos bioquímicos, e perturbar especificamente o seu equilíbrio endócrino normal. São neurotóxicos e considerados como reguladores do crescimento dos insetos, interrompendo o processo normal de morfogénese (processo da indução da proliferação e da diferenciação celular) (4,13,81).

Os óleos essenciais extraídos das plantas das famílias Meliaceae (Jussieu, 1789) e Rutaceae são óleos cítricos, com predominância de limoneno e linalol e atuam por contacto e no SNC. O limoneno apresenta toxicidade em todas as fases do ciclo de vida da mosca (ovos, larvas, pupas e adultos) e o linalol é tóxico para os ovos e larvas das moscas da fruta do Caribe (*Anastrepha suspensa* [Loew, 1862]). Foi observado que o linalol afeta o transporte iónico e a libertação da acetilcolina (inibidor da acetilcolinesterase [AChE]) dos insetos (82) (Figura 8).

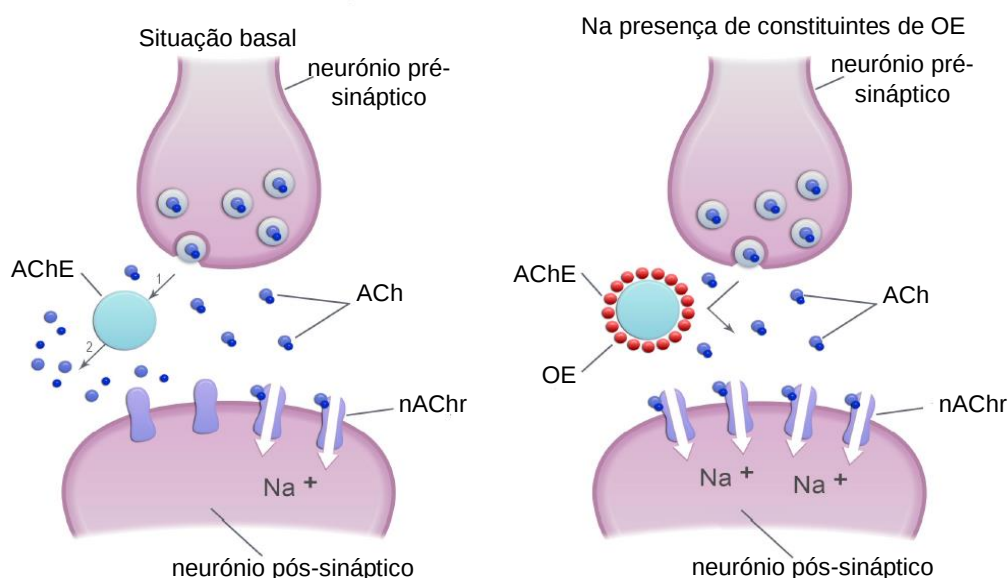


Figura 8: Os constituintes de OE inibem a atividade da acetilcolinesterase (AChE). ACh- Acetilcolina; nAChR- receptores nicotínicos de acetilcolina; OE- constituintes de óleos essenciais. Adaptado de (83).

Nas moscas domésticas e nas baratas alemãs (*Blattella germanica* [Linnaeus, 1767]) foram testados vários monoterpenos (mirceno, terpineol, linalol e pulegona) que apresentam neurotoxicidade e são importantes componentes de óleos essenciais (Figura 9) (4,13,64).

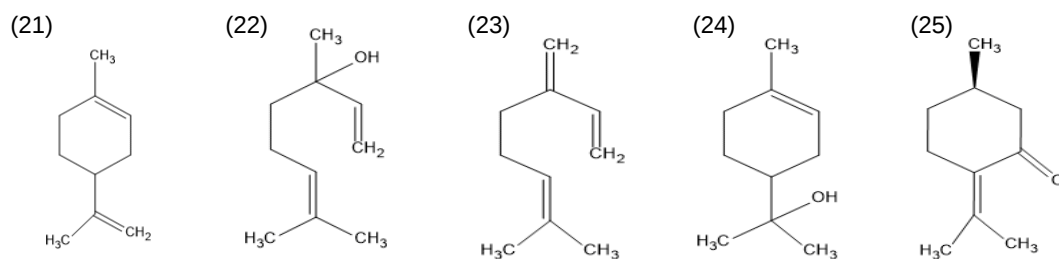


Figura 9: Estruturas químicas de monoterpenos presentes em óleos essenciais (21) limoneno, (22) linalol, (23) mirceno, (24) terpineol e (25) pulegona.

O rápido aparecimento de sinais tóxicos sugere um modo de ação neurotóxico envolvendo a inibição competitiva da acetilcolinesterase, a ativação competitiva dos recetores octopaminérgicos ou a interferência com os canais de cloro controlados pelo GABA (Figura 10). Sintomas evidentes, incluindo a hiperatividade, seguida de hiperexcitação, convulsões e tremores seguidos de paralisia ("knockdown"), são semelhantes aos produzidos por inseticidas como os organofosforados e os carbamatos (13,33,42,44).

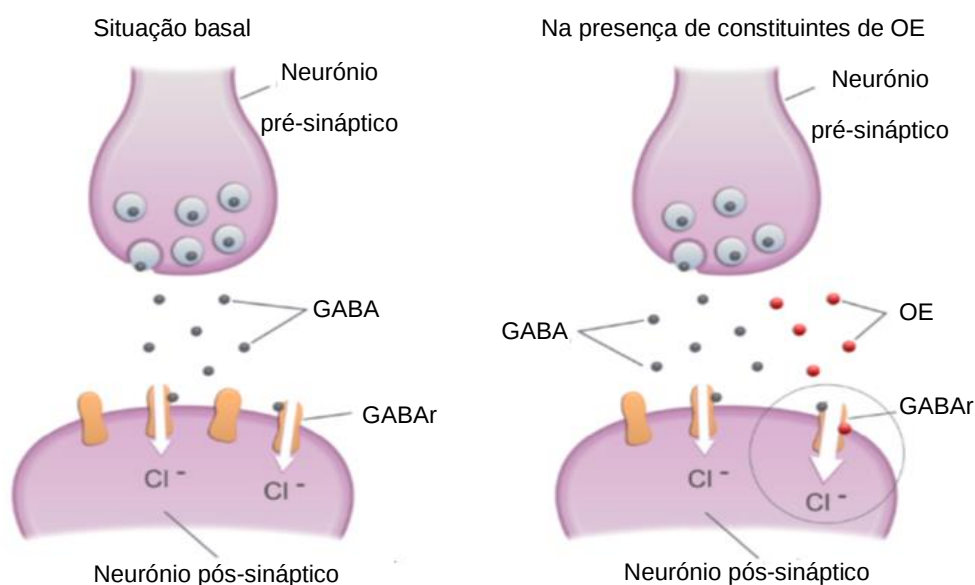


Figura 10: Os constituintes de OE aumentam o fluxo de cloro (Cl⁻) através da modelação dos recetores GABA. GABA- Ácido gama-aminobutírico; GABA_R- recetores de GABA; OE- constituintes de óleos essenciais. Adaptado de (83).

A octopamina (OA) (Figura 11) é uma amina biogénica multifuncional que ocorre naturalmente e desempenha diferentes papéis-chave como neurotransmissor, neuro-modulador e neuro-hormonal no sistema dos invertebrados, e tem uma função fisiológica semelhante à da norepinefrina (catecolamina) em vertebrados. A interrupção do funcionamento da octopamina resulta na decomposição total do sistema nervoso dos insetos (84).

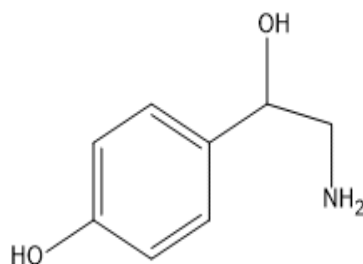


Figura 11: Estrutura química da octopamina.

Os efeitos comportamentais agudos e sub-letais dos constituintes de óleos essenciais, em insetos e em outros vertebrados, são consistentes com um local alvo do sistema octopaminérgico que age bloqueando os recetores de octopamina (Figura 12). Estudos farmacológicos, bioquímicos e fisiológicos têm demonstrado a presença de subtipos de recetores de octopamina em diferentes espécies, como por exemplo a barata americana (*Periplaneta americana* [Linnaeus, 1758]), bicho da seda (*Bombyx mori* [Linnaeus, 1758]) e mosca da fruta ou mosca de vinagre (*Drosophilla melanogaster* [Meigen, 1830]). Os estudos farmacológicos em subtipos de recetores octopamina₂ revelaram que estes não foram encontrados nos vertebrados (85). A ação inseticida pode ser exercida no sistema octopaminérgico em particular no recetor do tipo 2 dos insetos (13). As funções fisiológicas da OA parecem estar relacionadas com classes farmacologicamente distintas de recetores de octopamina nomeadamente o ritmo miogénico via concentração de Ca²⁺, de octopamina_{2A}, octopamina_{2B}, octopamina₃ (ativação de atividade da adenilato ciclase), que são ligados a diferentes mensageiros secundários pertencentes à família de recetores acoplados à proteína G (G-PCRs) (13,84).

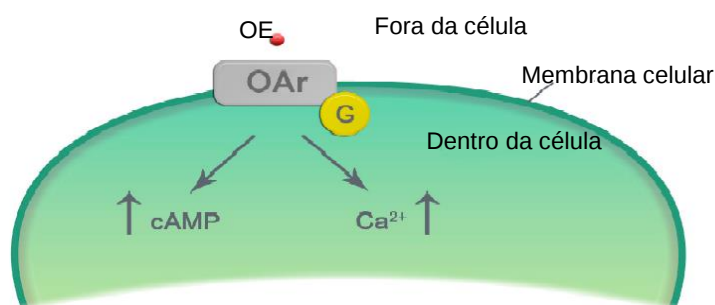


Figura 12: Os constituintes de óleos essenciais bloqueiam os recetores de octopamina. OE- constituintes de óleos essenciais; OAr- recetores octopamina; G- proteína G; cAMP- adenosina monofosfato cíclica; Ca²⁺- iões de cálcio; ↑- aumento do nível da molécula. Adaptado de (83).

Alguns estudos relatam que certos constituintes de óleos essenciais, como o eugenol ou o timol podem funcionar como bloqueadores dos recetores da octopamina e que estes

podem trabalhar através das cascatas dos recetores de tiramina (amina). Foram descritas propriedades inseticidas pela ativação do eugenol em baixas doses dos recetores de octopamina mas a resposta à octamina não foi afetada no neurónio de DUM (mediana dorsal não pareada) e também na atividade do intestino anterior. Com estes resultados foi proposto um subtipo diferente de recetor de octopamina. Foi também avaliada a toxicidade de monoterpenos numa térmita (*Coptotermes formosanus* [Shiraki, 1909]) e o eugenol foi o mais eficaz contra a mosca da fruta, o mosquito da febre amarela, (*Aedes aegypti* [Linnaeus, 1762]) e a barata americana, (*Periplanata americana* [Linnaeus, 1758]) (81,86). O timol apresentou toxicidade na mosca doméstica e na lagarta do algodão (*S. litura*) sendo a sua LD₅₀ entre 25,4 a 29,0 µg/inseto assim como na mosca da fruta e no mosquito (*Culex pipiens* [Linnaeus, 1758]) (13,84).

1.2.3.4. Quassina e neoquassina

A árvore de madeira amarga ou quássia (*Quassia amara*, [Linnaeus]) é um arbusto e um membro da família Simaroubacea e possui atividade inseticida. Os seus principais constituintes bioativos são os quassinoides e os que apresentam atividade inseticida são a quassina (triterpeno lactona) e a neoquassina (triterpeno) (Figura 13). São considerados agressores estomacais e também atuam por contacto. Os extratos de quássia apresentam eficácia contra vários insetos, tais como afídeos, lagartas, escaravelhos entre outros. Os extratos de quássia mostraram uma atividade antialimento contra as larvas de borboleta (*Hypsipyla grandella*, [Zeller, 1848]) (4).

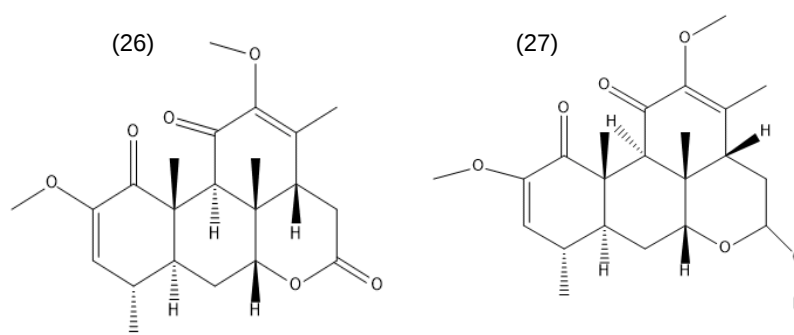


Figura 13: Estruturas químicas da quassina (1) e neoquassina (2).

1.3. Mecanismos de defesa dos insetos

Os insetos lepidópteros são fitofágicos e possuem mecanismos com alguma complexidade para reduzir ou inativar metabolicamente, a quantidade de alguns dos xenobióticos potencialmente tóxicos que ingere (87).

O sistema de defesa aleloquímico destes insetos incluem o citocromo P450, a glutathione-S-transferase e as esterases (enzimas que hidrolisam ésteres particulares em ácidos, álcoois ou fenóis), que estão presentes no seu trato gastrointestinal, permitindo uma rápida eliminação das substâncias tóxicas, ou dos corpos gordurosos ingeridos, facilitando, simultaneamente, a desintoxicação de contaminantes que penetrem na estrutura cuticular ou traqueal (13).

1.4. Espécies de plantas em estudo

Tendo em conta a grande variedade de plantas que apresentam compostos com propriedades inseticidas, para o presente estudo foram escolhidas as espécies mentrasto (*Ageratum conyzoides* [Linnaeus, 1753]), ceruda (*Chelidonium majus* [Linnaeus, 1753]), nogueira-comum (*Juglans regia* [Linnaeus, 1753]) e arruda (*Ruta graveolens* [Linnaeus, 1753]), em função de requererem mais estudos versando as suas propriedades biológicas e farmacológicas.

1.4.1. *Ageratum conyzoides* (Linnaeus)

O mentrasto (*Ageratum conyzoides* [Linnaeus, 1753]) é uma planta anual herbácea, ramificada e ereta da família Asteraceae. Pode atingir os 30 a 100 cm de altura e é nativa da América Tropical, mas a sua distribuição ocorre em áreas tropicais e subtropicais à volta do mundo. Esta espécie tem uma grande adaptabilidade ambiental e tem um potencial reprodutivo e de alelopatia. Esta planta é considerada uma erva daninha em 50 países, mas também, é usada como planta ornamental e na medicina tradicional (1,88,97–99,89–96).

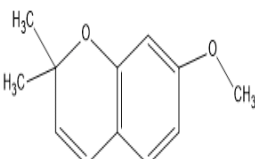
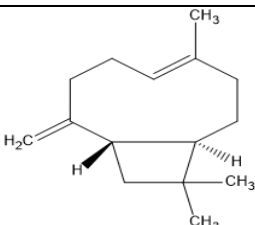
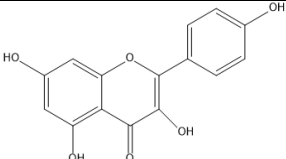
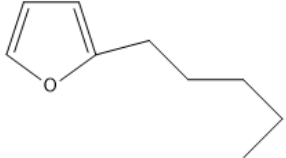
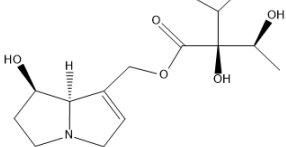
Não é consumida por seres humanos, mas é muito utilizada com fins medicinais em várias zonas de África, Ásia e América do Sul, onde, na medicina popular, a planta é usada como purgativo, antipirético, anti-inflamatório, antimicrobiano, antidisentérico, antilítico, anticólicas e anti úlceras. Embora referida como venenosa para coelhos devido à presença

de cianeto de hidrogénio (HCN) e de cumarinas, em algumas culturas, é considerada uma iguaria para animais como porquinhos-da-índia, cavalos e gado e é usada para alimentar peixes (88,100,101).

Devido ao seu uso na medicina tradicional, a planta *A. conyzoides* foi estudada e foi possível concluir que, de fato, possui diversas atividades antimicrobiana (antibacterianos e antifúngicos) (2,93,102,103), anticonvulsivante (93), anticoagulante (88), analgésica (88,95,102,103), antipirética (88,93), anti-inflamatória (88,93,98,100,102–104), miorelaxante (88), antioxidantes (95,100,103), cicatrizantes (103), anticancerígenas (102,103), anti tumoral (105), anti hiperglicémicas (103), anti ulcerogénicas (103), antiespasmódico (99,105), anti-artrite (105), anti protozoário (105), herbicida (2), nematicida (2,104) e inseticida (2,88,97,102–104,106).

Toda a parte aérea da planta produz um óleo volátil e a obtenção desse óleo essencial, por destilação a vapor, liberta um odor intenso e pungente. Ao óleo essencial extraído da planta são atribuídas várias atividades biológicas. O óleo essencial da parte aérea do *A. conyzoides* contém cromenos (desmetoxiageratocromeno [precoceno I] e ageratocromeno [precoceno II]), sesquiterpeno (β -cariofileno, o óxido de cariofileno e os hidrocarbonetos) e monoterpenos (α -farneseno, γ -cadineno, δ -elemeno, β -elemeno, muuroleno), cumarina e em quantidades muito pequenas benzofuranos (2-amilfurano e 2,3-di-hidrobenzofurano), melitol e α -funebreno, flavonoides como o campferol, quercetina e seus glicósidos, os alcaloides (1,2-desifropirrolizidínico e licopsamina) (Tabela 2) (2,88,89,91,92,99,102,103,105,107–110). Para alguns investigadores, a quantidade e a composição dos vários óleos podem variar em função da localização ou origem da planta. Dos cromenos, que o óleo essencial do *A. conyzoides* contém, os precocenos I e II, apresentam atividade inseticida, provocando efeitos ovicida, anti gonadotrópico, metamorfose precoce e indução de diapausa em insetos (88,91,99,102,107).

Tabela 2: Compostos bioativos da espécie *A. conyzoides*.

Composto	Estrutura química	Classe química	Origem	Referências
Desmetoxiageratocromeno (precoceno I)		Cromenos	Óleo essencial da parte aérea da planta Folha Caule	(2,88,89,91,92,99, 102,103,105, 107–110)
β -cariofileno		Sesquiterpeno	Óleo essencial da parte aérea da planta	(2,88,89,91,92,99, 102,103,105, 107–110)
Campferol		Flavonoides	Óleo essencial da parte aérea da planta	(2,88,89,91,92,99, 102,103,105, 107–110)
2-amilfurano		Benzofuranos	Óleo essencial da parte aérea da planta	(2,88,89,91,92,99, 102,103,105, 107–110)
Licopsamina		Alcaloides de núcleo pirrolizidínico	Óleo essencial da parte aérea da planta	(2,88,89,91,92,99, 102,103,105, 107–110)

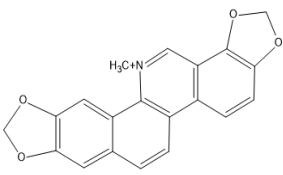
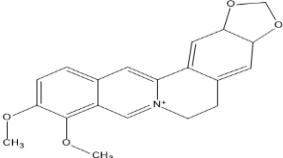
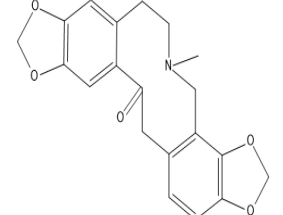
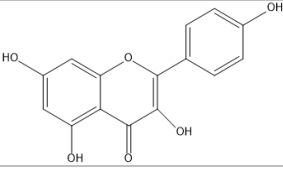
A toxicidade do *A. conyzoides* não foi ainda bem determinada, pelo que continuam a ser feitos estudos com esse objetivo, em relação a cada um dos seus compostos. Existe pouca informação que confirme a hepatotoxicidade da *A. conyzoides* sendo a que existe muito conflituante (108). Alguns autores referem que os alcaloides 1,2-desifropirrolizidínico e licopsamina têm uma atividade hepatotóxica, enquanto outros argumentam que o *A. conyzoides* é venenoso apenas para coelhos, como já se referiu acima (88,100,101). Foi relatado, ainda, que os alcaloides de núcleo pirrolizidínico são hepatotóxicos e podem provocar intoxicação aguda, enquanto outros estudos demonstraram que o *A. conyzoides* não é tóxico para humanos quando são ingeridos 300, 400 e 600 mg / kg do seu peso corporal, doses consideradas seguras (2).

1.4.2. *Chelidonium majus* (Linnaeus)

A ceruda (*Chelidonium majus* [Linnaeus, 1753]) é uma planta perene da família das Papaveraceae. É nativa da Europa, mas pode encontrar-se na Ásia Ocidental, América do Norte e noroeste de África principalmente em solos ricos em azoto (N) (109–115) . Esta planta contém látex (exceto nas flores), que possuem mais de vinte alcaloides de núcleo isoquinoleínico, já isolados e identificados quimicamente (109,113,114). É uma planta com alguma toxicidade pela presença de alguns metabolitos secundários, tais como flavonoides, ácidos fenólicos e saponinas nas raízes e nos caules, mas possui outros que permitem a sua utilização em medicamentos tradicionais e modernos (116,117). Os alcaloides, são responsáveis por propriedades farmacológicas, as quais incluem efeitos hepatoprotectivos (110,118), antimicrobianos (110–113,118–120), antivirais e anti parasíticos (110–112,121,122), cardiovasculares (110), coleréticos (110), periodontais (110), radioprotetivos (110), citotóxicos (110,112,113,118–121,123) e ainda no sistema reprodutor e no sistema nervoso central (SNC) (110), além de atividade imuno-modeladora (110,112,118), anti-inflamatória (110–113,118–121), analgésica (110,118,120) e hipoglicémica (110).

O seu uso medicinal milenar, já referido, é motivado pelo interesse químico e farmacológico dos seus alcaloides derivados da isoquinolina. Contém alcaloides do tipo benzofenantridina (sanguinarina, quelidonina, quelitrina e isocelidonina), do tipo protoberberina (berberina, coptisina e estilopina) e do tipo protopina (protopina, alocriptopina), mas possui também flavonoides (campferol, quercetina, isorramnetina ou isorramnetol glicosídeos), terpenos, ácidos fenólicos e saponinas entre outros (Tabela 3) (112,113, 114,116,117,119,122,124,127,128,129–133).

Tabela 3: Compostos bioativos de *C. majus*.

Composto	Estrutura química	Classe Química	Origem	Referências
Sanguinarina		Alcaloides do tipo benzofenanthridina	Parte aérea e raiz	(112,113, 114, 116,117,119,122,124,127, 128,129–133)
Berberina		Alcaloides do tipo protoberberina	Parte aérea e raiz	(112,113, 114, 116,117,119,122,124,127, 128,129–133)
Protopina		Alcaloides do tipo protopina	Parte aérea e raiz	(112,113, 114, 116,117,119,122,124,127, 128,129–133)
Campferol		Flavonoides	Parte aérea e raiz	(112,113, 114, 116,117,119,122,124,127, 128,129–133)
		Terpenos	Parte aérea	(112,113, 114, 116,117,119,122,124,127, 128,129–133)
		Ácidos fenólicos	Parte aérea	(112,113, 114, 116,117,119,122,124,127, 128,129–133)
		Saponinas	Parte aérea	(112,113, 114, 116,117,119,122,124,127, 128,129–133)

Os alcaloides desta planta (a sanguinarina e a queleritrina) apresentam atividades citotóxicas (109,119,121,125), antimicrobianas (109,121,131), antivirais (121), antifúngicas (121) e anti-inflamatória (109,119–121,131), enquanto quelidonina possui, para além destes, efeitos anticancerígenos (109,120,121), espasmolíticos (109,121), analgésicos (120,121) e antibacterianos (120,121). Os principais alcaloides das partes aéreas da planta são a quelidonina, a berberina e a coptisina. A quelidonina é usada na preparação de um agente carcinostático (tio-fosforamida), protegido por várias patentes podendo já não estar em vigor. Os alcaloides que se encontram nas raízes são a sanguinarina e quelitina (121,127,132). Existem também relatos de que a berberina e a coptisina possuem propriedades colinocinéticas e antibacterianas (109). Os alcaloides de *C. majus* têm

atividade inseticida, são antinutrientes, repelente e têm propriedades de regulação de crescimento de alguns insetos. As diferentes partes do *C. majus*, como caules, folhas, flores e frutos, são utilizados em diferentes proporções em diferentes produtos farmacêuticos comercializados (109).

Na fitoterapia ocidental e na medicina tradicional chinesa (MTC), a ceruda tem um grande potencial terapêutico e é conhecido há séculos em todo o mundo. O seu interesse deve-se precisamente a esse potencial terapêutico proveniente das substâncias biologicamente ativas que possui e às quais se atribuem atividades anti-inflamatórias (110–112,118,119,121,124–126), antimicrobianas (110,111,114,118,119,121,124–126), antivirais (111,112,114,121,124) e antiespasmódicas (111,126), muito embora haja ainda muitas limitações no seu uso, por haver necessidade de serem melhor avaliadas uma vez que a aplicação de extratos vegetais em farmacoterapia apresenta um risco maior de efeitos colaterais do que os compostos puros, cuja vantagem é um efeito terapêutico mais previsível (110,131,133).

Na medicina tradicional é utilizada no tratamento de doenças hepáticas, úlceras e espasmos gástricos, infecções orais, doenças reumáticas, tuberculose e icterícia. É, ainda, utilizado topicamente para o tratamento de distúrbios da pele, incluindo verrugas, eczema e calos (112,120,121,134–139).

1.4.3. *Juglans regia* (Linnaeus)

A noqueira-comum (*Juglans regia* [Linnaeus, 1753]) pertencente à família Juglandaceae, sendo geralmente conhecida como noqueira persa ou comum (140–144). É uma árvore que se encontra principalmente em regiões de clima temperado e é cultivada com fins comerciais nos Estados Unidos da América, América do Sul, Ásia e Europa dada a importância das suas frutas, folhas, sementes, cascas e folhas verdes, muito usadas na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica (140,145–147). A casca verde é rica em compostos bioativos naturais (148).

A noz da *J. regia*, tem sido utilizada para fins medicinais desde a antiguidade, tanto na Ásia como na Europa, dado que a sua casca contém juglona, que possui atividade antimicrobiana e é também chamada de 5-hidroxi-1,4-naftoquinona (141,146,149). É um agente alelopático usado comercialmente, mas que também possui propriedades terapêuticas (146,149). Esse composto encontra-se nas folhas, raízes e cascas da planta, juntamente com outros polifenóis. A juglona é produzida nas raízes, folhas e cascas e

possui efeitos tóxicos para os insetos, microrganismos, organismos marinhos e mamíferos, mas recentemente, também foi demonstrado que possui propriedades nematicidas (147), anticancerígenas (147,149) e antimicrobianas (150) embora até ao momento, as informações sobre ela sejam quase inexistentes.

As folhas da noqueira são utilizadas para se obter um preparado farmacêutico, por decocção, fervendo as mesmas em água, coando-as e espremendo-as de seguida. O decocto tem efeitos antibacteriano, antiviral, adstringente, anti-helmíntico, regulador do suor, ceratolítico e sedativo. Os principais fitoquímicos presentes nas folhas de *J. regia* são polifenóis ([naftoquinonas, como juglona ou tetralonas], taninos hidrolisáveis, flavonoides, ácidos fenólicos [ácido ferúlico e cafeico]), além de diarilheptanoides (151,152). Os terpenos também estão presentes, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos e megastigmanes. Os componentes químicos da casca verde da noz são taninos hidrolisáveis (ácido elágico e o ácido tânico) e taninos condensados, tetralonas (regiolona), ácidos orgânicos (ácido ftálico), ácido fenólico (ácido benzoico), fenóis (2,6-dimetil-fenol e siringol), flavonoides (sudachitina, cirsilincol e 5,6,4'-trihidroxi-7,3'-dimetoxi-flavona), diarilheptanoides (rhoiptelol, juglanina A, juglanina B e juglanina C), esteróis (campesterol e estigmasterol) e triterpenos (ácido oleanólico, ácido ursólico, entre outros), entre outros (Tabela 4) (145,149,151,153,154).

Tabela 4: Compostos bioativos de *J. regia*.

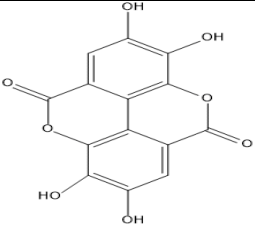
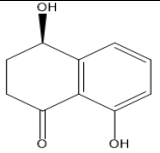
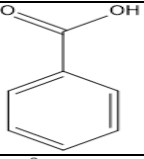
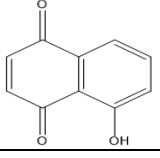
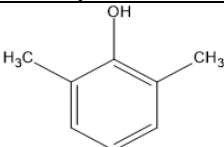
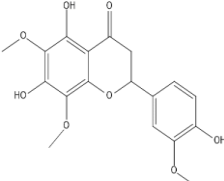
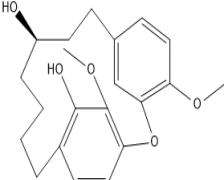
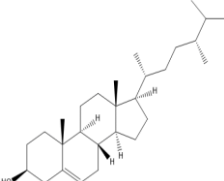
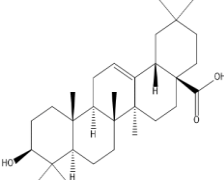
Composto	Estrutura química	Classe química	Origem	Referências
Ácido elágico		Taninos hidrolisáveis	Casca verde	(145,149,151,153,154)
Regiolona		Tetralonas	Casca verde	(145,149,151,153,154)
Ácido benzoico		Ácido orgânico	Casca verde	(145,149,151,153,154)
Juglona		Naftoquinonas	Casca Verde	(145,149,151,153,154)

Tabela 4: Continuação.

Composto	Estrutura química	Classe química	Origem	Referências
2,6-dimetil-fenol		Fenóis	Casca verde	(145,149,151,153,154)
Sudachitina		Flavonoides	Casca verde	(145,149,151,153,154)
Rhoiptelol		Diarylheptanoides	Casca verde	(145,149,151,153,154)
Campesterol		Esteróis	Casca verde	(145,149,151,153,154)
Ácido oleanólico		Triterpenos	Casca verde	(145,149,151,153,154)

Na medicina tradicional, as folhas também se usam no tratamento da insuficiência venosa e na sintomatologia hemorroidal por possuir propriedades antidiarreicas, anti-helmínticas, depurativas e adstringentes (140,146,151).

Os galhos, folhas, raízes e cascas das nozes têm sido utilizadas para tratar dores de estômago, disenteria, dermatite e concreção (agregação sólida que se forma em certos tecidos ou órgãos) (155). As nozes são ainda aconselhadas para o controlo de pragas. Os extratos das folhas e cascas de nozes atuam como antinutrientes nos insetos. Os extratos da casca de nozes verdes são prejudiciais às larvas de *Mythimna separatea* (Walker, 1865) e *Stilpnotia candida* (Staudinger, 1892) e os extratos das folhas atuam de forma sistêmica e por contacto contra *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval, 1867) e *Tetranychus viennensis* (Zacher, 1920) (155). Vários estudos farmacológicos provaram que as cascas de nozes verdes têm atividades antioxidante, antimicrobiano e anti-HIV (153). A atividade acaricida das cascas de nozes verdes ainda não foi devidamente relatada (156).

1.4.4. *Ruta graveolens* (Linnaeus)

A *Ruta graveolens* (Linnaeus, 1753) pertence à família Rutaceae (157). É uma planta herbácea perene, resistente, com uma cor verde acinzentada característica, um odor desagradável e caules amplamente ramificados (158). É originária do Mediterrâneo, mas cultivada em muitas regiões do mundo, por possuir propriedades medicinais anti nociceptivas e anti-inflamatórias. É usada como remédio para câibras, histeria, parasitas intestinais, doenças de pele e doenças do útero e pode ainda ser utilizada para induzir abortos provocando graves complicações de morbimortalidade (157,159). Duas outras importantes utilizações são a regulação do ciclo menstrual e o controle de espasmos (158).

Na espécie *R. graveolens* encontram-se os compostos alcaloides tipo acridona (rutacridona, epóxido de rutacridona e gravacridondiol), alcaloides tipo furoquinolinonas (skimmianina) e alcaloides tipo alquilquinolinonas (graveolina e graveolinina), furanocumarinas (xantotoxina, psoraleno e metoxipsoraleno), terpenos (limoneno e pineno), monoterpenos (eucaliptol e linalol), flavonoides (rutina e quercetina), furoquinolinas, saponinas, e taninos, que são isolados de diferentes partes da planta (Tabela 5) (158,160,169,161–168). A rutina e o graveolina estão presentes nas folhas e os alcaloides tipo acridona estão presentes nas raízes (167). A *R. graveolens* conhecida como arruda comum contém 2-alquilquinolonas (170).

Tabela 5: Compostos bioativos de *R. graveolens*.

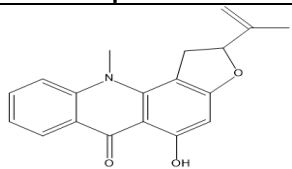
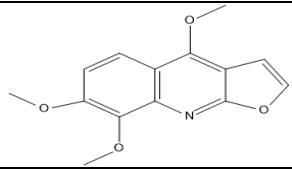
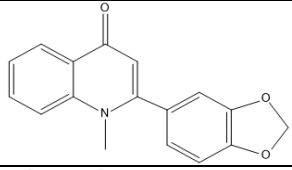
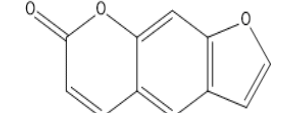
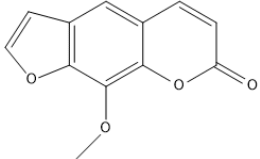
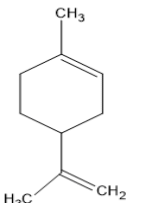
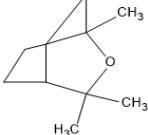
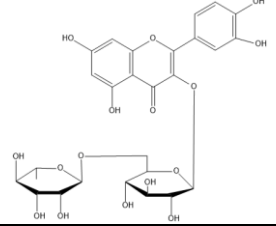
Composto	Estrutura química	Classe química	Origem	Referências
Rutacridona		Alcaloides do tipo acridona	Raiz	(158,160,169,161–168)
Skimmianina		Alcaloides do tipo furoquinolinonas	Parte aérea da planta	(158,160,169,161–168)
Graveolina		Alcaloides do tipo alquilquinolinonas	Folhas	(158,160,169,161–168)
Psoraleno		Furanocumarinas	Folhas	(158,160,169,161–168)

Tabela 5: Continuação.

Composto	Estrutura química	Classe química	Origem	Referências
8-Metoxipsoraleno		Furanocumarinas	Folhas	(158,160,169,161–168)
Limoneno		Terpenos	Óleo essencial da folha	(158,160,169,161–168)
Eucaliptol		Monoterpenos	óleo essencial da folha	(158,160,169,161–168)
Rutina		Flavonoides	Folhas	(158,160,169,161–168)
		Furoquinolinas	Parte aérea da planta	(158,160,169,161–168)
		Saponinas	Parte aérea da planta	(158,160,169,161–168)
		Taninos	Parte aérea da planta	(158,160,169,161–168)

Os extratos aquosos da parte aérea e das raízes da arruda contêm muitos metabolitos secundários com interesse comercial, pelas propriedades biológica e farmacológica que apresentam, dadas as suas atividades antimicrobianas (antifúngicas e antibacterianas) (171–173), contraceptivas (172), fitotóxicas (174), antidotais (174), antioxidantes (171,172), anti-inflamatórias (171–173), antidiabéticas (171), anti androgênicas (171), inseticida (173), larvicida (171,175) e repelente de insetos (171), entre outras.

Como se diz acima, os extratos de *R. graveolens* apresentam vários tipos de metabolitos secundários como cumarinas, furanocumarinas, alcaloides (acridona e quinolona) e flavonoides. As cumarinas e as furanocumarinas são utilizadas com sucesso no tratamento sintomático de doenças desmielinizantes, particularmente esclerose múltipla, leucoderma/vitiligo (despigmentação adquirida da pele), pelas suas propriedades estimulantes de pigmento e psoríase (164). As cumarinas têm efeitos anti tumorais, antioxidantes, antimicrobianos, anti-inflamatórios e anti mutagênicos, além de influenciarem as atividades hormonais dos insetos (166). Muitos alcaloides, incluindo

dictamina e metoxidictamina possuem propriedades antimicrobianas. As culturas *in vitro* de *R. graveolens* revelaram-se uma boa fonte biotecnológica de fitoalexinas biologicamente ativas (164). O sumo das folhas é eficaz contra picadas de cobras e escorpiões (162,165,167). As furanocumarinas, que ocorrem naturalmente nas plantas são responsáveis pelas propriedades fotorreativas que ela revela. As furanocumarinas foram quantificadas nos órgãos de *R. graveolens* (frutas, caules, folhas, raízes) para determinar a alocação de furanocumarinas na planta e extrapolar para uma possível produção de campo (por hectare) (163).

2. Materiais e Métodos

2.1. Reagentes e Substâncias de referência

Foram utilizados os compostos químicos metanol (MeOH) e dimetilsulfóxido (DMSO), adquiridos em Fisher Chemical (Loughborough, UK), meio de inseto Grace (Gibco), soro bovino fetal (SBF), L-glutamina, hidrolisado de lactalbumina, azul tripano e, também os reagentes de Dragendorff (iodeto de bismuto e potássio), de Mayer (tetra-iodomercurato de potássio), de Bertrand (ácido sílico-túngstico) e de Stiasny (formol clorídrico). Ainda foram utilizados o 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e a faloidina.

Além destes, foi necessário recorrer-se, ainda, ao ácido clorídrico a 10%, à amónia diluída (1:1), ao éter etílico (C₂H₅)₂O, água destilada, gelatina, cloreto de férrico a 4%, ácido acético a 10%, acetato de chumbo a 10%, hidróxido de sódio a 20 %, ácido clorídrico concentrado, fita de magnésio, ácido bórico a 3% e ácido oxálico a 10%.

Utilizaram-se quatro substâncias de referência adquiridas da Sigma-Aldrich: o 8-metoxipsoraleno, a cumarina, o psoraleno e o bergapteno e ainda inseticida comercial clorpirifos (CPF).

2.2. Amostragem

Neste trabalho de investigação, foram utilizadas quatro espécies de plantas, recolhidas na região de Braga e trazidas posteriormente para o Laboratório de Farmacognosia da Universidade de Farmácia do Porto, nomeadamente o mentrasto (*A. conyzoides*), a ceruda (*C. majus*), a casca verde da noz da nogueira vulgar (*J. regia*) e a arruda (*R. graveolens*) (Tabela 6).

As amostras foram secas em estufa, durante 2 a 3 dias, à temperatura de 40°C. De seguida as folhas foram retiradas dos caules e as diferentes espécies foram trituradas separadamente, assim como os caules e as cascas verdes das nozes, seguidamente foram tamisadas separadamente com o crivo tamanho 25. As amostras obtidas foram pesadas, guardadas em frascos de plástico e armazenadas numa zona escura à temperatura ambiente.

Tabela 6: Espécies das plantas utilizadas e o seu peso seco em gramas (g).

Espécie da planta	Designação das amostras	Parte da planta	Peso seco (g)
<i>Ageratum conyzoides</i>	Mentrasto A	Folhas	34,229
		Caules	0,000
	Mentrasto B	Folhas	62,318
		Caules	18,348
<i>Chelidonium majus</i>	Ceruda	Folhas	48,751
		Caules	9,290
<i>Juglans regia</i>	Nogueira-comum	Folhas	0,000
		Caules	0,000
		Casca verde	31,717
<i>Ruta graveolens</i>	Arruda A	Folhas	18,709
		Caules	0,000
	Arruda B	Folhas	24,889
		Caules	10,875
	Arruda C	Folhas	29,130
		Caules	14,158

Nota: As designações A, B e C são referentes às localizações distintas de onde as diferentes espécies foram colhidas.

2.3. Preparação dos extratos

As amostras vegetais (1g) foram extraídas durante 24 horas com uma solução hidrometanólica (30% água: 70% metanol) e ficando a agitar na placa de agitação, num volume final de 100 mL, tendo sido centrifugadas a 4000 rpm, 4 minutos. De seguida procedeu-se à filtração das soluções com um filtro de poro nº 3. O metanol presente nos extratos foi evaporado por rotavapor (4h, 50°C), sendo as amostras congeladas e posteriormente liofilizadas.

As amostras foram então acondicionadas e armazenadas no exsiccador, até utilização.

Os diferentes extratos foram identificados de modo alfanumérico (tabela 7), pesando-se cerca de 15 mg de cada um, com 300 µL de uma solução composta por 50% de MeOH e 50% de DMSO, de modo a ficarem com uma concentração de 50 mg/ mL. As soluções stocks dos extratos foram armazenadas no frigorífico.

Tabela 7: Identificação dos extratos brutos pelo código alfanumérico e suas massas em miligramas (mg).

Código alfanumérico	Espécies de plantas	Planta nome comum	Parte da planta	Extrato	Peso extrato (mg)
A1	<i>Ruta graveolens</i>	Arruda	Folhas	Hidrometanólico	3246,7
			Caules		0,000
A2		Arruda	Folhas	Hidrometanólico	5056,3
A3			Caules	Hidrometanólico	727,5
A4		Arruda	Folhas	Hidrometanólico	3160,7
A5			Caules	Hidrometanólico	665,6
A6		Arruda	Folhas	Diclorometano	0,000
A7			Folhas	Acetato de etilo	0,000
A8	<i>Chelidonium majus</i>	Ceruda	Folhas	Hidrometanólico	1715,0
A9			Caules	Hidrometanólico	1737,8
A10	<i>Ageratum conyzoides</i>	Mentrasto	Folhas	Hidrometanólico	926,1
			Caules		0,000
A11		Mentrasto	Folhas	Hidrometanólico	1775,9
A12			Caules	Hidrometanólico	1134,9
A13		Mentrasto	Folhas	Diclorometano	0,000
	<i>Juglans regia</i>	Nogueira-comum	Folhas		0,000
			Caules		0,000
A14			Casca verde	Hidrometanólico	2499,3

Nota: Os espaços vazios correspondem às partes da planta que não se obtiveram quando as amostras foram colhidas.

As amostras (A6, A7 e A13) foram submetidas a extração por Soxhlet com diclorometano ou acetato de etilo durante 4 horas, período após o qual o solvente foi removido por evaporação. De forma a remover as clorofilas, os extratos foram eluídos numa coluna Chromabond C19 utilizando metanol como eluente. Após este passo, o solvente foi evaporado.

2.4. Cultura celular

A *S. frugiperda*, da ordem dos Lepidoptera, onde estão incluídas as borboletas e as traças, também conhecida como “lagarta militar ou do exército de queda”, é uma traça conhecida a nível mundial como uma das principais pragas por atacar culturas de milho, algodão,

sorgo e arroz, entre outras (176–180). O controlo desta traça é feito com inseticidas sintéticos da classe dos carbamatos, organofosforados e piretroides (181,182).

As três ordens de insetos, consideradas como as piores pragas para a agricultura, pelo seu poder destruidor nas culturas, são a já referida Lepidoptera, a Diptera e a Coleoptera, cujas linhas celulares são originárias de diferentes tecidos do seu corpo interno (intestino médio, ovários, sistema circulatório ou todo o corpo). Dessas linhas celulares, as **CF-203** e as **GUTAW1** têm origem no intestino médio da (*Choristoneura fumiferana* [Clemens, 1865], Lepidoptera) e da (*H. zea*, Lepidoptera), respetivamente, enquanto as **High5** e **Sf9**, no ovário das (*Trichoplusia ni*, Lepidoptera) e (*S. frugiperda*, Lepidoptera), respetivamente. As linhas **S2** originam-se nos hemócitos (células circulares na hemolinfa dos insetos) da (*Drosophila melanogaster*, Diptera) e as **TcA** em todo o corpo das (*Tribolium castaneum* [Herbst, 1797], Coleoptera) (183). A linha celular escolhida para o desenvolvimento da parte experimental foi a Sf9.

A linha celular Sf9 (*S. frugiperda*, tecido dos ovários), foi utilizada e mantida na estufa a 28°C, em frascos de cultura de 25 cm². Foi utilizado o meio Grace, suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e também com [+] L-glutamina, [+] 3,33g/L de hidrolisado de lactalbumina e [+] 3,33g / L de levedura. As células foram mantidas na fase de crescimento exponencial e o seu número determinado mediante contagem em câmara de Neubauer com o teste de exclusão do azul tripano.

2.5. Células de inseto Sf9 expostas aos diferentes extratos

As células Sf9 foram semeadas numa placa de 96 poços (100 µL/poço) com uma densidade de 3x10⁴ células/mL ficando a incubar por 24 horas. No dia seguinte, foram preparadas as soluções dos extratos com uma concentração de 0,5 mg/mL (4µL solução stock dos extratos + 396 µL de meio). Na mesma placa rejeitou-se o meio que foi previamente adicionado (100 µL/poço) e substituiu-se pelas soluções dos extratos numa concentração de 0,5 mg/mL e num volume de 100 µL/poço, voltando a ficar a incubar por mais 24 horas (Figura 15). Foram usados como controlos o meio de insetos Grace e uma solução de meio + DMSO + MeOH. A viabilidade celular foi testada através do teste de resazurina.

2.6. Avaliação da viabilidade celular

Para avaliação da viabilidade celular foi utilizado um método baseado na redução da resazurina. A solução stock foi diluída 10 vezes nos poços de cultura e teve lugar incubação durante 20 minutos, período após o qual a placa foi lida nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 530-560 / 590 nm.

2.7. Análise estatística

Para se fazer a análise estatística utilizou-se o programa informático GraphPad Prism 6, onde começou por se fazer a análise de normalidade utilizando o teste Shapiro-Wilk. De seguida fez-se uma análise One-Way ANOVA para verificar as diferenças representativas nos diferentes extratos, sendo que *** representam essas diferenças, $p < 0,001$.

2.8. Técnica de microscopia de fluorescência

Para a recolha de imagens para a avaliação do impacto dos extratos na morfologia celular, as células (30.000 células/poço) foram fixadas com formalina e posteriormente marcadas com DAPI (0,25 $\mu\text{g/mL}$), para estudo da cromatina e faloidina (CF543 5 U/mL), para marcação da actina e estudo da morfologia celular.

Após fixação e marcação, as amostras foram observadas num microscópio invertido Eclipse Ts2R-FL (Nikon) equipado com uma câmara Retiga R1 e objetiva S Plan Fluor ELWD 40x DIC N1. O equipamento estava calibrado de forma a poder fazer as medições das amostras. As imagens foram analisadas com software open source "Fiji".

2.9. Testes gerais de pesquisa fitoquímica

2.9.1. Teste de alcaloides

Para despistar a presença de alcaloides nas espécies de plantas estudadas, utilizaram-se diferentes reagentes gerais tais como o Dragendorff, Mayer e Bertrand. Para cada amostra de plantas seca (A1, A2, A3, A4, A5, A8, A9, A10, A11, A12 e A14), pesou-se um 1 g de matéria vegetal que se ferveu com ácido clorídrico a 10%. Depois de arrefecida a solução

obtida, alcalinizou-se com amónia diluída (1:1) em ampolas de decantação. Agitou-se esta solução durante uns minutos e de seguida adicionaram-se 20 mL éter etílico, voltando a agitar-se. Separaram-se as fases e à fase etérea adicionaram-se 10 mL de ácido clorídrico a 10% e voltou a agitar-se (184).

Depois de separadas as fases, usou-se a fase ácida, que foi dividida em quatro tubos de ensaio diferentes, sendo que o primeiro tubo serviu de controlo, enquanto ao segundo se adicionaram três gotas do reagente de Dragendorff. No terceiro tubo adicionaram-se três gotas do reagente de Mayer e no quarto três gotas do reagente de Bertrand.

2.9.2. Teste de taninos

Em vários gobelés, foram preparadas amostras das plantas secas (A3, A4, A5, A8, A9, A10, A11, A12 e A14), para identificar a presença de taninos nas espécies de plantas utilizadas no presente estudo. Foi gasta toda a matéria vegetal das amostras A1, A2, A6, A7 e A13 para a obtenção dos extratos.

Para cada preparação, pesaram-se cerca de 0,5 g de matéria vegetal, à qual se adicionaram 25 mL de água, procedendo-se, de seguida, à filtração da solução obtida em cada uma (184).

2.9.2.1. Reação com a gelatina

Num tubo de ensaio, para cada uma das amostras (A3, A4, A5, A8, A9, A10, A11, A12 e A14), colocou-se 1 mL da solução obtida por filtração, à qual se adicionou uma gota de ácido clorídrico diluído. Seguidamente, foi-se juntando, gota a gota, a solução de gelatina (184).

2.9.2.2. Reação com os sais de ferro

A mesma quantidade de solução filtrada foi introduzida em novos tubos (A3, A4, A5, A8, A9, A10, A11, A12 e A14) adicionando-se, em cada um, uma gota da solução de cloreto férrico a 4% (184).

2.9.2.3. Reação com o acetato de chumbo

Para a amostra A14, num matraz colocaram-se 2,5 mL da solução filtrada e adicionaram-se 5 mL de uma solução de ácido acético a 10%. Juntaram-se, ainda, 2,5 mL de uma solução de acetato de chumbo a 10% (184).

2.9.2.4. Reação com o formol clorídrico

Para a amostra A14, num matraz colocaram-se 10 mL da solução filtrada e adicionaram-se 4 mL de reagente de formol clorídrico, sendo depois aquecida em banho maria durante 30 minutos na hotte (184).

2.9.3. Teste de flavonoides

Para determinar a presença de flavonoides, nas amostras A3, A4, A5, A8, A9, A10, A11, A12 e A14, 1 g de matéria vegetal foi agitado durante 2 minutos, com 15 mL de metanol e filtraram-se as soluções. De seguida, filtrado, foi dividido por 5 tubos de ensaio, sendo que o quinto tubo serviu de controlo em todas elas (184).

2.9.3.1. Reação com os hidróxidos alcalinos

Para todas as amostras, ao primeiro tubo de ensaio adicionaram-se algumas gotas da solução de hidróxido de sódio a 20 % (184).

2.9.3.2. Reação com os sais metálicos

Ao segundo tubo de ensaio adicionaram-se algumas gotas de cloreto férrico a 4% (184).

2.9.3.3. Reação da cianidina

Na hotte, ao terceiro tubo adicionaram-se 10 gotas de ácido clorídrico concentrado e juntaram-se cerca de 2 cm de fita de magnésio (184).

2.9.3.4. Reação oxalo-bórica

Para cada amostra, o conteúdo do quarto tubo de ensaio foi vertido para dentro de um balão de fundo redondo e com rolha esmerilada, onde se adicionaram 3 mL de solução de ácido bórico a 3% e 1 mL de solução de ácido oxálico a 10%. Levou-se à secura deixando aquecer por mais 5 minutos, no rotavapor. Quando o balão arrefeceu, fez-se a ressuspensão do resíduo com 10 mL de éter. Leu-se a fluorescência a 365 nm (184).

2.9.4. Teste de saponósidos

Para as amostras A3, A4, A5, A8, A9, A10, A11, A12 e A14, pesaram-se 0,5 g de matéria vegetal à qual se adicionaram, num gobelê, 100 mL de água. Deixou-se a solução entrar em ebulição e continuar a ferver durante 30 minutos. Posteriormente, depois de arrefecida, filtrou-se para um balão volumétrico de 100 mL e perfez-se o volume inicial com água destilada (185).

Prepararam-se, com esta solução, 10 tubos de ensaio (Tabela 8). Cada tubo foi agitado durante 15 segundos, após o que foram deixados a repousar durante 15 minutos.

Tabela 8: Preparação dos tubos de ensaio para o teste dos saponósidos.

Tubos de ensaio	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Volume da solução (mL)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Volume da água (mL)	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
Volume total (mL)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

2.10. Análise cromatográfica

Foi utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para se identificarem os compostos presentes nos extratos diclorometano e acetato de etilo, os únicos que apresentaram atividade inseticida. Fez-se uma cromatografia de fase reversa acoplada a um detetor fotodíodos (DAD), com solventes polares A: H₂O e B: Metanol (9:1) num total de 80 minutos e utilizou-se uma coluna C18 (250 x 4mm), a um fluxo 0,900 mL/minuto. Os comprimentos de onda utilizados para os registos dos cromatogramas foram 205, 250, 320,350,420, 500 nm.

3. Resultados

3.1. Viabilidade celular e análise estatística

No teste de viabilidade celular, as células foram expostas a diferentes extratos (A1 a A14) ficando a incubar por um período de 24 horas e os resultados obtidos estão registados nas Figuras 16 e 17. As células quando expostas aos extratos hidrometanólicos, na concentração de 0,5 mg/mL, apresentaram viabilidade celular perto dos 100%. No entanto, as células expostas aos extratos de diclorometano, acetato de etilo e as expostas ao clorpirifos (CPF), na concentração de 0,1 mg/mL, apresentaram uma baixa viabilidade celular, sendo que as expostas ao CPF foram as que apresentaram a menor percentagem de viabilidade. (Figura 16 e Tabela 9). A diminuição da concentração dos extratos que exibiram atividade prendeu-se com o facto de, em concentrações mais altas, serem demasiados tóxicos para permitir a avaliação de outros parâmetros.

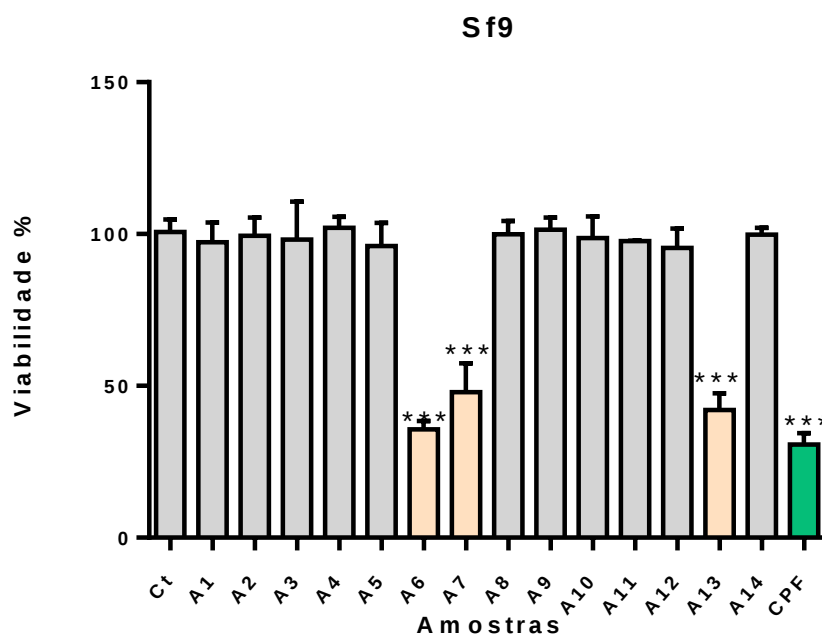


Figura 14: Gráfico da viabilidade celular das células Sf9 em %. As células quando expostas aos extratos hidrometanólicos (A1, A2, A3, A4, A5, A8, A9, A10, A11, A12 e A14) na concentração de 0,5 mg/mL apresentaram viabilidade, enquanto as células expostas aos extratos de diclorometano (A6 e A13), acetato de etilo (A7) e ao clorpirifos (CPF) na concentração 0,1 mg/mL apresentaram uma menor viabilidade.

Concluiu-se que houve diferenças significativas nos extratos de diclorometano e acetato de etilo e no CPF (***, $p < 0,001$), enquanto não se verificaram essas diferenças estatísticas para os extratos hidrometanólicos ($p < 0,05$) como se pode ver na Tabela 9.

Tabela 9: Resultados da viabilidade celular em % dos diferentes extratos a diferentes concentrações.

Amostras	Extratos	Concentração	Viabilidade celular %	Nível de significância
A1	Hidrometanólico	0,5	97,3	-
A2	Hidrometanólico	0,5	99,4	-
A3	Hidrometanólico	0,5	98,2	-
A4	Hidrometanólico	0,5	102,1	-
A5	Hidrometanólico	0,5	96,0	-
A6	Diclorometano	0,1	35,7	***, $p < 0,001$
A7	Acetato de etilo	0,1	47,9	***, $p < 0,001$
A8	Hidrometanólico	0,5	99,9	-
A9	Hidrometanólico	0,5	101,4	-
A10	Hidrometanólico	0,5	98,7	-
A11	Hidrometanólico	0,5	97,7	-
A12	Hidrometanólico	0,5	95,4	-
A13	Diclorometano	0,1	42,0	***, $p < 0,001$
A14	Hidrometanólico	0,5	99,8	-
Inseticida comercial	CPF	0,1	30,7	***, $p < 0,001$

3.2. Impacto dos extratos mais potentes na morfologia celular

De forma a compreender melhor o tipo de processo que poderia estar a ser desencadeado pelos extratos mais tóxicos, foi avaliado o impacto dos mesmos na morfologia das células em estudo.

Nas células não tratadas podemos observar elevada densidade e, de uma forma geral, a morfologia esférica característica destas células. As redes de actina são homogêneas e não se observam alterações apreciáveis na cromatina.

Por outro lado, a exposição aos extratos diclorometano e acetato de etilo levou a uma diminuição na densidade celular, sendo observado um menor número de células comparativamente às não tratadas. Da mesma forma, se observa que a actina apresenta uma distribuição menos uniforme, havendo concentrações da mesma em determinadas partes das células em detrimento de outras. Outro achado micrográfico relevante é a ocorrência de extensos e numerosos processos de fragmentação de cromatina, assinalados com as setas amarelas no canal DAPI.

Efetuaram-se outras análises e foram obtidos resultados preliminares que apontavam para ativação de enzimas “caspases-3-like” nesta espécie, designada por Drice, por estas duas amostras (A6 e A7). No entanto em função dos constrangimentos sentidos durante a execução desta tese, em particular o período de confinamento, não foi possível conduzir os necessários replicados para poder apresentar este resultado com rigor.

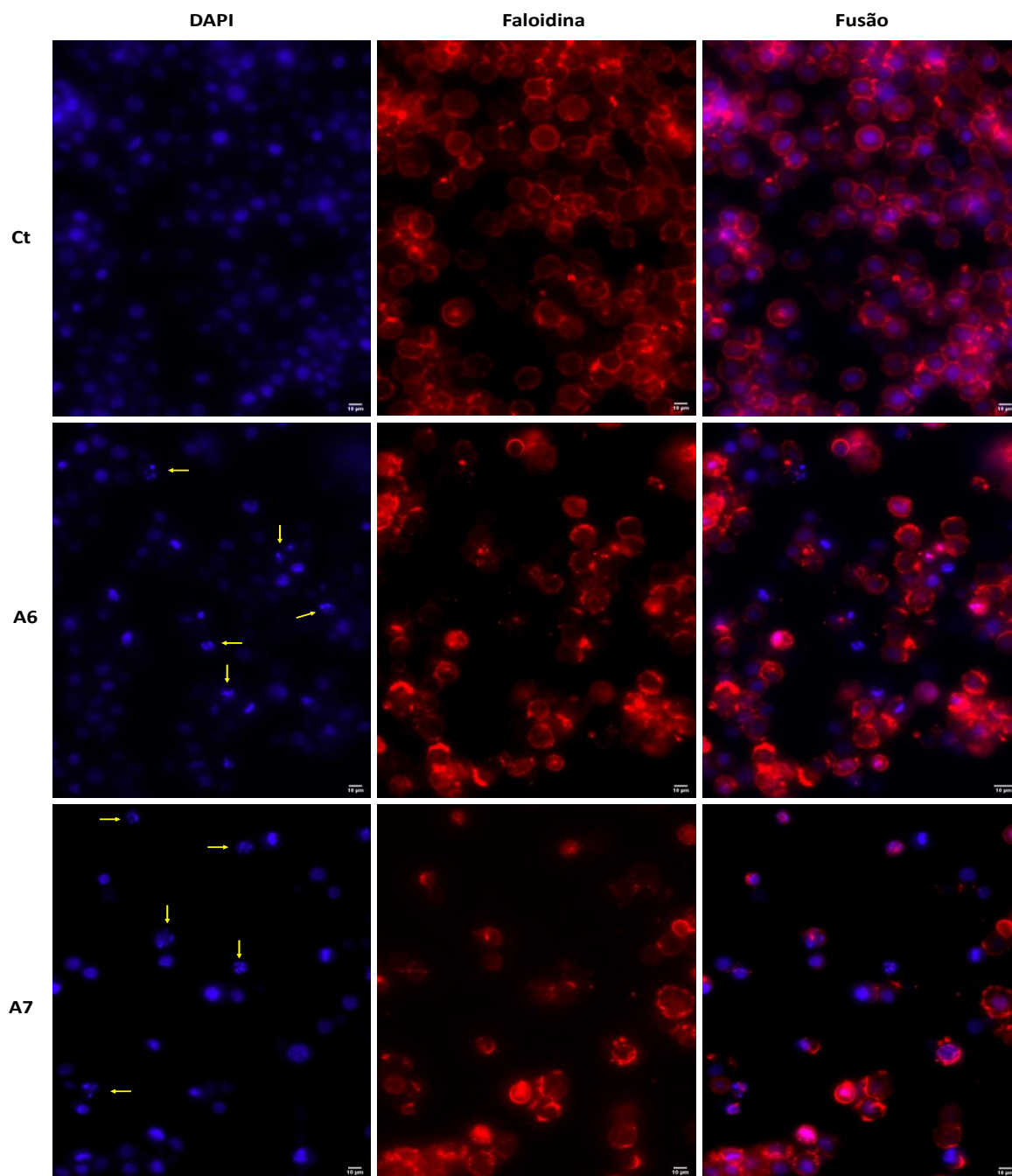


Figura 15: Células Sf9 expostas aos extratos diclorometano e acetato de etilo da espécie *R. graveolens*, tendo sido incubadas durante 24 horas e a objetiva utilizada foi de 40x. A cromatina foi marcada com DAPI e a actina foi marcada com a faloidina. As setas amarelas indicam a fragmentação da cromatina. Autoria do Prof. Dr. David Pereira.

3.3. Testes gerais de pesquisa fitoquímica: Resultados

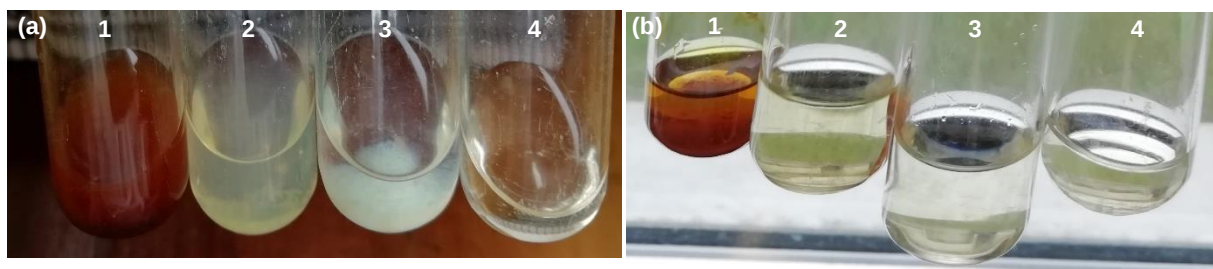
3.3.1. Teste de alcaloides

Nos testes efetuados, para despiste de alcaloides nas diferentes amostras das partes das plantas secas em estudo, obtiveram-se quatro testes positivos (A2, A3, A8 e A9) e sete negativos (A1, A4, A5, A10, A11, A12 e A14) (Tabela 10). Para que um teste seja considerado positivo tem de haver a formação de precipitado em três tubos de ensaio, sendo que, será considerado negativo, se não houver formação de precipitado nos três tubos em simultâneo (Figura 16).

Tabela 10: Resultados do teste de alcaloides nas diferentes partes das plantas secas em estudo.

Código alfanumérico	Amostras	Parte da planta	Reagente de Dragendorff		Reagente de Mayer		Reagente de Bertrand	
			Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
A1	Arruda A	Folhas	✓		✓			×
A2	Arruda B	Folhas	✓		✓		✓	
A3	Arruda B	Caules	✓		✓		✓*	
A4	Arruda C	Folhas	✓		✓			×
A5	Arruda C	Caules	✓			×		×
A6	Arruda D	Folhas	----	----	----	----	----	----
A7	Arruda E	Folhas	----	----	----	----	----	----
A8	Ceruda	Folhas	✓		✓		✓	
A9	Ceruda	Caules	✓		✓		✓	
A10	Mentrasto A	Folhas	✓			×		×
A11	Mentrasto B	Folhas	✓			×		×
A12	Mentrasto B	Caules	✓			×		×
A13	Mentrasto C	Folhas	----	----	----	----	----	----
A14	Noz	Casca Verde	✓			×		×

Nota: ✓* Amostra apresentou a formação do precipitado nos três tubos de ensaio, mas o teste com o reagente Bertrand deu positivo mas a formação do precipitado foi muito ténue. ---- Teste não efetuado por falta de matéria vegetal. As designações A, B, C, D e E são referentes às localizações distintas de onde as diferentes espécies foram colhidas.



A2 – Arruda B folhas

A11 – Mentrasto B folhas

Figura 16: Dois exemplos dos resultados dos testes de alcaloides nas diferentes partes das plantas secas. **(a) Resultado Positivo-** 1-Reagente de Dragendorff formação de um precipitado laranja; 2- Reagente de Mayer formação de um precipitado amarelo; 3- Reagente de Bertrand formação de um precipitado branco e 4- controlo. **(b) Resultado Negativo-** 1- Reagente de Drangedorff formação de um precipitado laranja; 2- Reagente de Mayer não houve formação de um precipitado amarelo; 3- Reagente de Bertrand não houve formação de um precipitado branco e 4- controlo. Fotografias da autoria da própria.

Repetiu-se o procedimento de 2.7. nos extratos hidrometanólicos das plantas onde os resultados tinham sido positivos (Tabela 10). Nos extratos hidrometanólicos de A2 e de A8 os testes de alcaloides foram positivos, enquanto nos de A3 e de A9 os testes foram negativos (Tabela 11 e Figura 17).

Tabela 11: Resultados do teste de alcaloides nos extratos hidrometanólicos.

Código alfanumérico	Amostras	Parte da planta	Reagente de Dragendorff		Reagente de Mayer		Reagente de Bertrand	
			Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
A2	Arruda B	Folhas	✓		✓		✓	
A3	Arruda B	Caules	✓			×		×
A8	Ceruda	Folhas	✓			×		×
A9	Ceruda	Caules	✓		✓		✓	

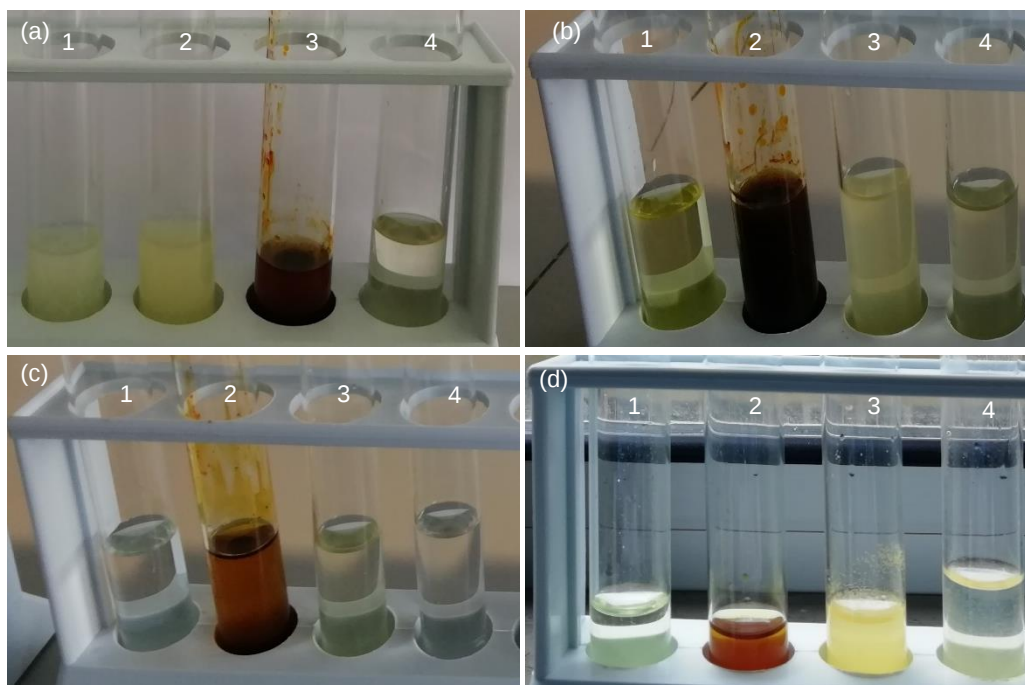


Figura 17: Teste de alcaloides nos extratos hidrometanólicos. (a) Extrato hidrometanólico de A2 resultado positivo, 1- Reagente de Bertrand formação de um precipitado branco, 2- Reagente de Mayer formação de um precipitado amarelo; 3- Reagente de Dragendorff formação de um precipitado laranja, 4- controlo; (b) Extrato hidrometanólico A3 resultado negativo, 1- Controlo, 2- Reagente de Dragendorff formação de um precipitado laranja, 3- Reagente de Mayer formação de um precipitado amarelo, 4- Reagente de Bertrand sem a formação de um precipitado branco; (c) extrato hidrometanólico A8 resultado negativo, 1- Controlo, 2- Reagente de Dragendorff formação de um precipitado laranja, 3- Reagente de Mayer sem a formação de um precipitado amarelo, 4- Reagente de Bertrand sem a formação de um precipitado branco e (d) Extrato hidrometanólico A9 resultado positivo, 1- Controlo, 2- Reagente de Dragendorff formação de um precipitado laranja, 3- Reagente de Mayer formação de um precipitado amarelo, 4- Reagente de Bertrand formação de um precipitado branco. Fotografias da autoria da própria.

3.3.2. Teste de taninos

Foi efetuado o teste de taninos tanto para as amostras das diferentes partes das espécies de plantas secas (A3, A4, A5, A8, A9, A10, A11, A12 e A14), assim como para os diferentes extratos hidrometanólicos (A1, A2, A3, A4, A5, A8, A9, A10, A11, A12 e A14). Não se efetuaram os testes nas amostras A1, A2, A6, A7 e A13, uma vez que a matéria vegetal seca disponível para este trabalho, tinha sido utilizada para a obtenção dos extratos hidrometanólicos.

3.3.2.1. Reação com a gelatina

A reação com a gelatina foi feita em todas as amostras das diferentes partes das plantas secas e verificou-se que os resultados negativos foram os das amostras A3, A4, A5, A8, A9, A10, A11 e A12, sendo que o único resultado positivo foi o da amostra A14, onde se verificou a formação de precipitado (Tabela 12). No extrato hidrometanólico de A14 o resultado desta reação também foi positivo (Figura 18).

Tabela 12: Resultados do teste de taninos nas diferentes partes das plantas secas e no extrato hidrometanólico.

Código alfanumérico	Amostras	Parte da planta	Reação com a gelatina	Reação com os sais de ferro	Reação com acetato de chumbo	Reagente de Stiasny
A1	Arruda A	Folhas	-----	-----	-----	-----
A2	Arruda B	Folhas	-----	-----	-----	-----
A3	Arruda B	Caules	×	✓	-----	-----
A4	Arruda C	Folhas	×	✓	-----	-----
A5	Arruda C	Caules	×	✓	-----	-----
A6	Arruda D	Folhas	-----	-----	-----	-----
A7	Arruda E	Folhas	-----	-----	-----	-----
A8	Ceruda	Folhas	×	✓	-----	-----
A9	Ceruda	Caules	×	✓	-----	-----
A10	Mentrasto A	Folhas	×	✓	-----	-----
A11	Mentrasto B	Folhas	×	✓	-----	-----
A12	Mentrasto B	Caules	×	✓	-----	-----
A13	Mentrasto C	Folhas	-----	-----	-----	-----
A14	Noz	Casca Verde	✓	✓	✓	✓
A14	Extrato hidrometanólico Noz	Casca Verde	✓	✓	✓	✓

Nota: x-Resultado negativo, ✓- Resultado positivo, ----- ensaios não efetuados por falta de matéria vegetal (A1, A2, A6, A7e A13). Como as amostras das diferentes partes secas apresentaram resultados negativos para o ensaio da gelatina não se efetuaram as reações seguintes (com o acetato de chumbo e com o reagente de Stiasny). As designações A, B, C, D e E são referentes às localizações distintas de onde as diferentes espécies foram colhidas.

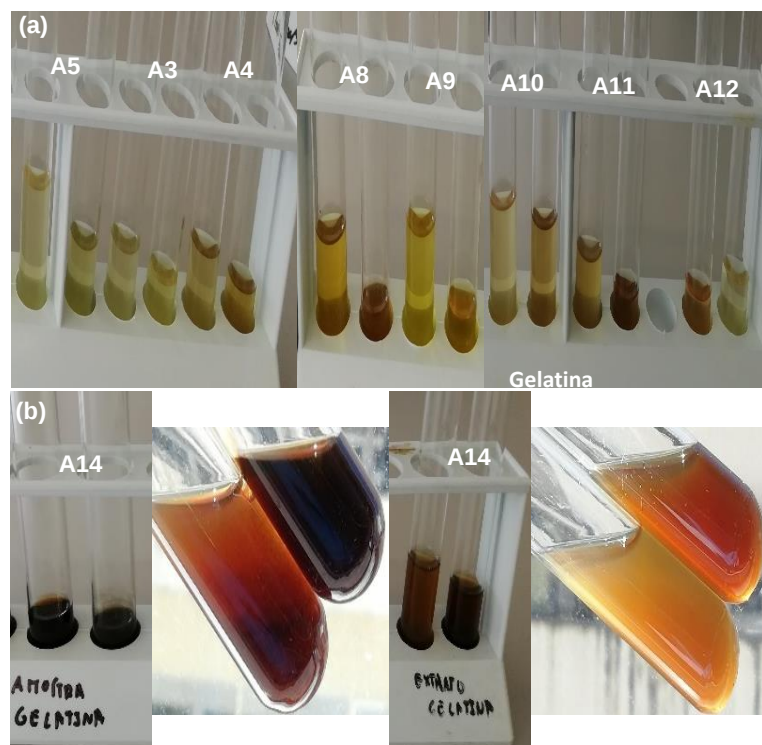


Figura 18: Testes negativos nas amostras (A3, A4, A5, A8, A9, A10, A11 e A12) para a reação com a gelatina (a), teste positivo na amostra A14 e no extrato hidrometanólico de A14 (b). Fotografias da autoria da própria.

3.3.2.2. Reação com os sais metálicos

A reação com os sais de ferro foi positiva para todas as amostras de A3, A4, A5, A8, A9, A10, A11, A12 e A14, embora ela possa resultar de outros tipos de compostos fenólicos que não os taninos (Tabela 12). Efetuou-se no extrato hidrometanólico da amostra A14 a mesma reação com um resultado também positivo (Figura 19).

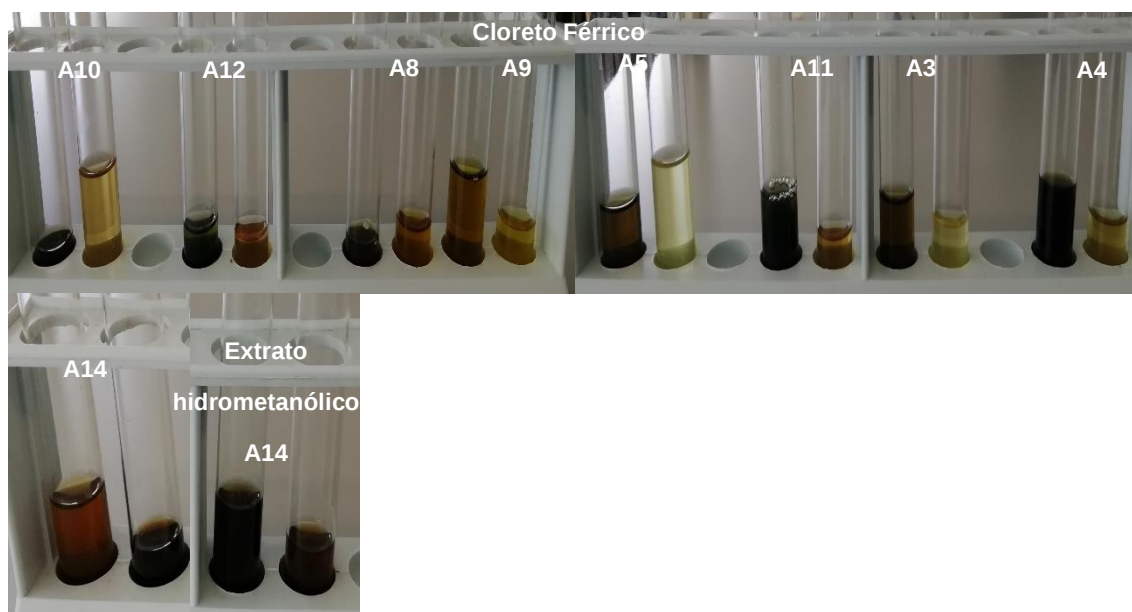


Figura 19: Resultados positivos na reação com os sais metálicos, nas amostras e no extrato hidrometanólico A14. Fotografia da autoria da própria.

3.3.2.3. Reação com o acetato de chumbo

Não se efetuaram as reações com acetato de chumbo (taninos hidrolisáveis) nas amostras que não deram positivo para a reação com a gelatina, uma vez que não possuem taninos na sua composição (Tabela 12). Na amostra A14 efetuou-se a reação com o acetato de chumbo, que foi positiva por se ter verificado a formação de um precipitado (Figura 20). No extrato hidrometanólico da amostra A14, o resultado da mesma reação também foi positivo (Figura 20).

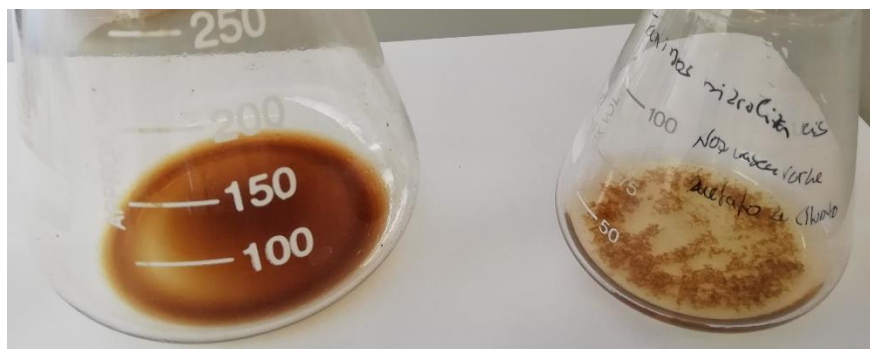


Figura 20: Resultados positivos na amostra A14 e no extrato hidrometanólico A14 na reação com o acetato de chumbo. Fotografias da autoria da própria.

3.3.2.4. Reação com o formol clorídrico

Não se efetuou a reação com formol clorídrico nas amostras negativas para a reação com a gelatina, uma vez que não possuem taninos na sua composição. Na amostra A14, efetuou-se a reação com o reagente de Stiasny (taninos condensados) tendo sido positiva por se verificar a presença de um precipitado (Tabela 12). No extrato hidrometanólico da amostra A14 procedeu-se à mesma reação tendo sido, o resultado, também positivo (Figura 21).



Figura 21: Resultados positivos da amostra A14 e extrato hidrometanólico A14 na reação com o formol clorídrico. Fotografias da autoria da própria.

3.3.3. Teste de flavonoides

Efetuuou-se o teste de flavonoides em todas as amostras das diferentes partes das plantas secas A3, A4, A5, A8, A9, A10, A11, A12 e A14 e também em todos os extratos hidrometanólicos (A1, A2, A3, A4, A5, A8, A9, A10, A11, A12 e A14).

3.3.3.1. Reação com os hidroxilos alcalinos

As amostras A3, A4, A5, A8, A9, A10, A11, A12 e A14, assim como os extratos hidrometanólicos A1, A2, A3, A4, A5, A8, A9, A10, A11, A12 e A14 deram positivos para a reação com os hidroxilos alcalinos porque existiu a formação de fenatos e as soluções adquiriram uma cor amarela (Tabela 13 e Figura 23; Tabela 14 e Figura 24, respetivamente).

Tabela 13: Resultados do teste de flavonoides nas diferentes partes das plantas secas.

Código alfanumérico	Amostras	Parte da planta	Reação com os hidroxilos alcalinos	Reação com sais metálicos	Reação da cianidina	Reação Oxalo-bórica
A1	Arruda A	Folhas	-----	-----	-----	-----
A2	Arruda B	Folhas	-----	-----	-----	-----
A3	Arruda B	Caules	✓	✓	✓	×
A4	Arruda C	Folhas	✓	✓	✓	×
A5	Arruda C	Caules	✓	✓	✓	×
A6	Arruda D	Folhas	-----	-----	-----	-----
A7	Arruda E	Folhas	-----	-----	-----	-----
A8	Ceruda	Folhas	✓	✓	✓	✓
A9	Ceruda	Caules	✓	✓	✓	×
A10	Mentrasto A	Folhas	✓	✓	✓	×
A11	Mentrasto B	Folhas	✓	✓	✓	×
A12	Mentrasto B	Caules	✓	✓	✓	×
A13	Mentrasto C	Folhas	-----	-----	-----	-----
A14	Noz	Casca verde	✓	✓	✓	×

Nota: x-Resultado negativo, ✓- Resultado positivo, ----- ensaio não efetuado por falta de matéria vegetal. As designações A, B, C, D e E são referentes às localizações distintas de onde as diferentes espécies foram colhidas.

Tabela 14: Resultados do teste de flavonoides nos extratos hidrometanólicos, diclorometano e acetato de etilo (A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12, A13 e A14)

Código alfanumérico	Amostras	Parte da planta	Reação com os hidroxilos alcalinos	Reação com sais metálicos	Reação da cianidina	Reação Oxalo-bórica
A1	Extrato hidrometanólico Arruda A	Folhas	✓	✓	✓	✓
A2	Extrato hidrometanólico Arruda B	Folhas	✓	✓	✓	✓
A3	Extrato hidrometanólico Arruda B	Caules	✓	✓	✓	----
A4	Extrato hidrometanólico Arruda C	Folhas	✓	✓	✓	----
A5	Extrato hidrometanólico Arruda C	Caules	✓	✓	✓	----
A6	Extrato de diclorometano Arruda D	Folhas	----	----	----	----
A7	Extrato de acetato de etilo Arruda E	Folhas	----	----	----	----
A8	Extrato hidrometanólico Ceruda	Folhas	✓	✓	×	✓
A9	Extrato hidrometanólico Ceruda	Caules	✓	✓	×	----
A10	Extrato hidrometanólico Mentrasto A	Folhas	✓	✓	✓	----
A11	Extrato hidrometanólico Mentrasto B	Folhas	✓	✓	✓	----
A12	Extrato hidrometanólico Mentrasto B	Caules	✓	✓	×	----
A13	Extrato de diclorometano Mentrasto C	Folhas	----	----	----	----
A14	Extrato hidrometanólico Noz	Casca verde	✓	✓	✓	----

Nota: x-Resultado negativo, ✓- Resultado positivo, ---- ensaio não efetuado por falta de quantidade dos extratos diclorometano e acetato de etilo e por terem dado negativos nas diferentes partes secas das plantas. As designações A, B, C, D e E são referentes às localizações distintas de onde as diferentes espécies foram colhidas.

3.3.3.2. Reação com os sais metálicos

Para a reação com os sais metálicos, as amostras (A3, A4, A5, A8, A9, A10, A11, A12 e A14) e os extratos hidrometanólicos (A1, A2, A3, A4, A5, A8, A9, A10, A11, A12 e A14) também deram positivos havendo um desenvolvimento de cor que se revelou variável consoante o grupo de flavonoides presente (Figuras 22 e 23). Como se pode observar nas Tabelas 13 e 14 respetivamente.

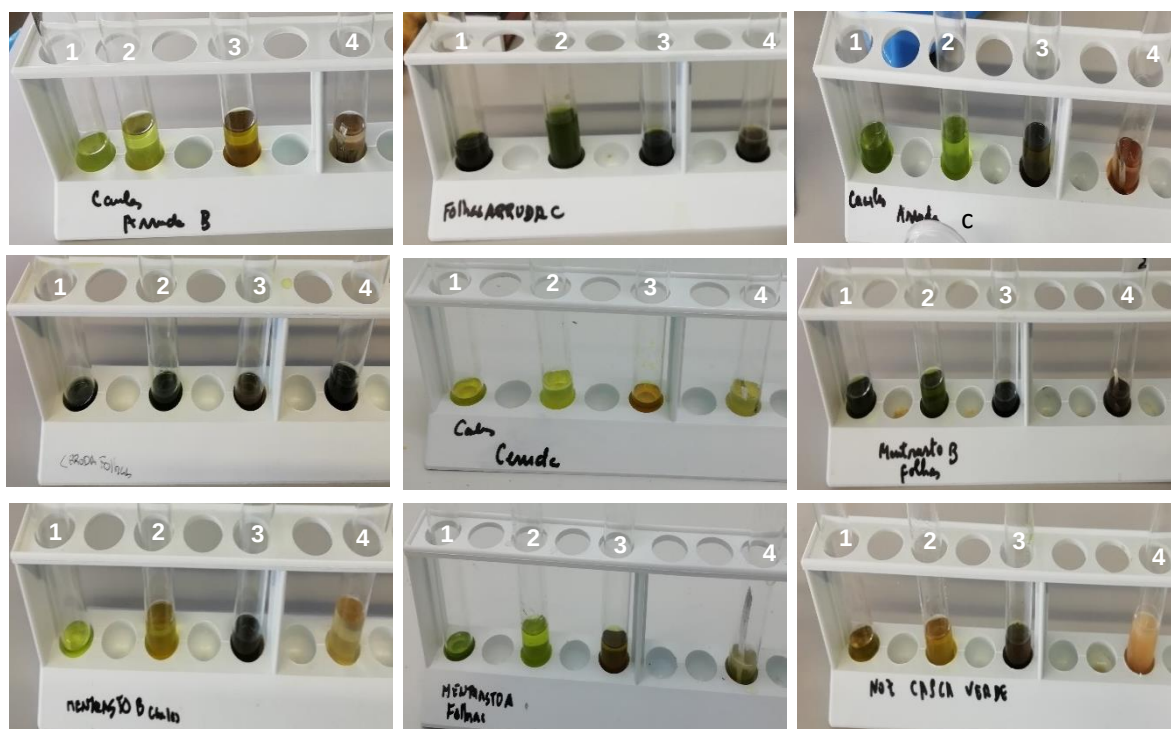


Figura 22: Resultados nas amostras das diferentes partes das plantas secas. 1- controle, 2- reação com os hidroxilos alcalinos, 3- reação com os sais metálicos e 4- reação da cianidina. Fotografias da autoria da própria.

3.3.3.3. Reação da cianidina

Na reação da cianidina todas as amostras A3, A4, A5, A8, A9, A10, A11, A12 e A14 deram positivas pois houve formação de cor vermelha, rósea ou castanha (Tabela 13 e Figura 24). Nos extratos hidrometanólicos algumas reações foram positivas (A1, A2, A3, A4, A5, A10, A11 e A14) enquanto outras foram negativas (A8, A9 e A12) (Tabela 14 e Figura 25) por não ter havido formação de cores vermelha, rósea ou castanha.

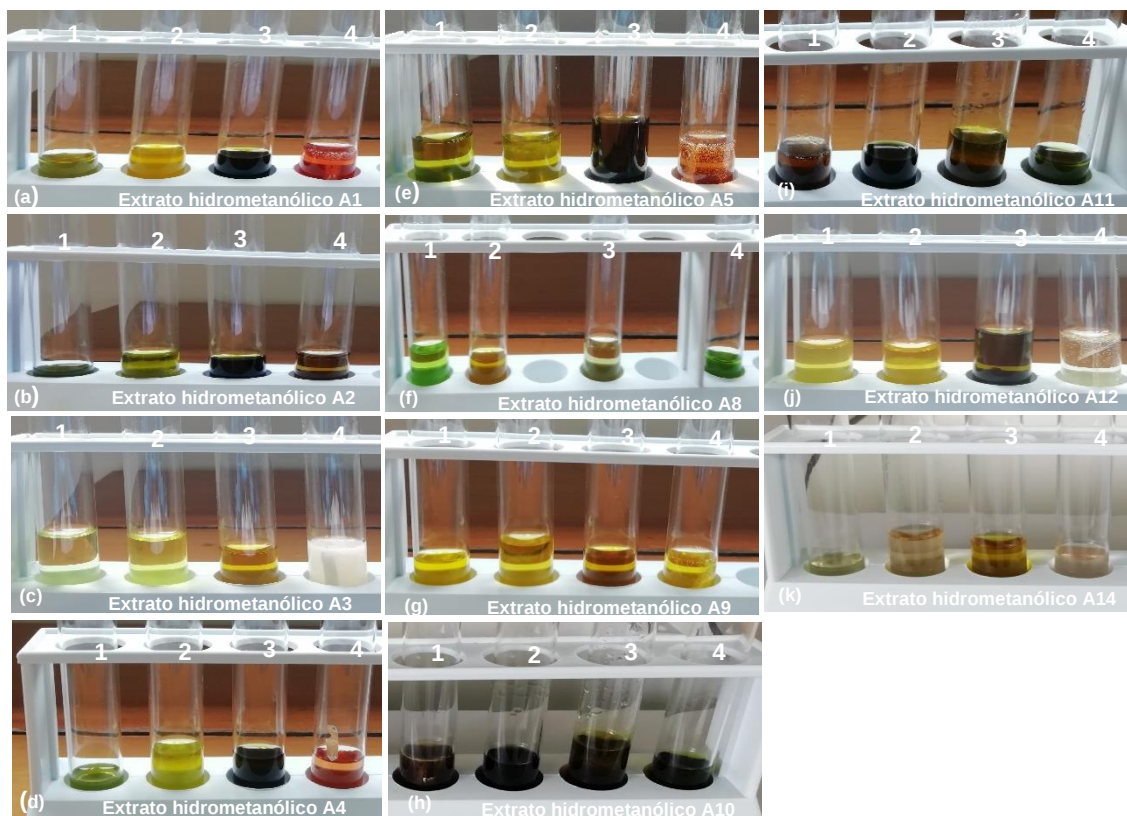


Figura 23: Resultados positivos nos diferentes extratos hidrometanólicos. (a), (b), (c), (d), (e), (g), (j) e (k) 1- controle; 2- reação com os hidroxilos alcalinos, 3- reação com os sais metálicos e 4- reação da cianidina. (h) e (i) 1- reação cianidina; 2- reação com os sais metálicos; 3- reação com os hidróxidos alcalinos e 4- controle. (f) 1- reação com os hidróxidos alcalinos; 2- reação com os sais de ferro; 3- reação da cianidina e 4- controle. Fotografias da autoria da própria.

3.3.3.4. Reação oxalo-bórica

No caso da reação oxalo-bórica, a única amostra que deu positiva foi a A8 porque desenvolveu uma fluorescência amarela-esverdeada (Figura 24 [c]), sendo que as restantes amostras (A3, A4, A5, A9, A10, A11, A12 e A14) deram negativas, umas por não apresentam qualquer fluorescência e outras porque desenvolveram a fluorescência vermelha como foi o caso da amostra A10 (Figura 24 [b]), como se pode ver na Tabela 14. A mesma reação foi efetuada nos extratos hidrometanólicos (A1, A2 e A8) onde os resultados se revelaram positivos. Nos restantes extratos hidrometanólicos, esta reação não se efetuou, uma vez que já tinha sido verificado que estas amostras não possuíam este tipo de compostos na sua composição.

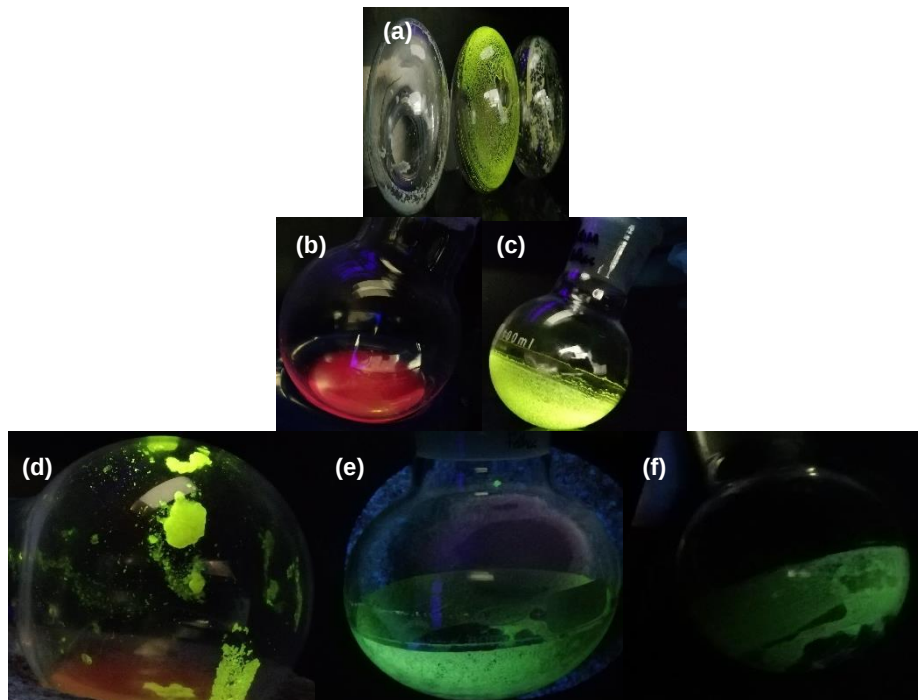


Figura 24: Resultados da reação oxalo-bórica. (a) Amostras que não se obteve fluorescência e uma que obteve fluorescência. (b) Amostra A10 que adquiriu fluorescência vermelha. (c) Amostra A8 que adquiriu fluorescência. (d) Extrato hidrometanólico A8 adquiriu fluorescência. (e) Extrato hidrometanólico A1 adquiriu fluorescência e (f) Extrato hidrometanólico A2 adquiriu fluorescência. Fotografias da autoria da própria.

3.3.4. Teste de saponósidos

Os testes para saponósidos, com amostras das diferentes partes das plantas secas, deram quase todos negativos (A3, A4, A5, A8, A9, A10, A11 e A12) sendo a amostra A14 a única a apresentar resultado positivo, correspondente ao aparecimento de um anel de espuma (nos tubos III a X) passados 15 minutos após a agitação (Tabela 15 e Figura 25). Nas amostras A8 e A9 apareceu o anel de espuma nos tubos IX e X mas este desvaneceu-se antes dos 15 minutos pelo que foi considerado resultado negativo. Repetiu-se o procedimento de 2.10 para o extrato hidrometanólico da A14 tendo sido o resultado também positivo como se esperava, tendo aparecido o anel de espuma nos tubos de III a X.

Tabela 15: Resultados do teste dos saponósitos nas diferentes partes das plantas secas e no extrato hidrometanólico A14.

Código Alfanumérico	Tubos		I	II	III	IV	V
	Amostras	Parte da planta	Formação do anel de espuma	Formação do anel de espuma	Formação do anel de espuma	Formação do anel de espuma	Formação do anel de espuma
A1	Arruda A	Folhas	----	----	----	----	----
A2	Arruda B	Folhas	----	----	----	----	----
A3	Arruda B	Caules	X	X	X	X	X
A4	Arruda C	Folhas	X	X	X	X	X
A5	Arruda C	Caules	X	X	X	X	X
A6	Arruda D	Folhas					
A7	Arruda E	Folhas					
A8	Ceruda	Folhas	X	X	X	X	X
A9	Ceruda	Caules	X	X	X	X	X
A10	Mentrasto A	Folhas	X	X	X	X	X
A11	Mentrasto B	Folhas	X	X	X	X	X
A12	Mentrasto B	Caules	X	X	X	X	X
A13	Mentrasto C	Folhas					
A14	Noz	Casca Verde	X	X	✓	✓	✓
A14	Extrato hidrometanólico Noz	Casca Verde	X	X	✓	✓	✓
Código Alfanumérico	Tubos		VI	VII	VIII	IX	X
	Amostras	Parte da planta	Formação do anel de espuma	Formação do anel de espuma	Formação do anel de espuma	Formação do anel de espuma	Formação do anel de espuma
A1	Arruda A	Folhas	----	----	----	----	----
A2	Arruda B	Folhas	----	----	----	----	----
A3	Arruda B	Caules	X	X	X	X	X
A4	Arruda C	Folhas	X	X	X	X	X
A5	Arruda C	Caules	X	X	X	X	X
A6	Arruda D	Folhas	----	----	----	----	----
A7	Arruda E	Folhas	----	----	----	----	----
A8	Ceruda	Folhas	X	X	X	X	X
A9	Ceruda	Caules	X	X	X	X	X
A10	Mentrasto A	Folhas	X	X	X	X	X
A11	Mentrasto B	Folhas	X	X	X	X	X
A12	Mentrasto B	Caules	X	X	X	X	X
A13	Mentrasto C	Folhas	----	----	----	----	----
A14	Noz	Casca Verde	✓	✓	✓	✓	✓
A14	Extrato hidrometanólico Noz	Casca Verde	✓	✓	✓	✓	✓

Nota: x-Resultado negativo, ✓- Resultado positivo, ---- ensaio não efetuado por falta de matéria vegetal. As designações A, B, C, D e E são referentes às localizações distintas de onde as diferentes espécies foram colhidas.



Figura 25: Resultados dos testes de saponósidos nas amostras das diferentes partes das plantas secas e no extrato hidrometanólico A14. Resultados positivos estão nos retângulos vermelhos.

3.4. Análise de cromatográfica: Resultados

Neste estudo, as análises feitas por HPLC-DAD aos extratos que estavam a ser utilizados e revelavam ação inseticida, os extratos de diclorometano e o acetato de etilo, resultaram cromatogramas das espécies *A. conyzoides* e *R. graveolens*, que permitiram identificar alguns compostos que esses extratos possuíam.

Inicialmente, as análises foram feitas com concentrações dos extratos de 40 mg/mL.

Diluíram-se então as amostras, ficando cada uma delas com concentrações de 20 mg/mL o que permitiu a obtenção dos cromatogramas do extrato diclorometano da espécie *R. graveolens* (Tabela 16 e Figuras 26 a 29), cromatograma do extrato de acetato de etilo da espécie *R. graveolens* (Tabela 17 e Figuras 31 a 34) e cromatograma do extrato de diclorometano do *A. conyzoides* (Tabela 18 e Figuras 36 a 40) e os seus respectivos espectros UV/vis.

3.4.1. Cromatograma do extrato diclorometano da espécie *R. graveolens*

Os comprimentos mais adequados para estas corridas cromatográficas foram os 250 e 320 nm, por corresponderem aos máximos de absorção dos compostos maioritários.

Tabela 16: Cromatograma do extrato diclorometano da espécie *R. graveolens* a 20 mg/mL e respetivos picos estão assinalados na Figura 27.

Corrida	Tempo de retenção (minutos)	λ máximos	Picos
Cromatograma do extrato diclorometano a 20 mg/mL	52,14	250-295-330	1
	59,29	251-296-307-327	2
	61,37	260-288-330	3
	62,56	250-291-329	4
	62,81	270-278-330	5
	63,16	276-281-331	6
	63,75	250-285-329	7

Apresentam-se, então, as corridas cromatográficas nos dois comprimentos de onda em questão e os cromatogramas no tempo completo e parcial para ambos os comprimentos de onda, respetivamente.

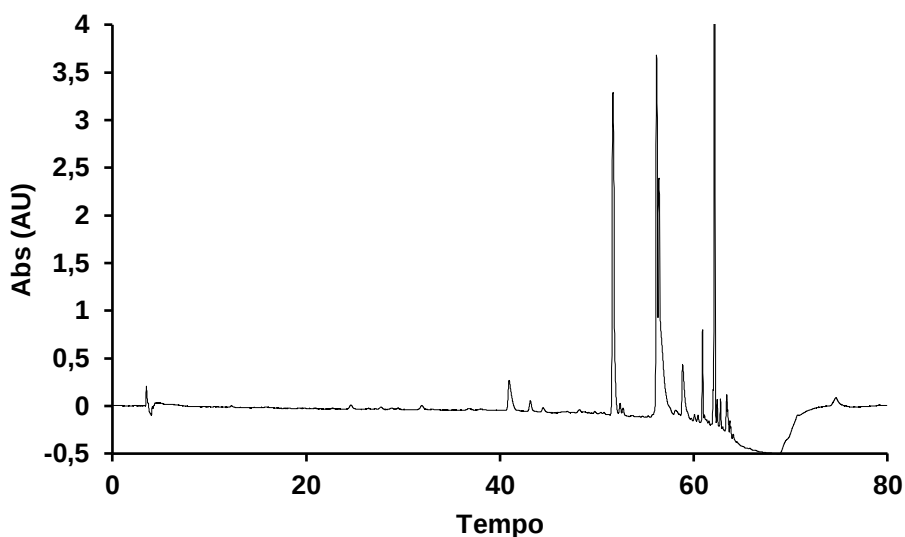


Figura 26: Cromatograma completo do extrato diclorometano a 20 mg/mL da espécie *R. graveolens* e a 250 nm.

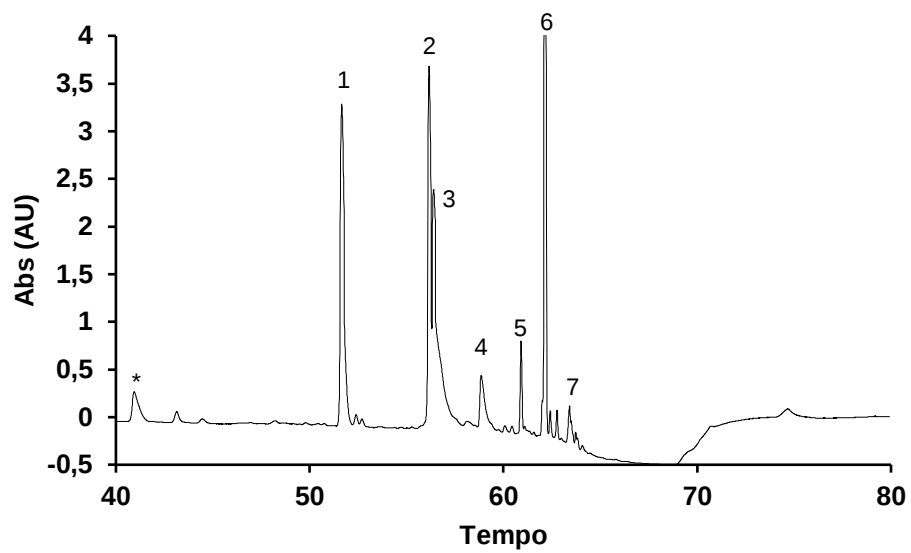


Figura 27: Cromatograma parcial do extrato diclorometano a 20 mg/mL da espécie *R. graveolens* e a 250 nm. 1- Psoraleno. *8-Metoxipsoraleno.

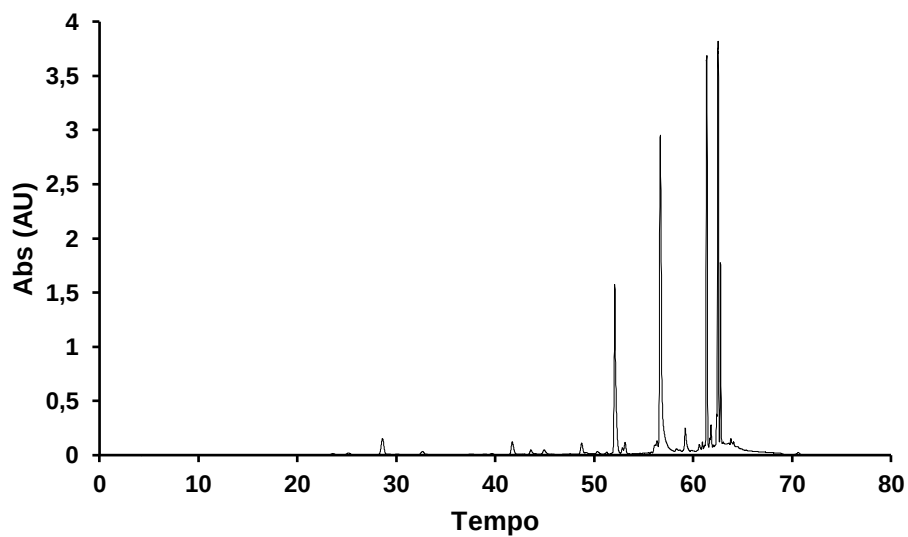


Figura 28: Cromatograma completo do extrato diclorometano a 20 mg/mL da espécie *R. graveolens* e a 320 nm.

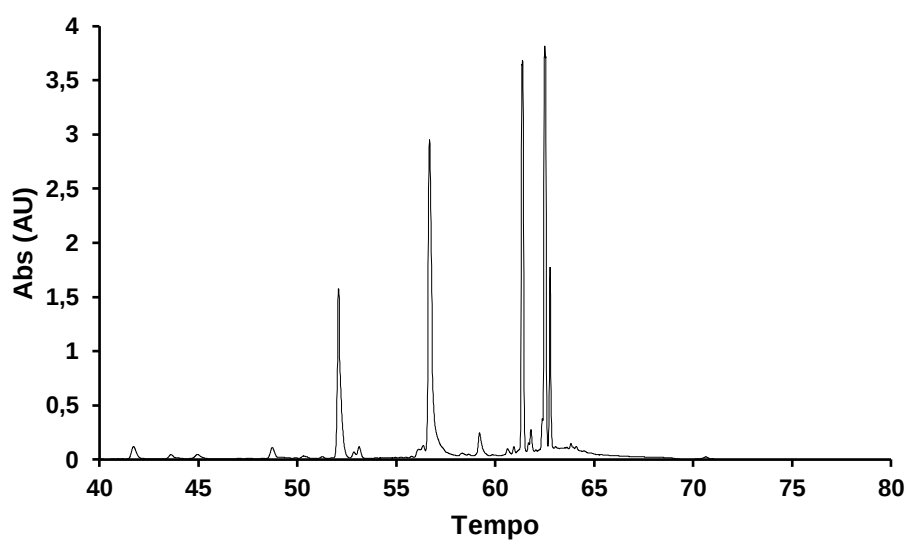


Figura 29: Cromatograma parcial do extrato diclorometano a 20 mg/mL da espécie *R. graveolens* e a 320 nm.

Apresentam-se, de seguida, os espectros de UV/vis dos diferentes picos (Figura 27) da corrida cromatográfica do extrato diclorometano da espécie *R. graveolens*.

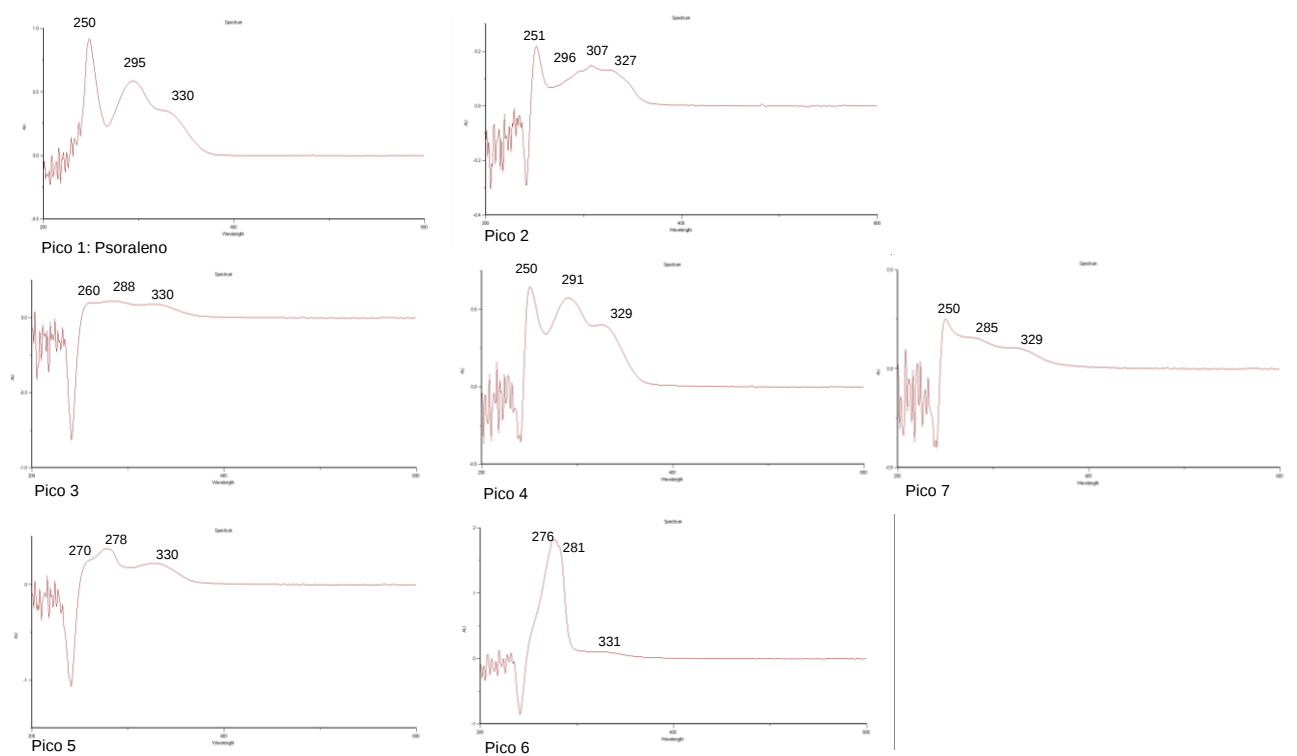


Figura 30: Espectros UV/vis do extrato diclorometano da espécie *R. graveolens*. Pico identificado: Pico 1- psoraleno.

3.4.2. Cromatograma do extrato acetato de etilo da espécie *R. graveolens*

Os comprimentos mais adequados para estas corridas cromatográficas foram os 250 e 320 nm por representarem os máximos de absorção dos compostos maioritários.

Tabela 17: Cromatograma do extrato de acetato de etilo a 20 mg/mL da espécie *R. graveolens* e respetivos picos estão assinalados na Figura 32.

Corrida	Tempo de retenção (minutos)	λ máximos	Picos
Cromatograma do extrato acetato de etilo a 20 mg/mL	52,33	250-295-330	1
	56,80	250-308-320-333	2
	59,38	254-291-323	3
	61,42	259-292-332	4
	62,51	250-289-330	5
	63,70	259	6

Os cromatogramas da corrida cromatográfica do extrato de acetato de etilo da espécie *R. graveolens* estão representados nos comprimentos de onda acima indicados, tanto no tempo completo como de modo parcial.

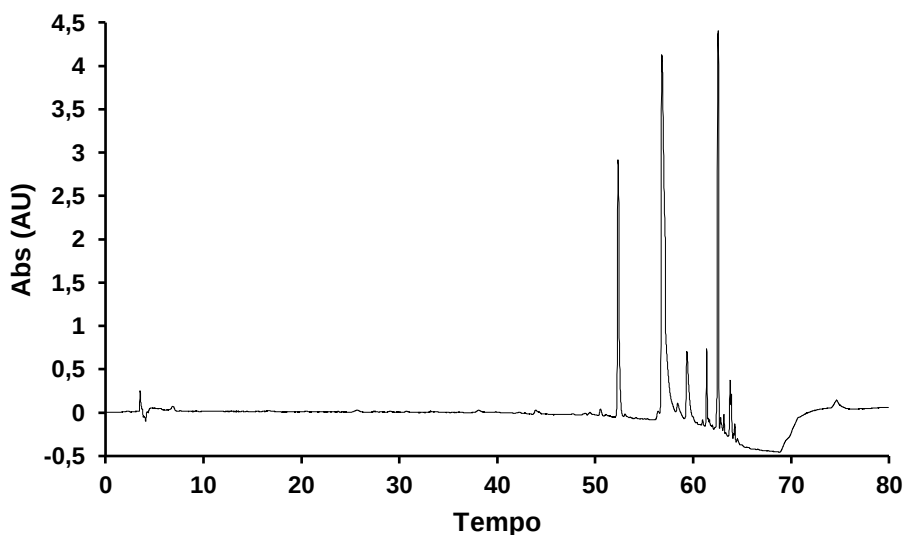


Figura 31: Cromatograma completo do extrato de acetato de etilo a 20 mg/mL da espécie *R. graveolens* a 250 nm.

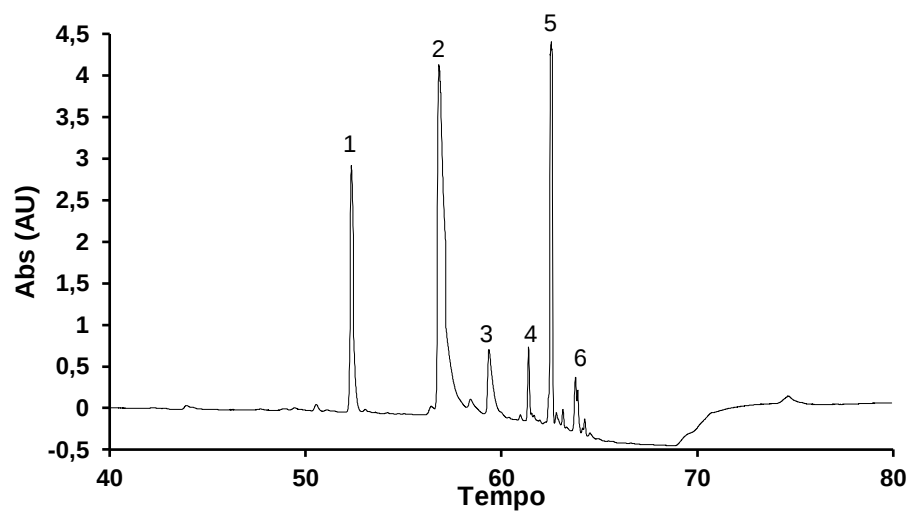


Figura 32: Cromatograma parcial do extrato de acetato de etilo a 20 mg/mL da espécie *R. graveolens* a 250 nm. 1-Psoraleno.

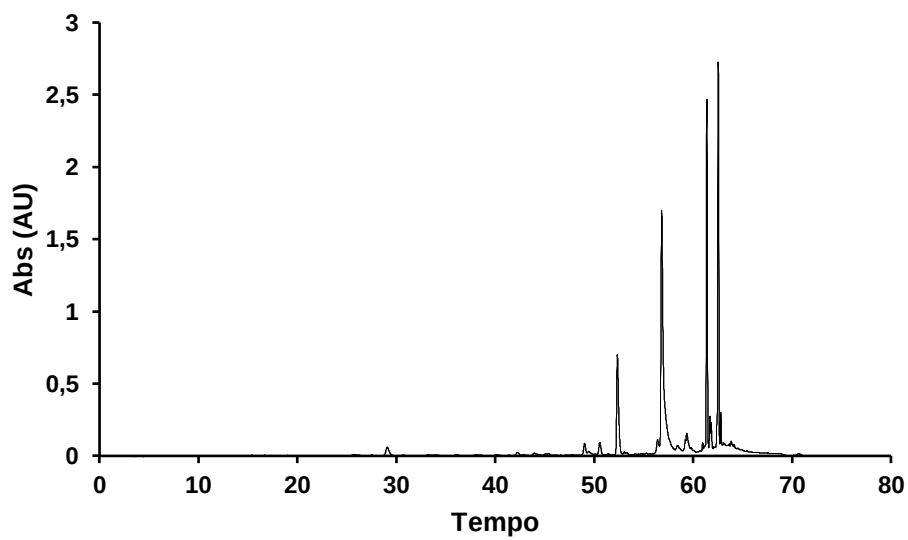


Figura 33: Cromatograma completo do extrato de acetato de etilo a 20 mg/mL da espécie da *R. graveolens* a 320 nm.

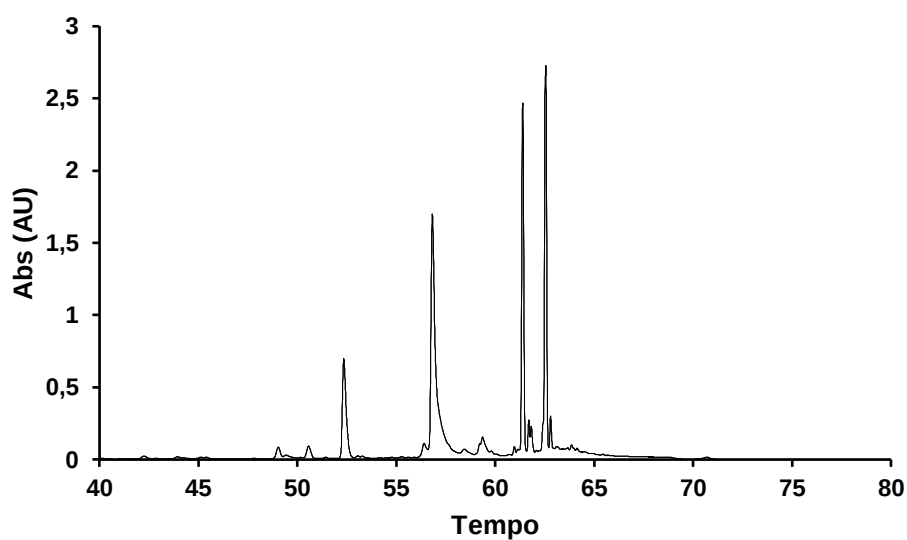


Figura 34: Cromatograma parcial do extrato de acetato de etilo a 20 mg/mL da espécie *R. graveolens* a 320 nm.

Na figura 35 estão representados os espectros UV/vis dos picos maioritários (Figura 32) da corrida cromatográfica do extrato acetato de etilo da *R. graveolens*.

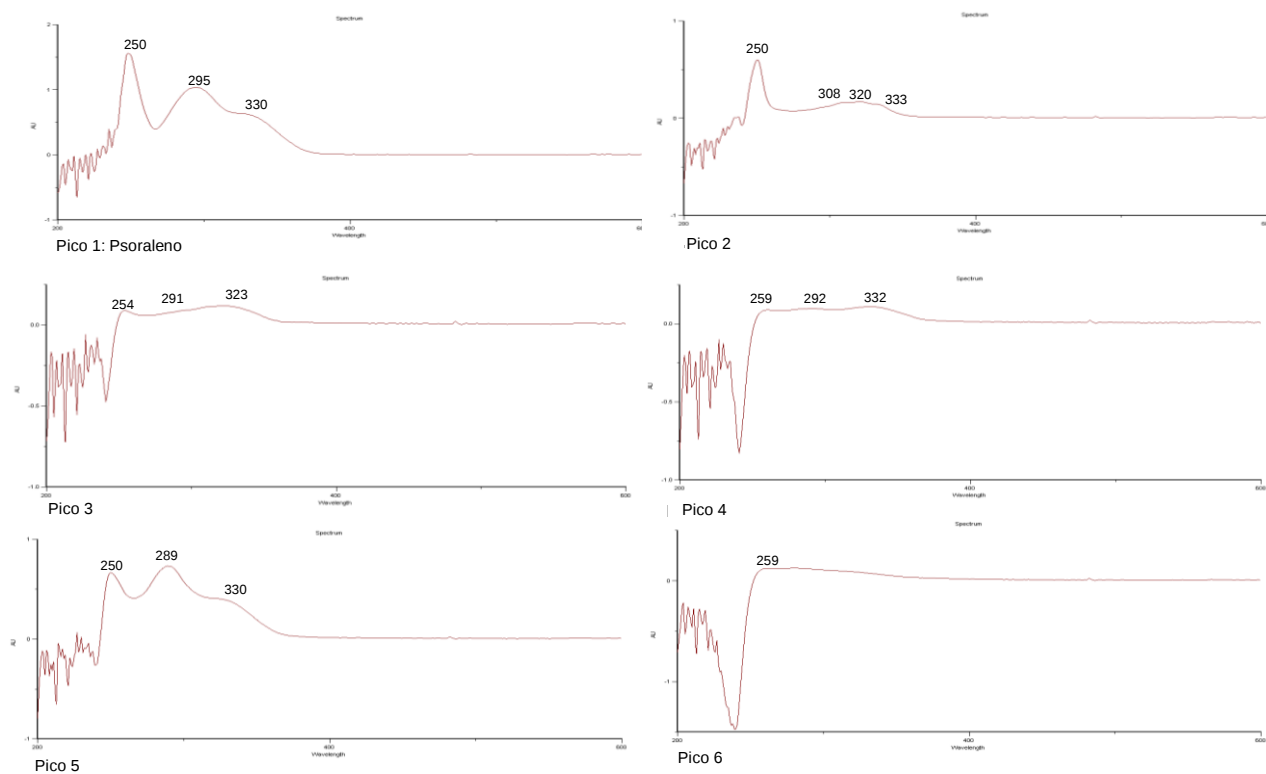


Figura 35: Espectros UV/vis do extrato de acetato de etilo da espécie *R. graveolens*. Pico identificado: Pico 1-psoraleno

3.4.3. Cromatograma do extrato de diclorometano a 20 mg/mL da espécie *A. conyzoides*

Para estas corridas cromatográficas, os comprimentos de onda mais adequados foram os 250 e 320 nm, por representarem os máximos de absorção dos compostos maioritários.

Tabela 18: Cromatograma do extrato de diclorometano da espécie *A. conyzoides* e respectivos picos estão assinalados na Figura 37.

Corrida	Tempo de retenção (minutos)	λ máximos	Picos
Cromatograma do extrato de diclorometano a 20 mg/mL	53,03	250-295-330	1
	57,30	260-267-311	2
	59,91	250-308-321-333	3
	61,41	254-293-306	4
	61,88	259-287-298-333	5
	62,57	254-286-327	6

De seguida estão representados os cromatogramas da corrida cromatográfica do extrato *A. conyzoides* nos comprimentos de onda indicados e ambos foram representados no tempo total e parcial respetivamente.

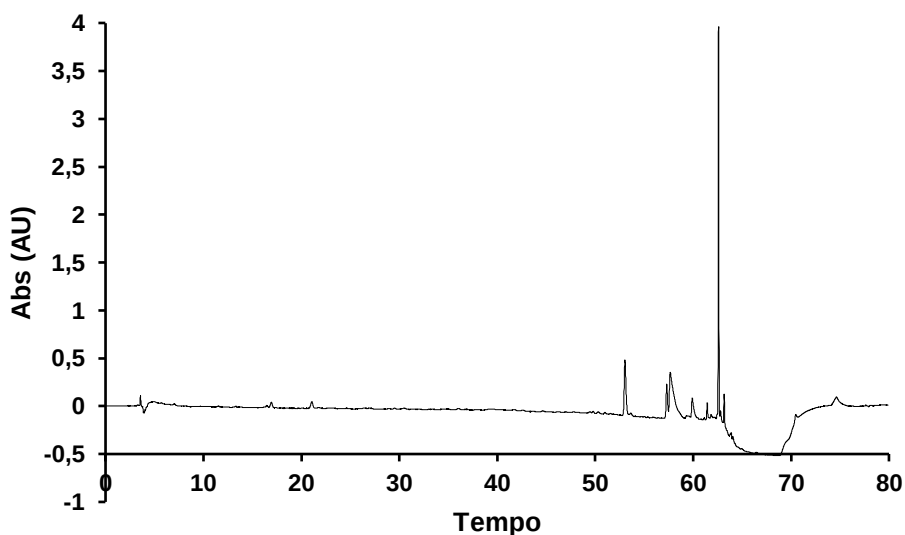


Figura 36: Cromatograma completo do extrato diclorometano a 20 mg/mL da espécie *A. conyzoides* a 250 nm.

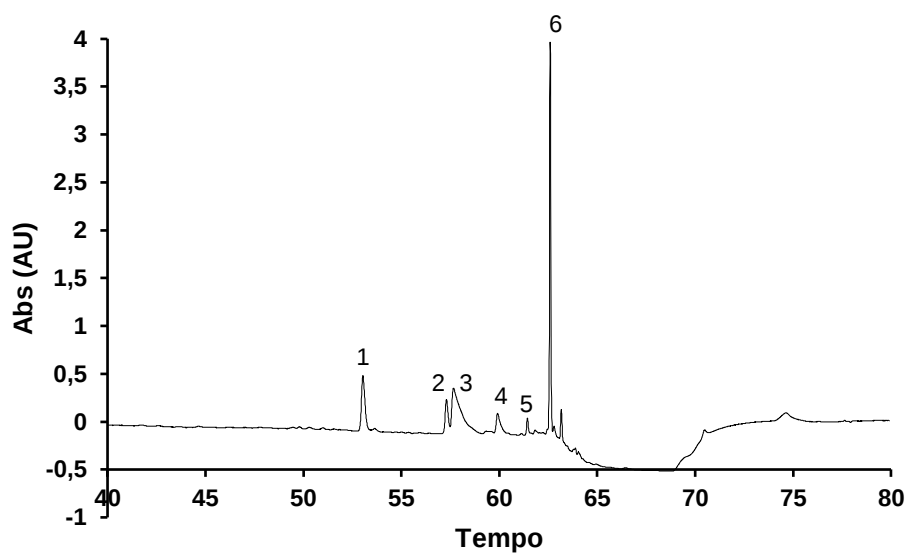


Figura 37: Cromatograma parcial do extrato de diclorometano a 20 mg/mL da espécie *A. conyzoides* a 250 nm. 1-Psoraleno. 2-Bergapteno.

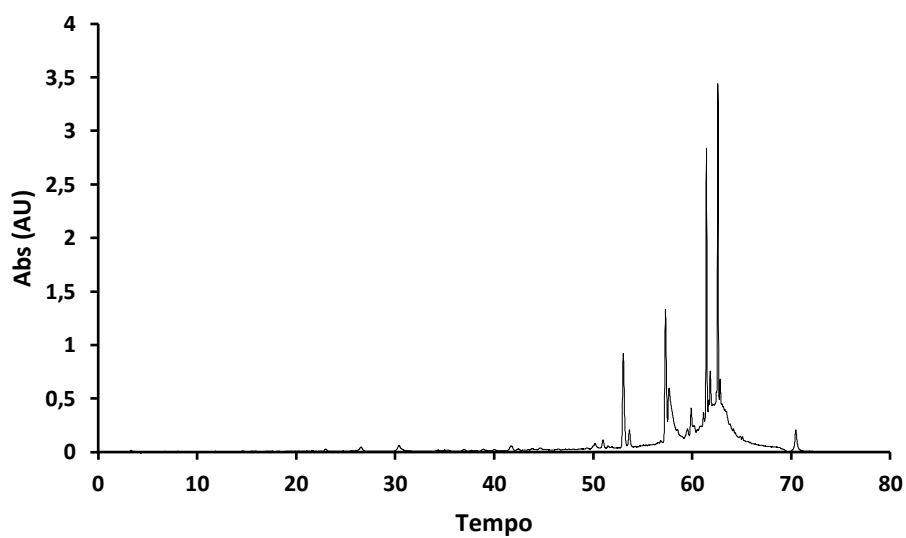


Figura 38: Cromatograma completo do extrato de diclorometano a 20 mg/mL da espécie *A. conyzoides* a 320 nm.

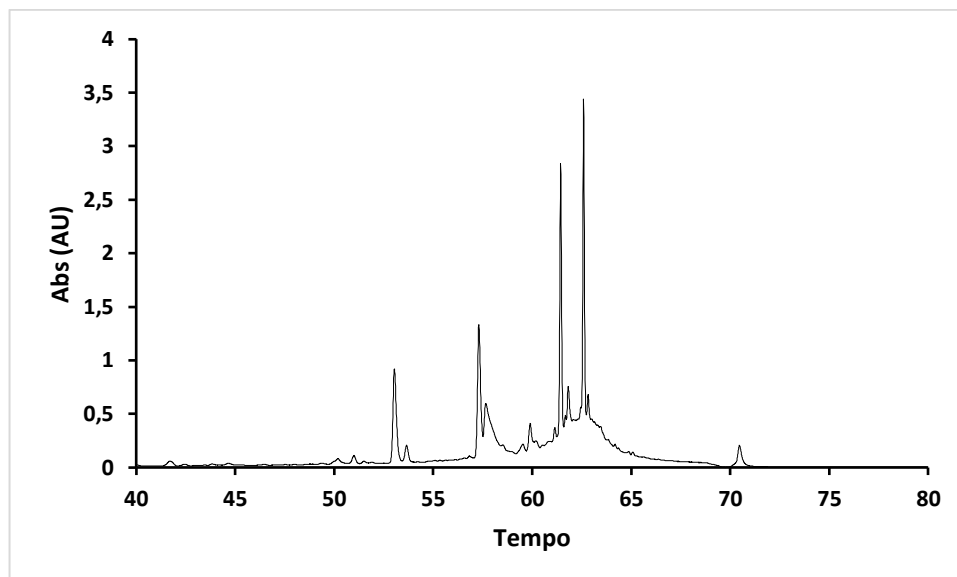


Figura 39: Cromatograma parcial do extrato de diclorometano a 20 mg/mL da espécie *A. conyzoides* a 320 nm.

Na Figura 40 estão representados os espectros de UV/vis dos picos maioritários (Figura 37) da corrida cromatográfica do extrato de diclorometano da espécie *A. conyzoides*.

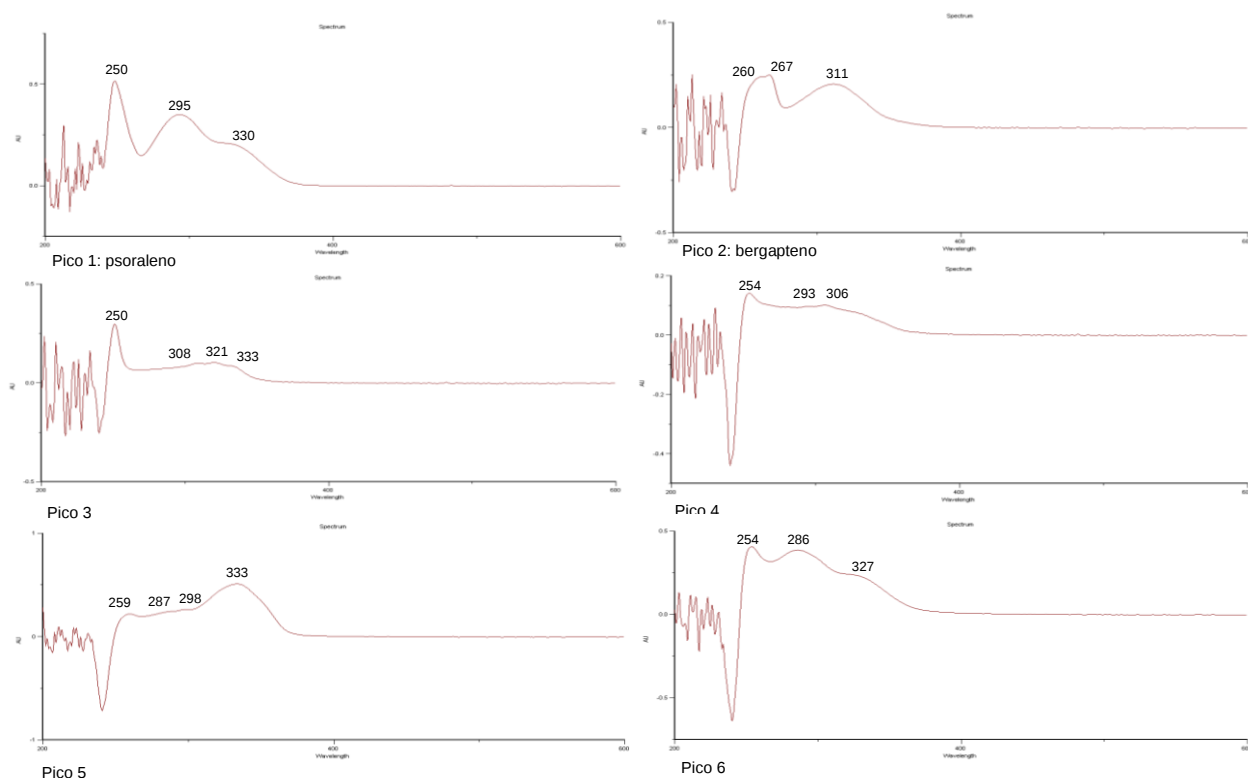


Figura 40: Espectros UV/vis do extrato de diclorometano da espécie *A. conyzoides*. Picos identificados: Pico 1- psoraleno e Pico 2: bergapteno

Para a identificação dos compostos que estavam presentes nas amostras efetuou-se uma breve pesquisa bibliográfica, sobre espectros de UV-Vis, tendo verificado que havia uma forte possibilidade de conterem cumarinas. Injetaram-se, então as amostras fortificadas com algumas cumarinas tais como cumarina, 8-metoxipsoraleno, psoraleno e bergapteno.

O extrato de diclorometano da espécie *R. graveolens* foi fortificado com a mistura 5-metoxipsoraleno mais cumarina, enquanto o extrato de acetato de etilo da espécie *R. graveolens*, com a mistura psoraleno mais bergapteno. O extrato de diclorometano, da espécie *A. conyzoides* não foi fortificado com substâncias de referência uma vez que a amostra existente já não era suficiente, no entanto foi possível identificar os compostos por comparação com substâncias de referência.

No cromatograma do extrato de diclorometano da espécie *R. graveolens* conseguiu-se, através do tempo de retenção, do espectro UV/vis e estudos de co-cromatografia, identificar 8- metoxipsoraleno, enquanto no cromatograma do extrato de acetato de etilo da espécie *R. graveolens* conseguiu identificar-se o psoraleno. Estava também presente no cromatograma do extrato de diclorometano da espécie *A. conyzoides* o psoraleno e o bergapteno tendo sido possível identificá-los com base no comportamento cromatográfico e máximos de absorção.

4. Discussão

4.1. Extratos

As variações nas concentrações de metabolitos secundários são resultantes de fatores bióticos e abióticos tais como a temperatura, humidade, duração e intensidade da radiação solar e chuva (186,187).

Para que os extratos apresentem atividade biológica é preciso considerar vários fatores, nomeadamente a parte da planta utilizada, o método de extração usado, o solvente utilizado, a localização geográfica onde a planta foi colhida, a concentração da matéria vegetal usada para a obtenção do extrato e a fotossensibilidade dos compostos presentes na mesma (96). A escolha do solvente é muito importante durante o processo de extração para que possam ser obtidos extratos com elevada atividade uma vez que estão presentes fitoquímicos de volatilidades diferentes (156,188). O objetivo do processo extrativo é retirar a maior quantidade de compostos bioativos que a planta possa ter (188). Para garantir a extração dos fitoquímicos, que possuam diferentes propriedades, normalmente utilizam-se diferentes solventes (sozinhos ou misturados), sabendo-se que os solventes polares extraem moléculas polares e os solventes apolares extraem moléculas apolares (188), de modo a obter uma maior extração de compostos bioativos, tendo em conta a existência de diferenças na composição das várias plantas (189).

Os solventes extrativos mais utilizados nas espécies em estudo, são o éter de petróleo (190,191,192–199,200,201), o benzeno (190), o clorofórmio (193,195,199,202–206), o metanol (207,208,209,210–216,217–226,227–232), o etanol (211,220–222,228,230–245), a água (217,220–222,225,230,233,235,245–256), o hexano (230,233,237,257–259), os hidroalcoólicos (102,103,108,130,142,169,192,237,260,261) [o hidroetanólicos (102,110,114,262,263) e o hidrometanólicos (114,125,224)], o diclorometano (138,208,210,225,260,264–266) e o acetato de etilo (220,225,233,259,267,268) entre outros, sendo que estes extratos dependem da atividade biológica que se esteja a estudar.

4.2. Viabilidade celular

No caso das espécies de plantas que foram utilizadas neste estudo os extratos mais utilizados para a avaliação da atividade inseticida são os extratos de hexano (88,90,102,236), água, metanol, etanol, de éter de petróleo, de acetato de etilo,

(2,8,189,195,206,230,235,236,248,252,269,88,90,96,97,102,160,161,175). Tendo em conta que a Ciência valoriza, cada vez mais, a preservação do ambiente, foram feitas as experiências da viabilidade celular com extratos menos perigosos e menos poluentes sendo usados extratos hidrometanólicos, mas, ao contrário do que se esperava, estes não pareceram ser eficazes para a verificação da ação inseticida nestas espécies de plantas. (*A. conyzoides*, *C. majus*, *J. regia* e *R. graveolens*). Após pesquisa bibliográfica não se verificou a existência de descrições dos referidos extratos hidrometanólicos na ação inseticida, mas sim noutras aplicações, como por exemplo na ação anti-inflamatória. Houve autores que, nos seus estudos, não conseguiram demonstrar que os extratos metanólicos e aquosos tinham ação inseticida mas verificaram que estes extratos eram os que apresentavam o maior número de compostos fitoquímicos extraídos da planta mentrasto (*A. conyzoides*) (8). No entanto houve outros que, para a mesma planta já conseguiram demonstrar atividade inseticida do extrato metanólico (96).

Para duas espécies de plantas como *A. conyzoides* e *R. graveolens* utilizou-se outros extratos como o acetato de etilo e diclorometano e estes já apresentaram ação inseticida. Sendo que estes extratos apresentam os compostos com a ação inseticida tais como as furanocumarinas e cumarinas. Sendo que o extrato de acetato de etilo apresentou uma menor taxa de viabilidade comparativamente com os outros extratos, isto pode dever-se ao facto de um dos compostos maioritários encontrado neste extrato ser o psoraleno e este apresenta uma elevada ação inseticida principalmente contra as células Sf9 mesmo estando em concentrações mais baixas (175,270). Deve-se isso ao facto das células Sf9 terem baixas quantidades das CYP450 redutase que fazem parte do sistema de detoxificação dos insetos (271). No extrato de diclorometano da espécie *R. graveolens* foi encontrada outra furanocumarina, o 8-metoxipsoraleno, que não é um dos compostos maioritários, não tendo, por isso, sido sequer considerado como um pico importante. Quando se fez a fortificação do extrato diclorometano da espécie *R. graveolens* é que se percebeu que este composto poderia ter algum papel na ação inseticida.

As furanocumarinas são encontradas principalmente nas famílias Apiaceae e Rutaceae mas também podem ser encontradas em menores quantidades nas famílias Asteraceae, Fabaceae, Pittosporaceae, Solanaceae, Thymeleaceae, Orchidaceae e Moraceae (272,273). As furanocumarinas ocorrem em duas configurações estruturais as lineares que têm o anel furano ligado às posições 6,7 do núcleo benz-2-pirona e as angulares que têm o anel furano ligado às posições 7,8 (274,275). As furanocumarinas lineares e angulares são altamente tóxicas para plantas, vertebrados, artrópodes, insetos e fungos (273). Nos insetos estas podem provocar diferentes respostas comportamentais e fisiológicas tais

como atuam como repelentes, anti-alimentares e atuam como fototoxinas através da intercalação na dupla hélice de DNA e complexação molecular, as furanocumarinas ativadas pela luz reagem com as bases da pirimidina, especialmente com a timina (273,276). Sob radiação UV, as furanocumarinas reticulam ambas as cadeias de DNA ligando-se a bases de pirimidina, inibindo assim a replicação e transcrição do DNA, mas também ficam num estado excitado altamente reativo capaz de interagir diretamente com biomoléculas (proteínas e lípidos da membrana) (270,277). Os psoralenos causam danos às células por ligação covalente ao DNA após irradiação com radiação ultravioleta A (UVA) (278). Algumas espécies de lepidópteros para fugirem ao efeito da radiação ultravioleta enrolam as folhas para que estas não estejam exposta à radiação e assim serem capazes de destoxificar as furanocumarinas através do CYP450.

Monômeros e dímeros de furanocumarinas apresentam efeito tóxico em humanos por inibição dos CYPs, sendo consideradas mutagénicas e carcinogénicas e portanto, é necessária uma extensa pesquisa antes que estes compostos possam ser considerados uma opção para o controlo de pragas de insetos (270,276).

Comparando o comportamento das células quando expostas ao inseticida comercial CPF (30,7%), aos extratos diclorometano (35,7%) e acetato de etilo (47,9%) da espécie *R. graveolens*, na concentração de 0,1 mg/mL respetivamente, podemos verificar que estas apresentam uma viabilidade muito semelhante, demonstrando-se assim que estes extratos têm potencial como inseticidas naturais, mas mantendo-se a necessidade de prosseguir nos estudos com eles.

4.3. Impacto dos extratos mais potentes na morfologia celular

Quando se expuseram as células aos extratos diclorometano e acetato de etilo da espécie *R. graveolens*, na concentração de 0,1 mg/mL, ficando a incubar por um período de 24 horas, verificou-se que houve uma diminuição da densidade celular e ainda ficou demonstrado que as células apresentaram alterações morfológicas ao nível da fragmentação da cromatina e ao nível da actina ficando esta disposta só em determinadas zonas, revelando assim que estes dois extratos da espécie *R. graveolens* apresentam ação citotóxica.

Embora não seja possível tirar conclusões, apenas com base nas micrografias, os fenómenos registados podem, eventualmente, ser compatíveis com fenómenos de morte celular programada. Em particular, a fragmentação da cromatina, aliada à manutenção de

estrutura celular geral da célula, pode estar associada a processos apoptóticos, pelo que revela ser necessário o seu estudo no futuro, para clarificar se poderá ser o caso.

A apoptose é um tipo de morte celular programada e esta pode ser induzida por diversos estímulos apoptóticos, tais como hormonas, fatores de crescimento, citocinas, calor, toxinas e xenobióticos (onde se incluem pesticidas). A apoptose tem um papel fundamental tanto nos mamíferos como nos insetos, mas nestes, tem levantado um maior interesse devido ao seu papel no desenvolvimento e no seu crescimento levando a que seja um possível mecanismo utilizado no controlo de pragas (279).

4.4. Testes gerais de fitoquímicos

4.4.1. Teste de alcaloides

Os alcaloides podem ser encontrados em forma de sais mas também como bases, isso dependendo do meio em que se encontram (134). A sua extração deve ser feita em meio ácido, para que haja conversão de todos os compostos em sais solúveis em água. Normalmente utiliza-se o metanol ou etanol juntando-se ácido clorídrico diluído ou ácido acético para fazer a extração dos alcaloides. Depois da extração feita a solução tem de ser alcalinizada com amoníaco ou hidróxido de sódio. Neste trabalho, fez-se uma extração com o metanol e água, não sendo portanto a mais indicada para este tipo de compostos (114).

Os reagentes Dragendorff, Mayer e Bertrand indicaram a presença de alcaloides nas espécies de plantas secas *C. majus* e *R. graveolens* e nos seus extratos hidrometanólicos. Nas outras duas espécies de plantas *A. conyzoides* e *J. regia*, apesar de se encontrar descrito na literatura, não foi possível detetar a presença de alcaloides através da utilização dos testes de despiste de fitoquímicos, o que pode dever-se a uma menor concentração dos mesmos e também à pouca quantidade de matéria vegetal disponível.

4.4.2. Teste de taninos

Os taninos são compostos polifenólicos que se encontram abundantemente distribuídos nas plantas. Têm vindo a ser objeto de cada vez maior interesse quer pelo seu uso no tratamento de doenças, quer pela sua utilização na produção vinícola, pois são eles que conferem aos vinhos o seu sabor característico (280,281).

Nas espécies de plantas em estudo, os taninos revelaram-se presentes apenas na casca verde da *J. regia* e no seu extrato hidrometanólico. Na *R. graveolens*, uma vez que há descrições da presença de taninos na sua composição, o não terem sido também detetados, pode dever-se ao facto da pouca quantidade de matéria vegetal utilizada para se efetuar o teste, sendo que havia pouca amostra disponível no contexto deste estudo.

4.4.3. Teste de flavonoides

Os compostos mais presentes nas plantas utilizadas, foram os flavonoides, tanto nas partes secas das mesmas como na grande maioria dos extratos hidrometanólicos, pois estes solubilizam bem em água quente e metanol o que explica que, quando se efetuou a pesquisa de fitoquímicos, estes tenham sido encontrados em todas as espécies de plantas (184).

Os flavonoides são uma classe importante de fitoquímicos generalizados (282). Encontram-se nas plantas e possuem ações benéficas para os humanos como a atividade antimicrobiana, antioxidante e inseticida contra algumas pragas de insetos (106).

A grande variedade estrutural destes compostos faz com que haja uma necessidade de estudos mais aprofundados, para melhor compreender a ligação estrutura-atividade de modo a permitir orientar a procura de compostos tóxicos para os insetos (106).

O teste para detetar a presença de flavonoides foi efetuado nas diferentes partes das plantas secas A3, A4, A5, A8, A9, A10, A11, A12 e A14, das diferentes espécies em estudo como *A. conyzoide*, *C. majus*, *J. regia* e *R. graveolens*, tendo ficado provado que as quatro espécies de plantas possuem flavonoides na sua composição.

O teste de flavonoides também foi efetuado em todos os extratos hidrometanólicos (A1, A2, A3, A4, A5, A8, A9, A10, A11, A12 e A14) mas não foram efetuados nos extratos de diclorometano e acetato de etilo devido à pouca quantidade obtida. Neste caso houve extratos hidrometanólicos que deram negativo, para algumas reações do teste, podendo querer indicar que a quantidade destes era muito baixa para que fossem detetados. A única espécie de planta que revelou possuir o tipo de flavonoides pesquisados pela reação oxalobórica foi o *C. majus*.

4.4.4. Teste de saponósidos

Existem na composição de espécies como a *C. majus*, a *J. regia* e a *R. graveolens*, como está descrito, saponinas que se caracterizam pela formação de uma espuma persistente, que, quando em contacto com a água, surgem à superfície da solução. Estas não se encontram na espécie *A. conyzoides*.

Neste estudo, quando se efetuou este teste, para a deteção de saponinas, a única espécie que revelou a presença de espuma à superfície da solução e que se espera que se mantenha por cerca de 15 minutos, foi a casca verde da noz e o seu extrato hidrometanólico. O mesmo teste aplicado à *C. majus* também apresentou o aparecimento de espuma que rapidamente se desfez, não estando presente passados os 15 minutos que era suposto podendo dever-se ao facto que os saponósidos na amostra serem vestigiais.

Com a *R. graveolens* a espuma não se formou e isso pode ter a ver com a quantidade presente quer no extrato quer na própria planta que, sendo muito pequena não permite que este teste seja suficientemente sensível para mostrar a sua presença.

4.5. Análise de HPLC

Fizeram-se análises de HPLC aos três extratos de diclorometano e acetato de etilo nas espécies de *A. conyzoides* e *R. graveolens* visto que estes foram os que apresentaram ação inseticida. Quando se obtiveram os cromatogramas das corridas percebeu-se que os extratos apresentavam cumarinas e furanocumarinas, sendo estas 8-metoxipsoraleno, psoraleno e bergapteno, que puderam ser identificadas por comparação (através do tempo de retenção e dos espectros de UV/vis) com substâncias de referência (194).

Para se fazer a identificação dos compostos utilizaram-se compostos de referência, que foram analisados nas mesmas condições das corridas cromatográficas dos extratos, onde se obtiveram os respetivos espectros de UV/vis e os seus tempos de retenção.

Para haver uma confirmação da identificação dos três compostos em causa, fizeram-se as corridas cromatográficas dos extratos de diclorometano e acetato de etilo da espécie *R. graveolens*, sendo estes fortificados com as substâncias de referência, onde se verificou um aumento do sinal desses compostos.

Na corrida cromatográfica do extrato de diclorometano da espécie *A. conyzoides* não se conseguiu fazer a corrida fortificada uma vez que não havia amostra disponível, mas

mesmo assim foi possível identificar o psoraleno e o bergapteno através dos seus TRs e dos espectros UV/vis.

No caso do cromatograma do extrato diclorometano da espécie *R. graveolens* um dos compostos (8-metoxipsoraleno) que foi identificado não é dos maioritários. No cromatograma do extrato acetato de etilo da espécie *R. graveolens* a identificação do composto psoraleno foi identificado como sendo um dos compostos maioritários.

5. Conclusão

Neste trabalho tentámos verificar se as quatro espécies de plantas (*A. conyzoides*, *C. majus*, *J. regia* e *R. graveolens*) já utilizadas na medicina tradicional e, por isso, consideradas plantas medicinais, podiam ser utilizadas também como inseticidas de origem vegetal e se as diferentes partes que as constituíam (flores, folhas, caules, raízes ou casca) atuavam de forma diversa ou produziam diferentes resultados, no que se referia à população alvo a quem se destinavam – diferentes tipos de insetos.

Para além de interessante, este trabalho parecia não ser muito complicado. No entanto depressa se verificou que não era assim, e se compreendeu a complexidade de uma investigação.

Começou-se com o tratamento a dar às plantas, até poderem ser testadas. É um processo trabalhoso, uma vez que é necessário ultrapassar diversas fases, como esperar que sequem, separar as diferentes partes, triturá-las separadamente. O próprio processo extrativo é longo e demorado e requer todo o cuidado de modo a preservar as soluções extraídas da luz solar, uma vez que os compostos se podem degradar com a mesma. A preparação do próprio extrato também é um processo moroso e trabalhoso e requer toda a atenção durante o processo no rotavapor para que não haja refluxo e não se percam compostos. Depois da evaporação que aí acontece, é necessário armazenar as amostras obtidas no congelador, a -80° C e esperar que congelem. Seguidamente é ainda necessário esperar mais uns dias para que percam a água por liofilização. Todo este trabalho implica imprevistos naturais, como soluções que têm de ser novamente preparadas por algum erro de manuseio que levam a situações não desejadas, como, por exemplo, a perda de alguns compostos fitoquímicos.

As células escolhidas para se fazer a avaliação da viabilidade celular, foram as de inseto Sf9, que demonstraram não ser uma linha celular simples de trabalhar, uma vez que são de crescimento muito lento até atingirem a sua fase exponencial de crescimento.

Fez-se uma pesquisa geral de fitoquímicos para determinadas famílias químicas como os alcaloides, os taninos, os flavonoides e os saponósidos, tendo as espécies *C. majus* e *R. graveolens* indicado a presença de alcaloides nas suas partes secas, mas perda de compostos nos extratos hidrometanólicos, uma vez que os testes deram negativos, como resultado da não utilização de extratos direcionados para esta classe de compostos. Todas as espécies de plantas nas diferentes partes secas apresentaram flavonoides e nos extratos hidrometanólicos a maioria tinha flavonoides. Nos testes de taninos e de

saponósidos só houve uma espécie a testar positiva para a presença deste tipo de compostos, a *J. regia*, tanto na parte seca da planta como no seu extrato hidrometanólico.

Chegámos, assim, à conclusão que, das quatro espécies utilizadas, apenas duas delas apresentavam ação inseticida (*A. conyzoides* e *R. graveolens*). No entanto, não se pode descartar a possibilidade das outras duas espécies de plantas poderem também apresentar ação inseticida, uma vez que devido a falta de tempo útil não se testaram as outras duas espécies com outro tipo de extrato. Também tentámos de alguma forma encontrar extratos que fossem menos poluentes e menos tóxicos e por isso se optou pelos extratos hidrometanólicos, mas verificou-se que estes muito provavelmente não seriam os mais indicados para avaliar a ação inseticida. Fez-se então a avaliação da atividade inseticida em outros extratos como o do diclorometano e acetato de etilo, tendo estes apresentado já uma ação inseticida.

Ficou demonstrado que os extratos de diclorometano e acetato de etilo da espécie *R. graveolens*, provocam alterações morfológicas nas células de inseto Sf9, indicando por isso uma ação citotóxica. As modificações morfológicas registadas foram a fragmentação da cromatina, podendo esta ser indicativa de processos apoptóticos. Efetuaram-se algumas análises para determinação da activação das caspases mas não foi possível efetuar os replicados, e assim afirmar se a apoptose é ou não um mecanismo de ação presente.

Sem esquecer que este trabalho esteve interrompido por força das medidas de emergência a que o nosso país esteve sujeito, ainda se fez a análise de HPLC-DAD nos extratos diclorometano e acetato de etilo para identificar os compostos que pudessem estar presentes e identificaram-se três compostos, o 8-metoxipsoraleno, o psoraleno e o bergapteno, através dos seus TRs e dos seus espectros UV/vis.

Para se conseguir uma quantificação dos compostos identificados seria necessário mais tempo disponível, uma vez que teriam de ser feitas outras análises de HPLC-DAD. No entanto, o detetor de massa (MS) poderia permitir a identificação de outros compostos que não se conseguiram identificar através dos espectros UV/vis.

Era fundamental e muito interessante, continuar a realizar mais estudos, sem interrupções tristemente forçadas, como aconteceu com este, para verificar se os compostos naturais utilizados como inseticidas não apresentam também toxicidade para os mamíferos e outras espécies de plantas. Estes estudos também são fundamentais para que se perceba quais são os mecanismos de ação dos compostos destas plantas. No entanto, o presente

trabalho permitiu estabelecer que as espécies em causa têm potencial inseticida, o qual pode de futuro ser detalhado e alvo de mais investigação.

6. Bibliografija

1. Edwin IE, Kester UE. Insecticidal Toxicity of Goat Weed, *Ageratum conyzoides*, Linn. (Asteraceae) against Weevil, *Dermestes maculatus*, Degeer (Coleoptera: Dermestidae) Infesting Smoked Fish. *Jordan J Biol Sci*. 2018;11(2):223–9.
2. Rioba NB, Stevenson PC. *Ageratum conyzoides* L. for the management of pests and diseases by small holder farmers. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2017;110(June):22–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.068>
3. Yoshida HA, Toscano NC. Comparative Effects of Selected Natural Insecticides on *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae. *J Econ Entomol*. 1994;87(2):305–10.
4. Grdiša M, Gršić K. Botanical Insecticides in Plant Protection. *Agric Conspec Sci* [Internet]. 2013;78(2):85–93. Available from: https://hrcak.srce.hr/index.php?id_clanak_jezik=153806&show=clanak
5. Isman MB, Grieneisen ML. Botanical insecticide research: Many publications, limited useful data. *Trends Plant Sci* [Internet]. 2013;XX:1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2013.11.005>
6. Alexenizer M, Dorn A. Screening of medicinal and ornamental plants for insecticidal and growth regulating activity. *J Pest Sci* (2004). 2007;80(4):205–15.
7. Isman MB, Koul O, Luczynski A, Kaminski J. Insecticidal and Antifeedant Bioactivities of Neem Oils and Their Relationship to Azadirachtin Content. *J Agric Food Chem*. 1990;38:1406–11.
8. Prajapati V, Tripathi AK, Khanuja SPS, Kumar S. Anti-insect Screening of Medicinal Plants from Kukrail Forest, Lucknow, India. *Pharm Biol*. 2003;41(3):166–70.
9. Harborne JB. *Introduction to Ecological Biochemistry*. Fourth. London: Academic Press; 1993.
10. Wink M. Interference of Alkaloids With Neuroreceptors and Ion Channels. *Stud Nat Prod Chem*. 2000;21:3–117.
11. Klaassen CD. Casarett and Doull's TOXICOLOGY The Basic Science of Poisons. Eighth Edi. New York: McGraw-Hill Education, LLC; 2013. 1–1413 p.
12. Boulogne I, Petit P, Ozier-Lafontaine H, Desfontaines L, Loranger-Merciris G. Insecticidal and antifungal chemicals produced by plants: a review. *Environ Chem Lett*. 2012;10:325–47.
13. Rattan RS. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Prot* [Internet]. 2010;29:913–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2010.05.008>
14. Grundy DL, Still CC. Inhibition of acetylcholinesterases by pulegone1, 2-epoxide. *Pestic Biochem Physiol*. 1985;23:383–8.
15. Ryan MF, Byrne O. Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. *J Chem Ecol*. 1988;14(10):1965–75.
16. Miyazawa M, Watanabe H, Kameoka H. Inhibition of Acetylcholinesterase Activity by Monoterpenoids with a p-Menthane Skeleton. *J Agric Food Chem*. 1997;45(3):677–9.

17. Keane S, Ryan MF. Purification, characterisation, and inhibition by monoterpenes of acetylcholinesterase from the waxmoth, *Galleria mellonella* (L.). *Insect Biochem Mol Biol*. 1999;29(12):1097–104.
18. Felipe CFB, Fonsêca KS, Barbosa AL dos R, Bezerra JNS, Neto MA, Fonteles MM de F, et al. Alterations in behavior and memory induced by the essential oil of *Zingiber officinale* Roscoe (ginger) in mice are cholinergic-dependent. *J Med Plants Res*. 2008;2(7):163–70.
19. Richards AG, Cutkomp LA. Cholinesterase of insect nerves. *J Cell Comp Physiol*. 1945;26:57–61.
20. Kukel CF, Jennings KR. Delphinium alkaloids as inhibitors of alpha-bungarotoxin binding to rat and insect neural membranes. *Can J Physiol Pharmacol*. 1994;72:104–7.
21. Priestley CM, Williamson EM, Wafford KA, Sattelle DB. Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABA A receptors and a homo-oligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*. *Br J Pharmacol*. 2003;140(8):1363–72.
22. Ratra GS, Casida JE. GABA receptor subunit composition relative to insecticide potency and selectivity. *Toxicol Lett*. 2001;122:215–22.
23. Bloomquist JR, Boina DR, Chow E, Carlier PR, Reina M, Gonzalez-Coloma A. Mode of action of the plant-derived silphinenes on insect and mammalian GABAA receptor/chloride channel complex. *Pestic Biochem Physiol*. 2008;91:17–23.
24. Casida, J.E. *Pyrethrum, the Natural Insecticide*. Press A, editor. New York; 1973.
25. Yamamoto C, Kurokawa M. Synaptic Potentials Recorded in Brain Slices and Their Modification by Changes in the Level of Tissue ATP. *Exp Brain Res*. 1970;10(2):159–70.
26. Ware GW. *The Pesticide Book*. Publication T, editor. USA; 1988.
27. Khambay BPS, Batty D, Jewess PJ, Bateman GL, Hollomon DW. Mode of action and pesticidal activity of the natural product dunnione and of some analogues. *Pest Manag Sci*. 2003;59:174–82.
28. Storey K, Baust J, Buescher P. Determination of Water “Bound” by Soluble Subcellular Components during Low-Temperature Acclimation in the Gall Fly Larva, *Eurosta solidagensis*. *Cryobiology*. 1981;18:315–21.
29. Copping LG, Menn JJ. Biopesticides: A review of their action, applications and efficacy. *Pest Manag Sci*. 2000;56(8):651–76.
30. Bloomquist JR. ION CHANNELS AS TARGETS FOR INSECTICIDES. *Annu Rev Entomol*. 1996;41:163–90.
31. Enan EE. Molecular and Pharmacological Analysis of an Octopamine Receptor From American Cockroach and Fruit fly in Response to Plant Essential Oils. *Arch Insect Biochem Physiol*. 2005;59:161–71.
32. Nathanson JA, Hunnicutt EJ, Kantham L, Scavone C. Cocaine as a naturally occurring insecticide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(20):9645–8.
33. Kostyukovsky M, Rafaeli A, Gileadi C, Demchenko N, Shaaya E. Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: Possible mode of action against insect pests. *Pest Manag Sci*. 2002;58(11):1101–

- 6.
34. Enan EE. Molecular response of *Drosophila melanogaster* tyramine receptor cascade to plant essential oils. *Insect Biochem Mol Biol.* 2005;35(4):309–21.
35. Boulahbel B, Aribi N, Kilani-Morakchi S, Soltani N. Insecticidal Activity of Azadirachtin on *Drosophila melanogaster* and Recovery of Normal Status by Exogenous 20-Hydroxyecdysone . *African Entomol.* 2015;23(1):224–33.
36. Mordue(Luntz) AJ, Nisbet AJ. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. *An da Soc Entomológica do Bras.* 2000;29(4):615–32.
37. Gerwick BC, Sparks TC. Natural products for pest control: An analysis of their role, value and future. *Pest Manag Sci.* 2014;70(8):1169–85.
38. Karačonji IB. Facts About Nicotine Toxicity. *Arch Ind Hyg Toxicol* [Internet]. 2005;56(4):363–71. Available from: https://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak&id_clanak_jezik=210&lang=en
39. Siegwart M, Graillot B, Blachere Lopez C, Besse S, Bardin M, Nicot PC, et al. Resistance to bio-insecticides or how to enhance their sustainability: a review. *Front Plant Sci.* 2015;6(June):1–19.
40. Eldefrawi ME, Eldefrawi AT. Comparative Molecular and Pharmacological Properties of Cholinergic Receptors in Insects and Mammals. In 2009.
41. Hodgson E. A TEXTBOOK OF MODERN TOXICOLOGY. THIRD EDIT. New Jersey: A JOHN WILEY & SONS, INC.; 2004. 1–543 p.
42. Isman MB. Botanical Insecticides, Deterrents, and Repellents in Modern Agriculture and an Increasingly Regulated World. *Annu Rev Entomol* [Internet]. 2006;51(1):45–66. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.ento.51.110104.151146>
43. Dayan FE, Cantrell CL, Duke SO. Natural products in crop protection. *Bioorganic Med Chem* [Internet]. 2009;17(12):4022–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2009.01.046>
44. Mann RS, Kaufman PE. Natural Product Pesticides: Their Development, Delivery and Use Against Insect Vectors. *Mini Rev Org Chem.* 2012;9(2):185–202.
45. Ujváry I. Nicotine and Other Insecticidal Alkaloids. In: Yamamoto I, Casida JE, editors. *Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor.* 1999. p. 29–69.
46. Ikawa M, Dicke RJ, Allen TC, Link KP. THE PRINCIPAL ALKALOIDS OF SABADILLA SEED AND THEIR TOXICITY TO *MUSCA DOMESTICA* L. *J Biol Chem.* 1945;159:517–24.
47. Sarwar M. The Killer Chemicals for Control of Agriculture Insect Pests : The Botanical Insecticides. *Int J Chem Biomol Sci.* 2015;1(3):123–8.
48. Velasques J, Cardoso MH, Abrantes G, Frihling BE, Franco OL, Migliolo L. The rescue of botanical insecticides: A bioinspiration for new niches and needs. *Pestic Biochem Physiol* [Internet]. 2017;143(September):14–25. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.10.003>
49. Sabra FS, Mehana E-SE-D. Pesticides Toxicity in Fish with Particular Reference to Insecticides. *Asian J Agric Food Sci* [Internet]. 2015;3:2321–1571. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/272575872>

50. Hollingworth RM, Ahammadsahib KI, Gadelhak G, McLaughlin JL. New inhibitors of Complex I of the mitochondrial electron transport chain with activity as pesticides. *Biochem Soc Trans.* 1994;22(1):230–3.
51. Cavoski I, Caboni P, Miano T. Natural Pesticides and Future Perspectives. In: *Pesticides in the Modern World - Pesticides Use and Management*. 2011. p. 169–90.
52. Krieger RI. *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*. Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology. 2010.
53. Heikkila RE, Nicklas WJ, Vyas I, Duvoisin RC. Dopaminergic toxicity of rotenone and the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion after their stereotaxic administration to rats: Implication for the mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity. *Neurosci Lett.* 1985;
54. Hatcher JM, Pennell KD, Miller GW. Parkinson's disease and pesticides: a toxicological perspective. *Trends Pharmacol Sci.* 2008;29(6):322–9.
55. Sherer TB, Kim JH, Betarbet R, Greenamyre JT. Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and α -synuclein aggregation. *Exp Neurol.* 2003;
56. Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov A V., Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci.* 2000;3(12):1301–6.
57. Tanner CM, Kame F, Ross GW, Hoppin JA, Goldman SM, Korell M, et al. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ Health Perspect.* 2011;119(6):866–72.
58. Yang Y, Gao J, Zhang Y, Xu W, Hao Y, Xu Z. Natural pyrethrins induce autophagy of HepG2 cells through the activation of AMPK / mTOR pathway *. *Environ Pollut* [Internet]. 2018;241:1091–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.06.049>
59. Adenubi OT, Ahmed AS, Fasina FO, McGaw LJ, Eloff JN, Naidoo V. Pesticidal plants as a possible alternative to synthetic acaricides in tick control: A systematic review and meta-analysis. *Ind Crops Prod.* 2018;123(May):779–806.
60. Devitt-lee AA, Smith DR, Chen D, Mckernan K. Endogenous synthesis of pyrethrins by cannabis. *bioRxiv.* 2017;
61. Mossa A-TH, Mohafrash SMM, Chandrasekaran N. Safety of Natural Insecticides: Toxic Effects on Experimental Animals. *Biomed Res Int.* 2018;2018:1–17.
62. Xu Z, Lu M, Yang M, Xu W, Gao J, Zhang Y, et al. Pyrethrum-extract induced autophagy in insect cells : A new target ? *Pestic Biochem Physiol* [Internet]. 2017;137:21–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.09.003>
63. Maciel M V., Morais SM, Bevilaqua CML, Amóra SSA. Extratos vegetais usados no controle de dípteros vetores de zoonoses. *Rev Bras Plantas Med.* 2010;12(1):105–12.
64. Pavela R. History, presence and perspective of using plant extracts as commercial botanical insecticides and farm products for protection against insects - A review. *Plant Prot Sci.* 2016;52(4):229–41.
65. Evans PD. Studies on the mode of action of octopamine, 5-hydroxytryptamine and proctolin on a myogenic rhythm in the locust. *J Exp Biol* [Internet]. 1984;110:231–

51. Available from:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6205115
66. Sonderlund DM. Mode of action of pyrethrins and pyrethroids. In: Casida J, Quistad G, editors. *Pyrethrum flowers: Production, Chemistry, Toxicology, and Uses*. 1995. p. 217–33.
 67. Duangkaew P, Kaewpa D, Rongnoparut P. Protective efficacy of *Anopheles minimus* CYP6P7 and CYP6AA3 against cytotoxicity of pyrethroid insecticides in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) insect cells. *Trop Biomed*. 2011;28(2):293–301.
 68. Isman MB, Akhtar Y. Plant Natural Products as a Source for Developing Environmentally Acceptable Insecticides. In: *Insecticides Design Using Advanced Technologies*. 2007. p. 239–48.
 69. Khater HF. Botanicals review 2012 *Pharmacologia.pdf*. *Pharmacologia*. 2012;3(12):641–56.
 70. Huang J, Lv C, Hu M, Zhong G. The Mitochondria-Mediate Apoptosis of Lepidopteran Cells Induced by Azadirachtin. *PLoS One*. 2013;8(3):1–15.
 71. Shao X, Lai D, Zhang L, Xu H. Induction of Autophagy and Apoptosis via PI3K/AKT/TOR Pathways by Azadirachtin A in *Spodoptera litura* Cells. *Sci Rep*. 2016;6(September):1–12.
 72. Shu B, Zhang J, Sethuraman V, Cui G, Yi X, Zhong G. Transcriptome analysis of *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells reveals putative apoptosis-related genes and a preliminary apoptosis mechanism induced by azadirachtin. *Sci Rep [Internet]*. 2017;7(1):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-12713-9>
 73. Shu B, Jia J, Zhang J, Sethuraman V, Yi X, Zhong G. DnaJ homolog subfamily A member1 (DnaJ1) is a newly discovered anti-apoptotic protein regulated by azadirachtin in Sf9 cells. *BMC Genomics*. 2018;19(1):1–11.
 74. Shu B, Wang W, Hu Q, Huang J, Hu M, Zhong G. A comprehensive study on apoptosis induction by azadirachtin in *Spodoptera frugiperda* cultured cell line Sf9. *Arch Insect Biochem Physiol*. 2015;89(3):153–68.
 75. Salehzadeh A, Akhkha A, Cushley W, Adams RLP, Kusel JR, Strang RHC. The antimetabolic effect of the neem terpenoid azadirachtin on cultured insect cells. *Insect Biochem Mol Biol*. 2003;
 76. Rembold H, Subrahmanyam B, Müller T. Corpus cardiacum-a target for Aza. *Experientia*. 1989;45:361–3.
 77. Rembold H, Annadurai RS. Azadirachtin Inhibits Proliferation of SF9 Cells in Monolayer Culture. *Zeitschrift fur Naturforsch - Sect C J Biosci*. 1993;48(5–6):495–9.
 78. Mosesso P, Bohm L, Pepe G, Fiore M, Carpinelli A, Gäde G, et al. Cytogenetic analyses of Azadirachtin reveal absence of genotoxicity but marked antiproliferative effects in human lymphocytes and CHO cells in vitro. *Toxicol Lett [Internet]*. 2012;213(3):361–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.07.021>
 79. Mossa ATH. Green Pesticides: Essential oils as biopesticides in insect-pest management. *J Environ Sci Technol*. 2016;9(5):354–78.
 80. Dubey NK, Srivastava B, Kumar A. Current Status of Plant Products as Botanical Pesticides in storage pest management. *Biopesticides*. 2008;1(2):182–6.

81. Tripathi AK, Upadhyay S, Bhuiyan M, Bhattacharya PR. A review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management. *J Pharmacogn Phyther* [Internet]. 2009;1(5):052–63. Available from: <http://www.academicjournals.org/journal/JPP/article-abstract/370D4E01129>
82. Re L, Barocci S, Sonnino S, Mencarelli A, Vivani C, Paolucci G, et al. Linalool modifies the ovicidal activity of the essential oil of *Anethum sowa* Kurz against *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera:Bruchidae). *Insect Sci Appl*. 2000;21:61–6.
83. Jankowska M, Rogalska J, Wyszowska J, Stankiewicz M. Molecular targets for components of essential oils in the insect nervous system—a review. *Molecules*. 2018;23(1):1–20.
84. Koul O, Walia S, Dhaliwal G. Essential oils as green pesticides: Potential and constraints. *Biopestic Int*. 2008;4(1):63–84.
85. Nathanson JA. Phenyliminoimidazolidines. Characterization of a class of potent agonists of octopamine-sensitive adenylate cyclase and their use in understanding the pharmacology of octopamine receptors. *Mol Pharmacol*. 1985;
86. Cornelius ML, Grace JK, Yates JR. Toxicity of Monoterpenoids and Other Natural Products to the Formosan Subterranean Termite (Isoptera: Rhinotermitidae). *J Econ Entomol*. 1997;90(2):320–5.
87. Giraudo M, Hilliou F, Fricaux T, Audant P, Feyereisen R, Le Goff G. Cytochrome P450s from the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*): Responses to plant allelochemicals and pesticides. *Insect Mol Biol*. 2015;24(1):115–28.
88. Okunade AL. *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae). *Fitoterapia*. 2002;73(1):1–16.
89. Kong C, Hu F, Xu X, Liang W, Zhang C. Allelopathic plants: *Ageratum conyzoides* L. *Allelopath J*. 2004;14(1):1–12.
90. Moreira MD, Picanço MC, Barbosa LC de A, Guedes RNC, da Silva ÉM. Toxicity of leaf extracts of *ageratum conyzoides* to lepidoptera pests of horticultural crops. *Biol Agric Hortic*. 2004;22(3):251–60.
91. Sundufu AJ, Shoushan H. Chemical composition of the essential oils of *Ageratum conyzoides* L. occurring in South China. *Flavour Fragr J*. 2004;19(1):6–8.
92. Nogueira JHC, González E, Galletti SR, Facanali R, Marques MOM, Felício JD. *Ageratum conyzoides* essential oil as aflatoxin suppressor of *Aspergillus flavus*. *Int J Food Microbiol*. 2010;137(1):55–60.
93. Adebayo AH, Zeng GZ, Fan JT, Ji CJ, He WJ, Xu JJ, et al. Biochemical, haematological and histopathological studies of extract of *ageratum conyzoides* L. in Sprague Dawley rats. *J Med Plants Res*. 2010;4(21):2264–72.
94. Diallo A, Ekl-Gadegbeku K, Amegbor K, Agbonon A, Aklikokou K, Creppy E, et al. In vivo and in vitro toxicological evaluation of the hydroalcoholic leaf extract of *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae). *J Ethnopharmacol*. 2014;155(2):1214–8.
95. Kumar KGA, Tayade AB, Kumar R, Gupta S, Sharma AK, Nagar G, et al. Chemo-profiling and bioassay of phytoextracts from *Ageratum conyzoides* for acaricidal properties against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) infesting cattle and buffaloes in India. *Ticks Tick Borne Dis* [Internet]. 2016;7(2):342–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.12.005>
96. Muema JM, Njeru SN, Colombier C, Marubu RM. Methanolic extract of *Ageratum*

- conyzoides exhibited toxicity and growth disruption activities against *Anopheles gambiae* sensu stricto and *Anopheles arabiensis* larvae. BMC Complement Altern Med. 2016;16(1):1–9.
97. Ragesh PR, Bhutia TN, Ganta S, Singh AK. Repellent, antifeedant and toxic effects of *Ageratum conyzoides* (Linnaeus) (Asteraceae) extract against *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). Arch Phytopathol Plant Prot [Internet]. 2016;49(1–4):19–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/03235408.2016.1147123>
 98. Faqueti LG, Briudeus V, Halabalaki M, Skaltsounis AL, Nascimento LF, Barros WM, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of standardized extract of polymethoxyflavones from *Ageratum conyzoides*. J Ethnopharmacol. 2016;194:369–77.
 99. Kouame BKFP, Toure D, Kablan ALC, Bedi SG, Tea I, Robins RJ, et al. Chemical constituents and antibacterial activity of essential oils from flowers and stems of *Ageratum conyzoides* from ivory coast. Rec Nat Prod. 2018;12(2):160–8.
 100. Galati EM, Miceli N, Taviano MF, Sanogo R, Raneri E. Anti-inflammatory and antioxidant activity of *Ageratum conyzoides*. Pharm Biol. 2001;39(5):336–9.
 101. Shirwaikar A, Bhilegaonkar PM, Malini S, Sharath Kumar J. The gastroprotective activity of the ethanol extract of *Ageratum conyzoides*. J Ethnopharmacol. 2003;86(1):117–21.
 102. Singh SB, Devi WR, Marina A, Devi WI, Swapana N, Singh CB. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Ageratum conyzoides* Linn (Asteraceae). J Med Plants Res. 2013;7(8):371–85.
 103. Shailajan S, Wadke P, Joshi H, Tiwari B. Evaluation of quality and efficacy of an ethnomedicinal plant *Ageratum conyzoides* L. in the management of pediculosis. J Young Pharm [Internet]. 2013;5(4):139–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jyp.2013.10.005>
 104. Rahman MA, Akter N, Rashid H, Ahmed NU, Uddin N, Islam MS. Analgesic and anti-inflammatory effect of whole *Ageratum conyzoides* and *Emilia sonchifolia* alcoholic extracts in animal models. African J Pharm Pharmacol. 2012;6(20):1469–70.
 105. Faqueti LG, Sandjo LP, Biavatti MW. Simultaneous identification and quantification of polymethoxyflavones, coumarin and phenolic acids in *Ageratum conyzoides* by UPLC-ESI-QToF-MS and UPLC-PDA. J Pharm Biomed Anal [Internet]. 2017;145:621–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.034>
 106. Moreira MD, Picanço MC, Barbosa LCA, Guedes RNC, Barros EC, Campos MR. Compounds from *Ageratum conyzoides*: isolation, structural elucidation and insecticidal activity. Pest Manag Sci. 2007;63:615–21.
 107. Palmer PA, Bryson JA, Clewell AE, Endres JR, Hirka G, Vértési A, et al. A comprehensive toxicological safety assessment of an extract of *Ageratum conyzoides*. Regul Toxicol Pharmacol [Internet]. 2019;103:140–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2019.01.027>
 108. Moura ACA, Silva ELF, Fraga MCA, Wanderley AG, Afiatpour P, Maia MBS. Antiinflammatory and chronic toxicity study of the leaves of *Ageratum conyzoides* L. in rats. Phytomedicine. 2005;12(1–2):138–42.
 109. Sárközi Á, Janicsák G, Kursinszki L, Kéry Á. Alkaloid composition of *Chelidonium*

- majus L. studied by different chromatographic techniques. *Chromatographia*. 2006;63(SUPPL. 13):81–6.
110. Gilca M, Gaman L, Panait E, Stoian I, Atanasiu V. Chelidonium majus - An integrative review: Traditional knowledge versus modern findings. *Forsch Komplementarmed*. 2010;17(5):241–8.
 111. Park JE, Cuong TD, Hung TM, Lee I, Na M, Kim JC, et al. Alkaloids from Chelidonium majus and their inhibitory effects on LPS-induced NO production in RAW264.7 cells. *Bioorganic Med Chem Lett* [Internet]. 2011;21(23):6960–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.09.128>
 112. Deljanin M, Nikolic M, Baskic D, Todorovic D, Djurdjevic P, Zaric M, et al. Chelidonium majus crude extract inhibits migration and induces cell cycle arrest and apoptosis in tumor cell lines. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2016;190:362–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.06.056>
 113. Zou CS, Lv CH, Wang YJ, Cao CW, Zhang GC. Larvicidal activity and insecticidal mechanism of Chelidonium majus on *Lymantria dispar*. *Pestic Biochem Physiol* [Internet]. 2017;142:123–32. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.04.009>
 114. Zielinska S, Jezierska-Domaradzka A, Wójciak-Kosior M, Sowa I, Junka A, Matkowski AM. Greater celandine's ups and downs-21 centuries of medicinal uses of Chelidonium majus from the viewpoint of today's pharmacology. *Front Pharmacol*. 2018;9(APR).
 115. Turek C, Briemle D, Mörbt N, Müller MB, Vögele P, Stintzing FC. Preclinical safety assessment of aqueous Chelidonium majus L. extracts from different plant parts. *Toxicol Lett* [Internet]. 2015;238(2):S352. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.08.1005>
 116. Warowicka A, Łukasz P, Grażyna B, Oskar M, Jagoda LC, Dorota K, et al. Protoberberine compounds extracted from Chelidonium majus L. as novel natural photosensitizers for cancer therapy. *Phytomedicine* [Internet]. 2019;64(August 2018):152919. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.152919>
 117. Pourmazaheri H, Soorni A, Kohnrouz BB, Dehaghi NK, Kalantar E, Omid M, et al. Comparative analysis of the root and leaf transcriptomes in Chelidonium majus L. *PLoS One*. 2019;14(4).
 118. Kim DH, Lee JH, Park S, Oh S seok, Kim S, Kim DW, et al. 6-Acetonyl-5,6-dihydrosanguinarine (ADS) from Chelidonium majus L. triggers proinflammatory cytokine production via ROS-JNK/ERK-NFκB signaling pathway. *Food Chem Toxicol*. 2013;58:273–9.
 119. Zou CS, Wang YJ, Zou H, Ding N, Geng NN, Cao CW, et al. Sanguinarine in Chelidonium majus induced antifeeding and larval lethality by suppressing food intake and digestive enzymes in *Lymantria dispar*. *Pestic Biochem Physiol* [Internet]. 2019;153(April 2018):9–16. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.10.003>
 120. Liu Y, Peng Y, Zhang Z, Guo X, Ji M, Zheng J. In vitro and in vivo studies of the metabolic activation of chelidonine. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2019;308(March 2018):155–63. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.05.012>
 121. Tomè F, Colombo ML. Distribution of alkaloids in Chelidonium majus and factors affecting their accumulation. *Phytochemistry*. 1995;40(1):37–9.

122. Gerenčer M, Turecek PL, Kistner O, Mitterer A, Savidis-Dacho H, Barrett NP. In vitro and in vivo anti-retroviral activity of the substance purified from the aqueous extract of *Chelidonium majus* L. *Antiviral Res.* 2006;72(2):153–6.
123. Li P, Hu J-W, Wen C-W, Hang Y, Zhou Z-H, Xie M, et al. Sanguinarine caused larval lethality and growth inhibition by suppressing energy metabolism in silkworms, *Bombyx mori*. *Pestic Biochem Physiol.* 2019;160:154–62.
124. Zielinska S, Wójciak-Kosior M, Płachno BJ, Sowa I, Włodarczyk M, Matkowski A. Quaternary alkaloids in *Chelidonium majus* in vitro cultures. *Ind Crops Prod.* 2018;123(June):17–24.
125. Habermehl D, Kammerer B, Handrick R, Eldh T, Gruber C, Cordes N, et al. Proapoptotic activity of Ukrain is based on *Chelidonium majus* L. alkaloids and mediated via a mitochondrial death pathway. *BMC Cancer.* 2006;6:1–22.
126. Zielińska S, Wójciak-Kosior M, Dziągwa-Becker M, Gleńsk M, Sowa I, Fijałkowski K, et al. The Activity of Isoquinoline Alkaloids and Extracts from *Chelidonium majus* against Pathogenic Bacteria and *Candida* sp. *Toxins (Basel).* 2019;11(7):1–13.
127. Gañán NA, Dias AMA, Bombaldi F, Zygodlo JA, Brignole EA, De Sousa HC, et al. Alkaloids from *Chelidonium majus* L.: Fractionated supercritical CO₂ extraction with co-solvents. *Sep Purif Technol.* 2016;165:199–207.
128. Capistrano IR, Wouters A, Lardon F, Gravekamp C, Apers S, Pieters L. In vitro and in vivo investigations on the antitumour activity of *Chelidonium majus*. *Phytomedicine [Internet].* 2015;22:1279–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2015.10.013>
129. Biswas SJ. CHELIDONIUM MAJUS L. - A REVIEW ON PHARMACOLOGICAL ACTIVITIES AND CLINICAL EFFECTS. *Glob J Res Med Plants Indig Med.* 2013;2(4):238–45.
130. Maji AK, Banerji P. *Chelidonium majus* L. (Greater celandine) – A Review on its Phytochemical and Therapeutic Perspectives. *Int J Herb Med.* 2015;3(1):10–27.
131. Och A, Zalewski D, Komsta Ł, Kołodziej P, Kocki J, Bogucka-Kocka A. Cytotoxic and Proapoptotic Activity of Sanguinarine, Berberine, and Extracts of *Chelidonium majus* L. and *Berberis thunbergii* DC. toward Hematopoietic Cancer Cell Lines. *Toxins (Basel).* 2019;11(9):485.
132. Colombo ML, Bosisio E. Pharmacological activities of *Chelidonium majus* L. (papaveraceae). *Pharmacol Res.* 1996;33(2):127–34.
133. Zuo GY, Meng FY, Hao XY, Zhang YL, Wang GC, Xu GL. Antibacterial alkaloids from *Chelidonium majus* Linn (Papaveraceae) against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Pharm Pharm Sci.* 2008;11(4):90–4.
134. Staniak M, Wójciak-Kosior M, Sowa I, Strzemiński M, Sawicki J, Dresler S, et al. Applicability of a Monolithic Column for Separation of Isoquinoline Alkaloids from *Chelidonium majus* Extract. *Molecules.* 2019;24(19).
135. Wójciak-Kosior M, Sowa I, Dresler S, Kováčik J, Staniak M, Sawicki J, et al. Polyaniline based material as a new SPE sorbent for pre-treatment of *Chelidonium majus* extracts before chromatographic analysis of alkaloids. *Talanta [Internet].* 2019;194(October 2018):32–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.10.009>
136. Gao L, Schmitz HJ, Merz KH, Schrenk D. Characterization of the cytotoxicity of selected *Chelidonium* alkaloids in rat hepatocytes. *Toxicol Lett [Internet].*

- 2019;311(April):91–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.04.031>
137. Kulp M, Bragina O, Kogerman P, Kaljurand M. Capillary electrophoresis with led-induced native fluorescence detection for determination of isoquinoline alkaloids and their cytotoxicity in extracts of *Chelidonium majus* L. *J Chromatogr A* [Internet]. 2011;1218(31):5298–304. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.016>
 138. Orland A, Knapp K, König GM, Ulrich-Merzenich G, Knöß W. Combining metabolomic analysis and microarray gene expression analysis in the characterization of the medicinal plant *Chelidonium majus* L. *Phytomedicine* [Internet]. 2014;21(12):1587–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2014.07.012>
 139. Meng F, Zuo G, Hao X, Wang G, Xiao H, Zhang J, et al. Antifungal activity of the benzo[c]phenanthridine alkaloids from *Chelidonium majus* Linn against resistant clinical yeast isolates. *J Ethnopharmacol*. 2009;125(3):494–6.
 140. Rather MA, Dar BA, Dar MY, Wani BA, Shah WA, Bhat BA, et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oil of *Juglans regia* L. and its constituents. *Phytomedicine* [Internet]. 2012;19(13):1185–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2012.07.018>
 141. Cosmulescu S, Trandafir I, Achim G, Baciuc A. Juglone content in leaf and green husk of five walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. *Not Bot Horti Agrobot Cluj-Napoca*. 2011;39(1):237–40.
 142. Gupta A, Behl T, Panichayupakaranan P. A review of phytochemistry and pharmacology profile of *Juglans regia*. *Obes Med* [Internet]. 2019;16(August):100142. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.obmed.2019.100142>
 143. Liu J, Meng M, Li C, Huang X, Di D. Simultaneous determination of three diarylheptanoids and an α -tetralone derivative in the green walnut husks (*Juglans regia* L.) by high-performance liquid chromatography with photodiode array detector. *J Chromatogr A*. 2008;1190(1–2):80–5.
 144. Pycia K, Kapusta I, Jaworska G. Impact of the Degree of Maturity of Walnuts (*Juglans regia* L.) and Their Variety on the Antioxidant Potential and the Content of Tocopherols and Polyphenols. *Molecules*. 2019;24(16).
 145. Jahanban-Esfahlan A, Ostadrahimi A, Tabibiazar M, Amarowicz R. A comparative review on the extraction, antioxidant content and antioxidant potential of different parts of walnut (*Juglans regia* L.) fruit and tree. *Molecules*. 2019;24(11).
 146. Verma RS, Padalia RC, Chauhan A, Thul ST. Phytochemical analysis of the leaf volatile oil of walnut tree (*Juglans regia* L.) from western Himalaya. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2013;42(1):195–201. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.05.032>
 147. Seabra IJ, Braga MEM, Oliveira RA, De Sousa HC. Two-step high pressure solvent extraction of walnut (*Juglans regia* L.) husks: ScCO₂ + CO₂/ethanol/H₂O. *J CO₂ Util* [Internet]. 2019;34(April):375–85. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2019.07.028>
 148. Salejda AM, Janiewicz U, Korzeniowska M, Kolniak-Ostek J, Krasnowska G. Effect of walnut green husk addition on some quality properties of cooked sausages. *LWT - Food Sci Technol* [Internet]. 2016;65:751–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.069>

149. Soto-Maldonado C, Vergara-Castro M, Jara-Quezada J, Caballero-Valdés E, Müller-Pavez A, Zúñiga-Hansen ME, et al. Polyphenolic extracts of walnut (*Juglans regia*) green husk containing juglone inhibit the growth of HL-60 cells and induce apoptosis. *Electron J Biotechnol*. 2019;39:1–7.
150. Oliveira I, Sousa A, Ferreira ICFR, Bento A, Estevinho L, Pereira JA. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. *Food Chem Toxicol*. 2008;46(7):2326–31.
151. Schwindl S, Kraus B, Heilmann J. Phytochemical study of *Juglans regia* L. leaves. *Phytochemistry*. 2017;144:58–70.
152. Du H, Li C, Wen Y, Tu Y, Zhong Y, Yuan Z, et al. Secondary metabolites from pericarp of *Juglans regia*. *Biochem Syst Ecol* [Internet]. 2014;54:88–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2013.12.023>
153. Yang H, Ma Y, Gao C, Wang B, ARuhan, Lin C, et al. Five novel diarylheptanoids from green walnut husks (*Juglans regia* L.). *Fitoterapia* [Internet]. 2019;134(January):221–5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.03.002>
154. Jin YX, Ma XL, Wei HY, Guo XF, Ma GX, Shi LL, et al. Two new diarylheptanoids from the green husks of *Juglans regia* L. and their cytotoxic activities. *Phytochem Lett* [Internet]. 2019;32(May):101–4. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2019.05.007>
155. Wang YN, Shi GL, Ren JJ, Zhao L, Du J, Liu YB, et al. Structure identification of an acaricidal active ingredient from green walnuts husks (*Juglans regia*). *3rd Int Conf Bioinforma Biomed Eng iCBBE 2009*. 2009;1–4.
156. Jahanban-Esfahlan, Ostadrahimi, Tabibiazar, Amarowicz. A Comprehensive Review on the Chemical Constituents and Functional Uses of Walnut (*Juglans* spp.) Husk. *Int J Mol Sci*. 2019;20(16):3920.
157. Seak CJ, Lin CC. Ruta Graveolens intoxication. *Clin Toxicol*. 2007;45(2):173–5.
158. Forsatkar MN, Nematollahi MA, Brown C. The toxicological effect of Ruta graveolens extract in Siamese fighting fish: a behavioral and histopathological approach. *Ecotoxicology*. 2016;25(4):824–34.
159. Ratheesh M, Helen A. Oral administration of alkaloid fraction from Ruta graveolens inhibits oxidative stress and inflammation in hypercholesterolemic rabbits. *Pharm Biol*. 2013;51(12):1552–8.
160. Ghabbari M, Guarino S, Caleca V, Saiano F, Sinacori M, Baser N, et al. Behavior-modifying and insecticidal effects of plant extracts on adults of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera Tephritidae). *J Pest Sci* (2004) [Internet]. 2018;91(2):907–17. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10340-018-0952-6>
161. Khater KS. Insecticidal and biochemical effects of petroleum ether extracts of ruta graveolens and raphanus sativus seeds against culex pipiens larvae (Diptera: Culicidae). *Egypt J Biol Pest Control*. 2015;25(1):83–7.
162. Mancuso G, Borgonovo G, Scaglioni L, Bassoli A. Phytochemicals from Ruta graveolens activate TAS2R bitter taste receptors and TRP channels involved in gustation and nociception. *Molecules*. 2015;20(10):18907–22.
163. Milesi S, Massot B, Gontier E, Bourgaud F, Guckert A. Ruta graveolens L.: A promising species for the production of furanocoumarins. *Plant Sci*. 2001;161(1):189–99.

164. Orlita A, Sidwa-Gorycka M, Paszkiewicz M, Malinski E, Kumirska J, Siedlecka EM, et al. Application of chitin and chitosan as elicitors of coumarins and furoquinolone alkaloids in *Ruta graveolens* L. (common rue). *Biotechnol Appl Biochem*. 2008;51(2):91.
165. Bejaoui I, Karmous T. Tunisian *ruta graveolens* essential oil: Influence of factors on its yield and composition. *J Essent Oil-Bearing Plants*. 2012;15(2):276–82.
166. Bohidar S, Pattanaik S, Thiruvananthapuram M. Improved furanocoumarin production in *Ruta graveolens* L. regenerated via in vitro stem internode cultures. *Plant Biotechnol Rep*. 2013;7(3):399–405.
167. Asgarpanah J, Khoshkam R. Phytochemistry and pharmacological properties of *Ruta graveolens* L. *J Med Plants Res*. 2012;6(23):3942–9.
168. Forouhar K, Pakravan DA, Khan R. Phytochemistry and pharmacological characteristics of *Ruta graveolens* L. *J Pharmacogn Phytochem*. 2014;1(3):024–30.
169. Al-Snafi AE. Chemical constituents, nutritional, pharmacological and therapeutic importance of *Juglans regia*-A review. *IOSR J Pharm* www.iosrphr.org [Internet]. 2018;8(11):1–21. Available from: www.iosrphr.org
170. Oh ET, Lee JH, Kim CS, Keum YS. Alkylquinolone alkaloid profiles in *Ruta graveolens*. *Biochem Syst Ecol*. 2014;57:384–7.
171. Attia EZ, Abd El-Baky RM, Desoukey SY, El Hakeem Mohamed MA, Bishr MM, Kamel MS. Chemical composition and antimicrobial activities of essential oils of *Ruta graveolens* plants treated with salicylic acid under drought stress conditions. *Futur J Pharm Sci* [Internet]. 2018;4(2):254–64. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fjps.2018.09.001>
172. Salman HA, Venkatesh S, Senthilkumar R, Kumar BSG, Ali AM. Determination of antibacterial activity and metabolite profile of *Ruta graveolens* against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *J Lab Physicians*. 2018;320–5.
173. Baldino L, Adami R, Reverchon E. Concentration of *Ruta graveolens* active compounds using SC-CO₂ extraction coupled with fractional separation. *J Supercrit Fluids* [Internet]. 2018;131(July 2017):82–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2017.09.008>
174. Sampaio OM, Vieira LCC, Bellete BS, King-Diaz B, Lotina-Hennsen B, Da Silva MFDGF, et al. Evaluation of alkaloids isolated from *Ruta graveolens* as photosynthesis inhibitors. *Molecules*. 2018;23(10):1–13.
175. Ayil-Gutiérrez BA, Villegas-Mendoza JM, Santes-Hernández Z, Paz-González AD, Mireles-Martínez M, Rosas-García NM, et al. *Ruta graveolens* extracts and metabolites against *Spodoptera frugiperda*. *Nat Prod Commun*. 2015;10(11):1955–8.
176. Legeai F, Gimenez S, Duvic B, Escoubas JM, Gosselin Grenet AS, Blanc F, et al. Establishment and analysis of a reference transcriptome for *Spodoptera frugiperda*. *BMC Genomics*. 2014;15(1):1–14.
177. Dumas P, Legeai F, Lemaitre C, Scaon E, Orsucci M, Labadie K, et al. *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) host-plant variants: two host strains or two distinct species? *Genetica*. 2015;143(3):305–16.
178. Boaventura D, Ulrich J, Lueke B, Bolzan A, Okuma D, Gutbrod O, et al. Molecular characterization of Cry1F resistance in fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* from Brazil. *Insect Biochem Mol Biol* [Internet]. 2020;116(November 2019):103280.

Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.103280>

179. Seabrooks L, Hu L. Insects: an underrepresented resource for the discovery of biologically active natural products. *Acta Pharm Sin B* [Internet]. 2017;7(4):409–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2017.05.001>
180. Kumarswamy R, Seth RK, Dwarakanath BS, Chandna S. Mitochondrial regulation of insect cell apoptosis: Evidence for permeability transition pore-independent cytochrome-c release in the Lepidopteran Sf9 cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41(6):1430–40.
181. Cruz GS, Wanderley-Teixeira V, Oliveira J V., D'assunção CG, Cunha FM, Teixeira AAC, et al. Effect of trans-anethole, limonene and your combination in nutritional components and their reflection on reproductive parameters and testicular apoptosis in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Chem Biol Interact*. 2017;263:74–80.
182. Cui G, Sun R, Veeran S, Shu B, Yuan H, Zhong G. Combined transcriptomic and proteomic analysis of harmine on *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells to reveal the potential resistance mechanism. *J Proteomics* [Internet]. 2020;211(November 2019):103573. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103573>
183. Shen Y, De Schutter K, Walski T, Van Damme EJM, Smagghe G. Toxicity, membrane binding and uptake of the *Sclerotinia sclerotiorum* agglutinin (SSA) in different insect cell lines. *Vitr Cell Dev Biol - Anim*. 2017;53(8):691–8.
184. Costa, Aloísio Fernandes versão revista e atualizada por PDAP. *Farmacognosia*, III volume. 3ª. Lisboa: Ed. Calouste Gulbenkian; 2001.
185. *Farmacopeia Francesa*. 1989.
186. Jakovljević ZD, Stanković SM, Topuzović DM. Seasonal variability of *Chelidonium majus* L. secondary metabolites content and antioxidant activity. *EXCLI J*. 2013;12:260–8.
187. Da Silva FGE, Francisco FR, João JC, Santiago GMP, Bezerra MAX, Barbosa FG, et al. Seasonal variation, larvicidal and nematocidal activities of the leaf essential oil of *Ruta graveolens* L. *J Essent Oil Res*. 2014;26(3):204–9.
188. Aivazi AA, Vijayan VA. Efficacy of *Ruta graveolens* extract and its synergistic effect with cypermethrin against *Anopheles stephensi* Liston larvae. *Toxicol Environ Chem*. 2010;92(5):893–901.
189. Perera AGWU, Karunaratne MMSC, Chinthaka SDM. Biological activity and secondary metabolite profile of *Ruta graveolens* leaves against maize weevil infestations. *J Entomol Zool Stud*. 2017;21(0).
190. Kamboj A, Saluja AK. ISOLATION OF STIGMASTEROL AND β -SITOSTEROL FROM PETROLEUM ETHER EXTRACT OF AERIAL PARTS OF *AGERATUM CONYZOIDES* (ASTERACEAE). *Int J Pharm Pharm Sci*. 2011;3(1):94–6.
191. Chauhan A, Rijhwani S. A Comprehensive Review on Phytochemistry of *Ageratum conyzoides* Linn .(Goat weed). *Int J Pharm Phytopharm Res*. 2015;3(Special Issue):348–58.
192. Yadav N, Ganie SA, Singh B, Chhillar AK, Yadav SS. Phytochemical constituents and ethnopharmacological properties of *Ageratum conyzoides* L. *Phyther Res*. 2019;(May):2163–78.
193. Ivanova A, Mikhova B, Najdenski H, Tsvetkova I, Kostova I. Antimicrobial and

- cytotoxic activity of *Ruta graveolens*. *Fitoterapia*. 2005;76:344–7.
194. Kaminski M, Kartanowicz R, Kaminski MM, Królicka A, Sidwa-Gorycka, Lojkowska E, et al. HPLC-DAD in identification and quantification of selected coumarins in crude extracts from plant cultures of *Ammi majus* and *Ruta graveolens*. *J Sep Sci*. 2003;26:1287–91.
 195. Chacko A, Christy PH, Ks K. Study on larvicidal activity of crude extracts of *Ruta graveolens* against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. *Int J Mosq Res*. 2015;2(4):01–6.
 196. Wang YN, Wang HX, Shen ZJ, Zhao LL, Clarke SR, Sun JH, et al. Methyl Palmitate, an Acaricidal Compound Occurring in Green Walnut Husks. *J Econ Entomol*. 2009;102(1):196–202.
 197. Pereira JA, Oliveira I, Sousa A, Ferreira ICFR, Bento A, Estevinho L. Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. *Food Chem Toxicol*. 2008;46(6):2103–11.
 198. Wang Y, Wang H, Fang K, Su X, Ren J. The toxicity and physiological effect of unripe husks of *Juglans regia* on *Teranychas viennensis*. *IEEE*. 2008;1383–6.
 199. Calle J, Rivera A, Luis JG, Aguiar ZE, Niemeyer HM, Joseph-Nathan P. INSECTICIDAL ACTIVITY OF THE PETROLEUM ETHER EXTRACT OF *AGERATUM conyzoides* L. *Rev Colomb Química*. 1990;19(1):91–6.
 200. Martínez ML, Labuckas DO, Lamarque AL, Maestri DM. Walnut (*Juglans regia* L.): Genetic resources, chemistry, by-products. *J Sci Food Agric*. 2010;90(12):1959–67.
 201. Kamboj A, Salujab AK. HPTLC finger print profile of extracts from dried aerial parts of *Ageratum conyzoides* L. in different solvents. *Asian J Pharm Sci*. 2011;6(2):82–8.
 202. Ramezani N, Raji F, Rezakazemi M, Younas M. Journal of Environmental Chemical Engineering Juglone extraction from walnut (*Juglans regia* L .) green husk by supercritical CO₂ : Process optimization using Taguchi method. *J Environ Chem Eng* [Internet]. 2020;8(3):103776. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.103776>
 203. Hu W, Du W, Bai S, Lv S, Chen G. Phenoloxidase, an effective bioactivity target for botanical insecticide screening from green walnut husks. *Nat Prod Res* [Internet]. 2018;32(23):2848–51. Available from: <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1380015>
 204. Qasim M, Fujii Y, Ahmed MZ, Aziz I, Watanabe KN, Khan MA, et al. all Aspects of Plant Biology Phytotoxic analysis of coastal medicinal plants and quantification of phenolic compounds using HPLC Phytotoxic analysis of coastal medicinal plants and quantification of phenolic. *Plant Biosyst - An Int J Deal with all Asp Plant Biol* [Internet]. 2019;153(6):767–74. Available from: <https://doi.org/10.1080/11263504.2018.1549607>
 205. Daniela Aparecida Chagas-Paula, Tiago Branquinho Oliveira, Danniela Priscylla Vasconcelos Faleiro, Rejane Barbosa Oliveira FBDC. Outstanding Anti-inflammatory Potential of Selected Asteraceae Species through the Potent Dual Inhibition of Cyclooxygenase-1 and 5-Lipoxygenase. *Planta Med*. 2015;81:1296–307.
 206. Pavela R, Maggi F, Iannarelli R, Benelli G. Plant extracts for developing mosquito larvicides: From laboratory to the field, with insights on the modes of action. *Acta*

- Trop [Internet]. 2019;193(December 2018):236–71. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.01.019>
207. MISHRA S, DWIVEDI B, SINGH A, THAKUR LK, RANI R, PARJAPATI R. DEVELOPMENT OF TLC AUTOGRAPHICALLY GUIDED GC-MS PROFILE OF MAJOR PHYTOCHEMICAL CONSTITUENTS FOR COMPARATIVE ASSESSMENT IN DIFFERENT EXTRACTS OF *AGERATUM CONYZOIDES* L. Int J Pharm Pharm Sci. 2014;6(2):559–61.
 208. Shabana MM, Ibrahim AI, Ibrahim GF. Tissue culture and evaluation of some active constituents of *Ruta graveolens* L. II: Effect of plant growth regulators, explant type and precursor on coumarin content of *Ruta graveolens* L. callus cultures. Arab J Biotechnol. 2002;5(1):45–56.
 209. Rojas J, Mender T, Rojas L, Gullien E, Buitrago A, Lucena M, et al. Estudio comparativo de la composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Ruta graveolens* L. recolectada en los estados Mérida y Miranda, Venezuela. Av en Química. 2011;6(3):89–93.
 210. Braga PAC, Severino VGP, Freitas SDL De, Fátima M, F G, Fernandes JB, et al. Dihydrocinnamic acid derivatives from *Hortia* species and their chemotaxonomic value in the Rutaceae. Biochem Syst Ecol [Internet]. 2012;43:142–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2012.03.005>
 211. Alehaideb Z, Sherifdeen M, Law FC. FURANOCOUMARIN BIOACTIVES IN THE APIACEAE AND RUTACEAE FAMILIES OF PLANTS. Can J Pure Appl Sci. 2017;11(2):4157–67.
 212. Proestos C, Boziaris IS, Nychas GJE, Komaitis M. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. Food Chem. 2006;95(4):664–71.
 213. Hale AL, Meepagala KM, Oliva A, Aliotta G, Duke SO. Phytotoxins from the Leaves of *Ruta graveolens*. J Agric Food Chem. 2004;52:3345–9.
 214. Kuzovkina I, Al'terman I, Schneider B. Specific accumulation and revised structures of acridone alkaloid glucosides in the tips of transformed roots of *Ruta graveolens*. Phytochemistry. 2004;65:1095–100.
 215. Elansary HO, Szopa A, Kubica P, Ekiert H, El-Ansary DO, Al-Mana FA, et al. Polyphenol Content and Biological Activities of *Ruta graveolens* L. and *Artemisia abrotanum* L. in Northern Saudi Arabia. processes. 2020;8(531).
 216. Ratheesh M, Sindhu G, Helen A. Anti-inflammatory effect of quinoline alkaloid skimmianine isolated from *Ruta graveolens* L. Inflamm Res. 2013;62(4):367–76.
 217. Perera AGWU, Karunaratne MMSC. Eco-Friendly Alternatives for Storage Pest Management : Leaves of *Ruta Graveolens* (*Aruda*) as a Repellent Against the Rice Weevil , *Sitophilus Oryzae* L . Int J Multidiscip Stud. 2015;2(2).
 218. Szopa A, Ekiert H, Szewczyk A, Fugas E. Production of bioactive phenolic acids and furanocoumarins in in vitro cultures of *Ruta graveolens* L. and *Ruta graveolens* ssp. *divaricata* (Tenore) Gams. under different light conditions. Plant Cell Tissue Organ Cult. 2012;110(3):329–36.
 219. Grosso C, Ferreres F, Gil-izquierdo A, Valentão P, Sampaio M, Lima J, et al. Talanta Box – Behnken factorial design to obtain a phenolic-rich extract from the aerial parts of *Chelidonium majus* L . Talanta [Internet]. 2014;130:128–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.06.043>

220. Zhang Q. EFFECTS OF EXTRACTION SOLVENTS ON PHYTOCHEMICALS AND. Eur J Food Sci Technol. 2015;3(5):15–21.
221. Fernández-agulló A, Pereira E, Freire MS, Valentão P, Andrade PB, González-álvarez J. Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L .) green husk extracts. Ind Crop Prod [Internet]. 2013;42:126–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.05.021>
222. Tabaraki R, Rastgoo S. Comparison between conventional and ultrasound-assisted extractions of natural antioxidants from walnut green husk. Korean J Chem Eng. 2014;31(4):676–83.
223. Ghasemi K, Ghasemi Y, Ehteshamnia A, Nabavi SM, Nabavi SF, Ebrahimzadeh MA, et al. Influence of environmental factors on antioxidant activity , phenol and flavonoids contents of walnut (*Juglans regia* L .) green husks. J Med Plants Res. 2011;5(7):1128–33.
224. Li C, Liu JX, Zhao L, Di DL, Meng M, Jiang SX. Capillary zone electrophoresis for separation and analysis of four diarylheptanoids and an α -tetralone derivative in the green walnut husks (*Juglans regia* L.). J Pharm Biomed Anal. 2008;48(3):749–53.
225. Moghaddam PZ, Mohammadi A. In vitro antioxidant and antibacterial activity of various extracts from exocarps and endocarps of walnut. Pak J Pharm Sci. 2017;30(5):1725–31.
226. Solar A, Jakopic J, Miklavc J, Stampar F, Veberic R, Trdan S. Walnut husk fly substantially affects sensory attributes and phenolic contents of the kernels in common walnut. Sci Hortic (Amsterdam) [Internet]. 2019;247(August 2018):17–26. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.078>
227. Hayes D, Angove MJ, Tucci J, Dennis C. Walnuts (*Juglans regia*) Chemical Composition and Research in Human Health. Crit Rev Food Sci Nutr. 2016;56(8):1231–41.
228. Caballero E, Soto C, Jara J. Thermal stability data of juglone from extracts of walnut (*Juglans regia*) green husk, and technologies used to concentrate juglone. Data Br [Internet]. 2019;25:104081. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.dib.2019.104081>
229. Panth N, Paudel KR, Karki R. Phytochemical profile and biological activity of *Juglans regia*. J Integr Med [Internet]. 2016;14(5):359–73. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2095-4964\(16\)60274-1](http://dx.doi.org/10.1016/S2095-4964(16)60274-1)
230. Kamboj A, Saluja AK. *Ageratum conyzoides* L.: A review on its phytochemical and pharmacological profile Anjoo. Int J Green Pharm. 2008;59–68.
231. Tan D, Yan Q. Chemical Constituents of the Aerial Parts of *Ageratum conyzoides*. Chem Nat Compd. 2019;55(6):1145–6.
232. Acheampong F, Reilly J, Larbie C, Spencer M, Gunderson K, Howson RAC, et al. Methoxy-flavones identified from *Ageratum conyzoides* induce capase -3 and -7 activations in Jurkat cells. J Med Plants Res. 2017;11(38):583–90.
233. Adebayo AH, Ji C-J, Zhang Y-M, He W-J, Zeng G-Z, Han H-J, et al. A new Chromene isolated from *Ageratum conyzoides*. Nat Prod Commun. 2011;6(9):1263–5.
234. Kumar B, Misra A, Kumar S, Kumar A, Rawat S, Rawat YS, et al. Antitick potential and chemical variability among *Ageratum conyzoides* L . germplasms collected from Eastern and Western Ghats of India L . germplasms collected from Eastern

- and Western Ghats of India. *Int J Acarol* [Internet]. 2019;45(8):488–96. Available from: <https://doi.org/10.1080/01647954.2019.1677772>
235. De Mendonça FAC, Da Silva KFS, Dos Santos KK, Ribeiro Júnior KAL, Sant'Ana AEG. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. *Fitoterapia*. 2005;76(7–8):629–36.
 236. Moreira MD, Picanço MC, Cláudio L, Barbosa DA. Plant compounds insecticide activity against Coleoptera pests of stored products. *Pesq agropec bras*. 2007;42(7):909–15.
 237. Kaur R, Dogra NK. A Review on Traditional Uses, Chemical Constituents and Pharmacology of *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae). *Int J Pharm Biol Arch* [Internet]. 2014;5(5):33–45. Available from: www.ijpba.info
 238. Chen C, Huang Y, Huang F, Wang C, Ou J. Water-Soluble Glycosides from *Ruta graveolens*. *J Nat Prod*. 2001;64:990–2.
 239. Diwan R, Malpathak N. Effect of Polyamines on Shoot Multiplication and Furanocoumarin Production in *Ruta graveolens* Cultures. *Nat Prod Commun*. 2012;7(7):895–8.
 240. Halstead CW, Forster PI, Waterman PG. Novel Metabolites from the Stem Bark of *Brombya* sp. nova (Gap Creek) (Rutaceae). *Nat Prod Commun*. 2006;1(5):351–6.
 241. Lapčík O, Klejdus B, Davidová M, Kokoska L, Kubán V, Moravcová J. Isoflavonoids in the Rutaceae Family : 1 . *Fortunella obovata* , *Murraya paniculata* and Four Citrus Species. *Phytochem Anal*. 2004;15:293–9.
 242. Rutaceae B, Seo C, Ahn E, Kang J, Lee J, Sub J, et al. Phytochemistry Letters Excavosides A and B , two new flavonoid glycosides from *Clausena excavata*. *Phytochem Lett* [Internet]. 2017;20(April):93–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2017.04.006>
 243. Forsatkar MN, Hedayatirad M, Luchiari AC. “Not tonight zebrafish”: The effects of *Ruta graveolens* on reproduction. *Pharm Biol* [Internet]. 2018;56(1):60–6. Available from: <https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1421234>
 244. Yao JY, Li XL, Shen JY, Pan XY, Hao GJ, Xu Y, et al. Isolation of bioactive components from *Chelidonium majus* L. with activity against *Trichodina* sp. *Aquaculture* [Internet]. 2011;318(1–2):235–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.04.035>
 245. Masek A, Latos-brozio M, Chrzescijanska E. Polyphenolic Profile and Antioxidant Activity of *Juglans regia* L . Leaves and Husk Extracts. *forests*. 2019;10(988):1–14.
 246. Bosi CF, Rosa DW, Grougnet R, Lemonakis N, Halabalaki M, Skaltsounis AL, et al. Pyrrolizidine alkaloids in medicinal tea of *ageratum conyzoides*. *Brazilian J Pharmacogn* [Internet]. 2013;23(3):425–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000028>
 247. Amoabeng BW, Stevenson PC, Mochiah BM, Asare KP, Gurr G. M. Scope for non-crop plants to promote conservation biological control of crop pests and serve as sources of botanical insecticides. *Sci Rep*. 2020;10(6951).
 248. Amoabeng BW, Gurr GM, Gitau CW, Stevenson PC. Cost: Benefit analysis of botanical insecticide use in cabbage: Implications for smallholder farmers in developing countries. *Crop Prot* [Internet]. 2014;57:71–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2013.11.019>

249. Amoabeng BW, Gurr GM, Gitau CW, Nicol HI, Munyakazi L. Tri-Trophic Insecticidal Effects of African Plants against Cabbage Pests. *PLoS One*. 2013;8(10):1–10.
250. Ahmed OM, Abdel MA, Yazid IA, Mahmoud AM. ANTIHYPERGLYCEMIC , ANTIHYPERLIPIDEMIC AND ANTIOXIDANT EFFECTS AND THE PROBABLE MECHANISMS OF ACTION OF RUTA GRAVEOLENS INFUSION AND RUTIN IN NICOTINAMIDE-STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC RATS. *Diabetol Croat*. 2010;39(1).
251. Feo V De, Simone F De, Senatore F. Potential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. *Phytochemistry*. 2002;61:573–8.
252. Barbosa FS, Leite GLD, Alves SM, Nascimento AF, D'Ávila V de A, da Costa CA. Ação inseticida de *Ruta graveolens*, *Copaifera langsdorffii* e *Chenopodium ambrosioides* sobre pragas de tomate. *Acta Sci - Agron*. 2011;33(1):37–43.
253. Song J, Yang H, Pyo S, Jung I, Yi S, Yun Y. Immunomodulatory Activity of Protein-Bound Polysaccharide Extracted from *Chelidonium majus*. *Arch Pharm Res*. 2002;25(2):158–64.
254. Izadiyan Z, Shameli K, Miyake M, Hara H, Mohamad SEB, Kalantari K, et al. Cytotoxicity assay of plant-mediated synthesized iron oxide nanoparticles using *Juglans regia* green husk extract. *Arab J Chem* [Internet]. 2018; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2018.02.019>
255. Hu W, Du W, Bai S, Lv S, Chen G. Phenoloxidase, an effective bioactivity target for botanical insecticide screening from green walnut husks *Wenyi*. *Suppl Mater*. 2018;1–12.
256. Abdoli M, Hashem F, Goushegir A. Advances in Integrative Medicine Anti-hyperglycemic effect of aqueous extract of *Juglans regia* L . leaf (walnut leaf) on type 2 diabetic patients : A randomized controlled trial. *Adv Integr Med* [Internet]. 2017;4(3):98–102. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aimed.2017.10.001>
257. Ming LC. *Ageratum conyzoides* : A Tropical Source of Medicinal and Agricultural Products. *Perspect new Crop new uses*. 1999;(1988):469–73.
258. Iqbal MCM, Jayasinghe ULB, Herath HMTB, Wijesekara KB, Fujimoto Y. A Fungistatic Chromene from *Ageratum conyzoides*. *Phytoparasitica*. 2004;32(2):119–26.
259. Oliva A, Meepagala KM, Wedge DE, Harries D, Hale AL, Aliotta G, et al. Natural Fungicides from *Ruta graveolens* L . Leaves , Including a New Quinolone Alkaloid. *J Agric Food Chem*. 2003;51:890–6.
260. Osman S, Jamil L, Ramadan MA. Bioactivity Guided Study of Anti-helicobacter Activity of *Ruta graveolens*. *Int J Appl Res Nat Prod*. 2015;8(3):1–5.
261. Maggini V, Lombardi N, Crescioli G, Gallo E, Sivelli F, Gensini GF, et al. *Chelidonium majus* : Relevant safety aspects of a hepatotoxic plant, trawling the web . *Phyther Res*. 2019;33(9):2465–9.
262. Jorge TCM, Lenartovicz V, Andrade MW, Bonafin T, Giordani MA, Bueno NBC, et al. Pediculicidal activity of hydroethanolic extracts of *Ruta graveolens*, *Melia azedarach* and *Sambucus australis*. *Lat Am J Pharm*. 2009;28(3):457–9.
263. Vieira V, Pereira C, Abreu RM V, Calhelha RC, José M, Coutinho JAP, et al. Hydroethanolic extract of *Juglans regia* L . green husks : A source of bioactive phytochemicals. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2020;137:111–89. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111189>

264. Harel D, Khalid SA, Kaiser M, Brun R, Wünsch B, Schmidt TJ. Encecalol angelate , an unstable chromene from *Ageratum conyzoides* L .: Total synthesis and investigation of its antiprotozoal activity. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2011;137(1):620–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2011.06.015>
265. Nour AMM, Khalid SA, Kaiser M, Brun R, Abdalla WE, Schmidt TJ. The antiprotozoal activity of methylated flavonoids from *Ageratum conyzoides* L . *J Ethnopharmacol*. 2010;129:127–30.
266. Nahrstedt A, Wolters UE. Rutacridone-Epoxyde , a new Acridone Alkaloid from *Ruta graveolens*. *Zeitschrift für Naturforsch*. 1981;36(c):200–3.
267. Tambunan AP, Bahtiar A, Tjandrawinata RR. Influence of Extraction Parameters on the Yield , Phytochemical , TLC-Densitometric Quantification of Quercetin , and LC-MS Profile , and how to Standardize Different Batches for Long Term from *Ageratum conyzoides* L . Leaves. *Pharmacogn J*. 2017;9(6):767–74.
268. Meepagala KM, Schrader KK, Wedge DE, Duke SO. Algicidal and antifungal compounds from the roots of *Ruta graveolens* and synthesis of their analogs. *Phytochemistry*. 2005;66:2689–95.
269. Pintong A, Ampawong S, Komalamisra N, Sriwichai P, Popruk S, Ruangsittichai J. Insecticidal and Histopathological Effects of *Ageratum conyzoides* Weed Extracts against Dengue. *Insects* [Internet]. 2020;11(224):1–17. Available from: [doi:10.3390/insects11040224](https://doi.org/10.3390/insects11040224)
270. Ayil-Gutiérrez BA, Sánchez-Teyer LF, Vazquez-Flota F, Monforte-González M, Tamayo-Ordóñez Y, Tamayo-Ordóñez MC, et al. Biological effects of natural products against *Spodoptera* spp. *Crop Prot* [Internet]. 2018;114(August):195–207. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.08.032>
271. Wen Z, Pan L, Berenbaum MR, Schuler MA. Metabolism of linear and angular furanocoumarins by *Papilio polyxenes* CYP6B1 co-expressed with NADPH cytochrome P450 reductase. *Insect Biochem Mol Biol*. 2003;33:937–47.
272. Mao W, Rupasinghe S, Zangerl AR, Schuler MA, Berenbaum MR. Remarkable substrate-specificity of CYP6AB3 in *Depressaria pastinacella*, a highly specialized caterpillar. *Insect Mol Biol*. 2006;15(2):169–79.
273. Calcagno MP, Coll J, Lloria J, Faini F, Alonso-Amelot ME. Evaluation of synergism in the feeding deterrence of some furanocoumarins on *Spodoptera littoralis*. *J Chem Ecol*. 2002;28(1):175–91.
274. Li W, Schuler MA, Berenbaum MR. Diversification of furanocoumarin-metabolizing cytochrome P450 monooxygenases in two papilionids: Specificity and substrate encounter rate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(24):14593–8.
275. Hung CF, Holzmacher R, Connolly E, Berenbaum MR, Schuler MA. Conserved promoter elements in the CYP6B gene family suggest common ancestry for cytochrome P450 monooxygenases mediating furanocoumarin detoxification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(22):12200–5.
276. Katoh K, Miwa K, Esumi T, Imagawa H, Yoshiyasu F. Studies in Natural Products Chemistry [Internet]. Atta-ur-Rahman F, editor. 2014. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsames.2011.03.003><https://doi.org/10.1016/j.gr.2017.08.001><http://dx.doi.org/10.1016/j.precamres.2014.12.018><http://dx.doi.org/10.1016/j.precamres.2011.08.005><http://dx.doi.org/10.1080/00206814.2014.902757><http://dx.doi.org/10.1016/j.precamres.2011.08.005>

277. Pavela R, Vrchotová N. Insecticidal effect of furanocoumarins from fruits of *Angelica archangelica* L. against larvae *Spodoptera littoralis* Boisd. *Ind Crops Prod*. 2013;43(1):33–9.
278. Panno ML, Giordano F. Effects of psoralens as anti-Tumoral agents in breast cancer cells. *World J Clin Oncol*. 2014;5(3):348–58.
279. Ren Y, Mu Y, Yue Y, Jin H, Tao K, Hou T. Neochamaejasmin A extracted from *Stellera chamaejasme* L. induces apoptosis involving mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Sf9 cells. *Pestic Biochem Physiol* [Internet]. 2019;157(April):169–77. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.03.025>
280. Balasooriya SJ, Sotheeswaran S, Balasubramaniam S. Economically useful plants of Sri Lanka Part IV* Screening of Sri Lanka Plants for Tannins. *J Natl Sci Found Sri Lanka*. 1982;10(2):213.
281. Wall ME, Wani MC, Brown DM, Fullas F, Olwald JB, Josephson FF, et al. Effect of tannins on screening of plant extracts for enzyme inhibitory activity and techniques for their removal. *Phytomedicine*. 1996;3(3):281–5.
282. Diwan R, Shinde A, Malpathak N. Phytochemical Composition and Antioxidant Potential of *Ruta graveolens* L. *In Vitro Culture Lines* . *J Bot*. 2012;2012:1–6.