

Controle de qualidade: obtenção e caracterização de produtos vegetais naturais para o controle de pragas

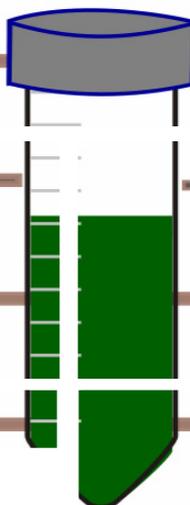
Vera Lúcia Perussi Polez

Gabriella Magarelli

Marlinda Lobo de Souza

Ana Flávia Oliveira Rodrigues

Thales Lima Rocha



Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Parque Estação Biológica
PqEB, Av. W5 Norte (final)
70970-717, Brasília, DF
Fone: +55 (61) 3448-470
Fax: +55 (61) 3340-3624

Presidente
Wagner Alexandre Lucena

Secretária-Executiva
Daniela Aguiar de Souza

Membros
Ana Flávia do N. Dias Côrtes; Andrielle Camara Amaral Lopes; Bruno Machado Teles Walter; Daniela Aguiar de Souza; Debora Pires Paula; Edson Junqueira Leite; Marcos Aparecido Gimenes; Solange Carvalho Barrios Roveri Jose

Supervisão editorial
Daniela Aguiar de Souza

Revisão de texto
Jakcelia Costa da Silva

Normalização bibliográfica Rosameres
Rocha Galvão

Tratamento das ilustrações
Adilson Werneck

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Marcus Vinicius Pereira e Souza

Foto da capa
Claudio Bezerra

1ª edição
1ª impressão (ano): tiragem

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Controle de qualidade: obtenção e caracterização de produtos vegetais naturais para o controle de pragas / Vera Lúcia Perussi Polez... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2021. 34 p. - (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 378).

1. Controle de pragas. 2. Produtos naturais vegetais I. Polez, V. L. P. II. Série

Autores

Vera Lúcia Perussi Polez

Bióloga, doutora em Ciências (Bioquímica), pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

Gabriella Magarelli

Química, doutora em Química, analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

Marlinda Lobo de Souza

Bióloga, doutora em Microbiologia, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

Marcio Martinello Sanches

Biólogo, doutor em Agronomia (Proteção de Plantas), pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

Ana Flávia Oliveira Rodrigues

Engenheira agrônoma, Universidade de Brasília, DF.

Thales Lima Rocha

Biólogo, doutor em Bioquímica, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

Apresentação

O uso de produtos naturais para o controle de pragas é considerado uma estratégia mais sustentável e visa garantir a segurança alimentar. Contudo, os produtos naturais de origem vegetal podem apresentar uma composição química mais heterogênea e variável, o princípio ativo encontra-se inserido em um fitocomplexo químico e podem apresentar problemas de contaminação por agentes químicos ou biológicos.

Os desafios apresentados podem ser solucionados pelo desenvolvimento de técnicas analíticas, estudos multidisciplinares (botânica, agronomia, ecologia, química, fitopatologia, estatística, entre outros), uso de ferramentas estatísticas, e implementação do sistema de qualidade (normas, sistematização, protocolos padronizados entre outros).

O estabelecimento do controle de qualidade caracteriza-se como uma ação essencial que visa garantir a produção de lotes conforme as normas estabelecidas mantendo a atividade, o teor, a pureza, a eficácia, a inocuidade bem como a reprodutibilidade, a rastreabilidade e a segurança. A garantia da qualidade assegura que os padrões definidos de qualidade sejam aplicados possibilitando um consumo seguro pela população. Ademais, visa também averiguar e garantir que as políticas e os procedimentos das áreas envolvidas sejam implementados. Neste contexto, o presente documento consiste na apresentação de estratégias e etapas importantes para obter produtos à base vegetal com padrão de qualidade.

Maria Cléria Valadares Inglis
Chefe-Geral
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Sumário

Introdução	6
Obtenção de produtos naturais de origem vegetal	9
Caracterização fitoquímica	11
Estudos para avaliação do comportamento ambiental, caracterização	20
toxicológica e ecotoxicológica	
Caracterização e qualificação do produto formulado e estudos fisico-químicos...	21
Registros	22
Sistema de qualidade	23
Referências	27

Introdução

O controle de pragas é fundamental para o agronegócio brasileiro e precisa garantir a produtividade e a segurança alimentar. Esse controle é realizado, principalmente, pelo uso de defensivos químicos (agrotóxicos), que podem exibir efeitos tóxicos à saúde humana e animal (Smith-Spangles et al., 2012; Clarke et al., 2015; Hutter et al., 2018). Os agrotóxicos químicos podem ter alta persistência no solo, na água e nas colheitas resultando em problemas ambientais e contaminação dos alimentos (Amoabeng et al., 2014; Mpumi et al., 2016). Neste contexto, existe uma demanda crescente da sociedade, pela redução do impacto ambiental e social das atividades agrícolas.

O uso de produtos naturais de origem vegetal é uma excelente alternativa para o controle de pragas e pode contribuir para a segurança alimentar (Mpumi et al., 2016; Rocha et al., 2017; Tembo et al., 2018; Ntalli et al., 2020). Os benefícios dos produtos naturais na agricultura são diversos, pois podem apresentar: i. uma meia-vida menor (as estruturas químicas estão presentes na natureza e podem ser degradadas mais facilmente) (Duke et al., 2002; Mpumi et al., 2016; Moraes et al., 2016); ii. um menor risco de desenvolvimento de novos mecanismos de resistência (produtos naturais podem apresentar mais de um princípio ativo com ação para o controle da praga) (Duke et al., 2002; Moraes et al., 2016) e iii. uma baixa toxicidade e um menor impacto aos insetos benéficos (Amoabeng et al., 2014; Mpumi et al., 2016). Adicionalmente, a descoberta de defensivos a partir de fontes naturais representa a possibilidade de se obter diversos compostos ativos ainda não explorados (Moraes et al., 2016).

Os produtos sintéticos (defensivos químicos) apresentam composição química mais homogênea, isolamento do princípio ativo sintético e alto grau de pureza. Quando comparados aos produtos sintéticos (agrotóxicos), os produtos naturais possuem algumas particularidades que tornam a sua utilização mais desafiadora tais como: i. composição química mais variável e heterogênea (exemplo, variação quantitativa e qualitativa como resultado a exposição aos estresses bióticos e abióticos); ii. identificação do princípio ativo no fitocomplexo químico (o controle mais efetivo contra o organismo alvo pode ocorrer por sinergia dos compostos); iii. podem apresentar problemas de contaminação (exemplo, insetos, fungos, excreta de animais, bactérias, endotoxinas, micotoxinas, defensivos agrícolas, metais pesados entre outros) (Ghisleni et al., 2016; Valares Masa et al., 2016; Qi et al., 2017; LI et al., 2017; Rocha et

al., 2017; Ribes Moya et al., 2018; Zhang et al., 2018; Liu et al., 2020; Huang et al., 2020).

O arcabouço legal específico para o registro de um produto fitoquímico para controle de pragas na agricultura encontra-se em andamento. Estes produtos estão sendo classificados como "agrotóxicos e afim" pela legislação vigente (Decreto nº 4.074 de 4 de janeiro de 2002), sendo que no artigo 12 deste decreto, os produtos de baixa toxicidade e periculosidade terão a tramitação de seus processos priorizados. No sentido de regulamentar o uso desses produtos, a Instrução Normativa Conjunta MAPA, Ibama e Anvisa nº 01/2020 foi submetida à Consulta Pública e visa "estabelecer procedimentos a serem adotados para efeito de registro de produto fitoquímico que se caracterize como agrotóxico ou afim, cujo(s) ingrediente(s) ativo(s) seja(m) obtido(s), exclusivamente, de matéria-prima vegetal" (Brasil, 2020).

Além da necessidade de uma regulamentação específica, também constitui um desafio, a adoção de procedimentos experimentais com requisitos de qualidade estabelecidos e padronizados envolvendo os ensaios com o uso de produtos naturais (fitoquímicos) para controle de pragas. Neste caso, esses desafios podem ser superados pelo desenvolvimento de técnicas analíticas, ferramentas estatísticas para tratamento de dados, estudos multidisciplinares (exemplo, botânica, agronomia, ecologia, química, estatística, fitopatologia entre outros) e implementação da qualidade (exemplo, estabelecimento e cumprimento de requisitos baseados em Normas de qualidade e na legislação vigente, sistematização, estabelecimento de protocolos padronizados entre outros). Assim, o estabelecimento do controle de qualidade é uma ação essencial, que engloba aspectos referentes à identificação correta da espécie vegetal, a garantia da pureza e a qualidade química preconizadas para a matéria-prima vegetal bem como seus produtos finalizados com reprodutibilidade, rastreabilidade e segurança (Figura 1).

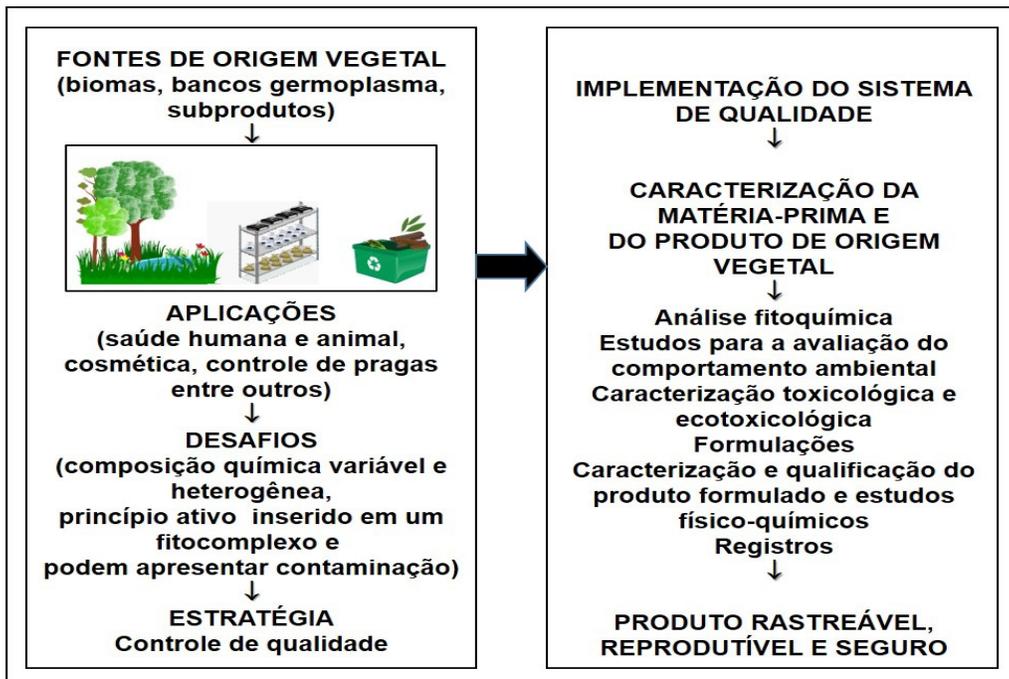


Figura 1. Resumo esquemático das etapas e a importância do estabelecimento de normas, padronizações e práticas que visam garantir a qualidade do derivado e do produto de origem vegetal (fontes provenientes dos biomas, dos bancos de germoplasma ou dos subprodutos agrícolas).

A garantia da qualidade refere-se a fatores que podem influenciar na qualidade de um produto e objetiva assegurar que os seus padrões sejam aplicados e possam proporcionar um consumo seguro pela população, como no caso dos medicamentos (Brasil, 2013), mas também pode ser utilizada para outras aplicações como por exemplo na agricultura. Adicionalmente, é importante realizar o controle de qualidade (conjunto de medidas que propõe garantir a produção de lotes de acordo com as normas estabelecidas mantendo a atividade, o teor, a pureza, a eficácia e a inocuidade) (Anvisa, 2013).

O controle de qualidade está relacionado com o produto e busca analisar as matérias-primas e os produtos finalizados, assegurando o atendimento de suas especificações. Neste sentido, o presente documento consiste na apresentação de estratégias e etapas essenciais para obter produtos naturais à base vegetal visando o controle de qualidade.

Obtenção de produtos naturais de origem vegetal

O reino Plantae é caracterizado por sua significativa biodiversidade (Judd et al., 2009). O Brasil possui uma diversidade vegetal extremamente significativa, compreendendo cerca de 20% de todas as espécies descritas, com aproximadamente 43 mil espécies (Brasil, 2010). Assim, existe um potencial grande para a obtenção de extratos e compostos com atividades biológicas de interesse econômico, pois a biodiversidade alta é retratada na presença de diferentes metabólitos (Guerra; Nodari, 2007).

A bioprospecção possibilita a identificação de componentes provenientes do patrimônio genético ou de subprodutos agrícolas (exemplo, resíduos de madeira/florestal, subprodutos de óleos, de frutas, entre outros) com potencial valor de uso para o desenvolvimento de novos produtos ou para estudos de pesquisas básicas (Yakhlef et al., 2018; Montibus et al., 2021, Belgacem et al., 2021). Neste caso, é fundamental explorar o potencial das espécies vegetais como fonte de compostos naturais, para conhecer os compostos produzidos pelas diversas espécies, bem como os fatores intrínsecos e extrínsecos que influenciam a sua produção (Valares Masa et al., 2016; Qi et al., 2017; Li et al., 2017; Ribes Moya et al., 2018; Zhang et al., 2018; Huang et al., 2020). Assim, os materiais para análise podem ser provenientes de coletas ou pelo acesso aos bancos de germoplasma.

As espécies vegetais apresentam a capacidade de produzir uma variedade significativa de compostos químicos com diversas atividades biológicas para o controle de pragas (Tholl, 2015; Rocha et al., 2017; Tembo et al., 2018; Hernández-Carlos; Gamboa-Ângulo, 2019; Ntalli et al., 2020). O fitocomplexo é o conjunto de todas as substâncias, originadas do metabolismo primário ou secundário, responsáveis, pelos efeitos biológicos de uma planta ou de seus derivados (Anvisa, 2014). Os metabólitos secundários (exemplos, óleos essenciais, carotenoides, ácidos fenólicos, flavonoides, cumarinas, saponinas, alcaloides, taninos, entre outros) podem apresentar alterações de acordo com as respostas da planta aos estímulos provenientes do meio ambiente (fatores bióticos e abióticos), de forma que sua produção pode apresentar variações qualitativas e quantitativas, inter e/ou intraespecífica (Li et al, 2020). Os compostos vegetais possuem propriedades que podem ser aplicadas em diversas áreas, com destaque para medicina (produção de fármacos) e para a agro-

pecuária (controle de pragas) (Sasidharan et al., 2011; Avoseh et al., 2015; Dutra et al., 2016; Vu et al., 2017; Hernández-Carlos; Gamboa-Angulo, 2019). Além dos metabólitos secundários, diversos metabólitos primários (exemplos, carboidratos simples, aminoácidos, entre outros) também podem ter ação no controle de pragas (Rocha et al., 2017). Assim, um número significativo de compostos com atividade biológica (exemplo, compostos fenólicos, aminoácidos, peptídeos, carboidratos, ácidos orgânicos entre outros) que apresentam controle de pragas foram isolados e identificados (Yang; Yue, 2012; Brusotti et al., 2014; Hikal et al., 2017; Rocha et al., 2017; Lengai et al., 2020). Contudo, existe um número significativo de espécies ou processos de extração a serem explorados.

Há um grande potencial para o aproveitamento dos recursos provenientes, tanto da biodiversidade como de subprodutos agropecuários de origem vegetal e esses podem impulsionar a estruturação de cadeias produtivas e a expansão de Centros de Pesquisa direcionados para as atividades de bioprospecção que objetivam o controle de pragas. As estratégias e etapas para obter extratos e/ou produtos naturais (base vegetal) com padrão de qualidade estão descritas a seguir.

Caracterização fitoquímica

A fitoquímica consiste no estudo dos compostos químicos provenientes de espécies vegetais que objetiva determinar de forma qualitativa e/ou quantitativa as principais classes e /ou metabólitos. Os fatores que afetam o perfil fitoquímico dos componentes extraídos de espécies botânicas podem variar de acordo com: i. a espécie e a parte da planta selecionada; ii. a coleta da espécie vegetal em diferentes épocas do ano, as condições climáticas, geográficas, a forma de colheita e de armazenamento; iii. a contaminação por outros materiais (exemplo, insetos, fungos, excreta de animais, bactérias, endotoxinas, micotoxinas, defensivos químicos e metais pesados entre outros); iv. o processo de extração (o tipo de extração utilizado para obter o extrato vegetal ou seus produtos); v. o solvente de extração [o tipo, a concentração e a quantidade de solvente são fatores críticos (exemplo, uma alteração no tipo de solvente usado para fazer um extrato resulta em um produto distinto)]; vi. a proporção de extração (relação matéria-prima/extrato vegetal): a variação no peso seco de uma matéria-prima vegetal usada na preparação de extrato vegetal pode afetar o perfil fitoquímico do produto, bem como a sua segurança e/ou eficácia (Valares Masa et al., 2016; Qi et al., 2017; Li et al., 2017; Ribes Moya et al., 2018; Huang et al., 2020). Portanto, diversos fatores podem afetar a equivalência (padronização) de extratos vegetais. Neste contexto, uma especificação é definida como uma lista de testes, referências e procedimentos analíticos ou físicos com limites de tolerância e intervalos, assim como outros critérios apropriados para os testes descritos. Exemplos: as especificações da instrução normativa N° 01/2020 (Brasil, 2020) e o documento de orientação referentes a compostos ativos botânicos utilizados para a proteção de plantas (Organisation for Economic Cooperation and Development, 2017).

As estratégias para garantir a qualidade das análises fitoquímicas podem ser estabelecidas pelas etapas: 1) seleção do material vegetal, 2) coleta, 3) processamento do material vegetal, 4) métodos para análise qualitativa e quantitativa de extratos vegetais (Brasil, 2006; Falkenberg et al., 2007; Correia Junior; Scheffer, 2013; Serviço Nacional de Aprendizagem Rural, 2017; Organisation for Economic Cooperation and Development, 2017) e os detalhes estão descritos a seguir.

1. Seleção do material vegetal

A seleção das espécies pode ser realizada de acordo com três abordagens (Maciel et al., 2002): i. randômica: a seleção consiste em uma escolha aleatória das espécies, sem um critério específico, com base na disponibilidade das mesmas; ii. quimiotaxonômica: a seleção baseia-se na ocorrência de determinada classe de metabólitos em uma família ou gênero; iii. etnofarmacológica: a seleção ocorre segundo o conhecimento popular e aplicações das plantas por determinados grupos sociais.

2. Coleta

A matéria-prima vegetal compreende a planta, a droga vegetal ou o derivado vegetal (Anvisa, 2014). A matéria-prima vegetal pode ser proveniente de processo extrativista, do cultivo de plantas ou de subprodutos agropecuários. Já a qualidade da matéria-prima visa garantir a eficácia (exemplo, comprovação dos efeitos no organismo alvo - praga), a segurança (ausência de efeitos tóxicos) e a excelência do produto final.

A coleta do material vegetal precisa ser realizada de forma criteriosa e cuidadosa, visando à obtenção de amostras de qualidade (evitar coletar amostras com ataque de pragas ou com diferenças na coloração, cortes, entre outros) e etapas estão descritas a seguir (Falkenberg, et al., 2007; Correia Junior; Scheffer, 2013; Serviço Nacional de Aprendizagem Rural, 2017; Organisation for Economic Cooperation and Development, 2017):

- i. Coletar cuidadosamente a amostra;
- ii. Etiquetar corretamente a amostra: contendo o número de identificação legível e com a etiqueta protegida de possíveis danos;
- iii. Registrar a parte da planta (exemplo, raiz, caule, folha, fruto, semente) utilizada e estágio fenológico;
- iv. Registrar a identificação do local e da forma de coleta: características do meio ambiente e local de coleta (exemplo, localização geográfica, tipo do solo, entre outros) que podem ser estabelecidos, pela agricultura de precisão [exemplo, uso do GPS (Global Positioning System)] e de tecnologias de sensoramento remoto.

v. Registrar a data e hora da coleta: a hora da coleta (ritmo circadiano da planta) e o período do ano influenciam diretamente a produção e o armazenamento dos metabólitos secundários;

vi. Registrar a quantidade, o estado de conservação e a alteração na amostra (diferença de coloração, ataque de alguma praga, entre outros).

As amostras precisam ser acondicionadas corretamente e o transporte precisa ser rápido para a realização do armazenamento ou processamento.

Adicionalmente, outras informações das amostras precisam ser registradas visando garantir a rastreabilidade, as análises futuras dos dados e para disponibilizar as informações. As informações a serem registradas, geralmente, são as seguintes:

i. Identificação taxonômica e descrição botânica da espécie vegetal, comprovada por especialista da área; a identificação deve ser realizada por análises das características anatômicas, morfológicas (definidas pela planta inteira; desde ramificação de raízes, forma do caule, forma e disposição das folhas e organização das flores, frutos e sementes, cor entre outros). Esses dados devem ser comparados com materiais de referência autenticados ou internos e/ou descrições técnicas autorizadas. Uma importante estratégia é o uso dos documentos de “Boas Práticas para Identificação de Plantas” e “Diretrizes de Boas Práticas Agrícolas” (Brasil, 2006; Correia Junior; Scheffer, 2013; Serviço Nacional de Aprendizagem Rural, 2017; Organisation for Economic Cooperation and Development, 2017). A Instrução Normativa número 15/2017 estabelece a necessidade de comprovação do depósito de exemplares da espécie botânica regional em herbários (Anvisa, 2017). Outra informação importante é a identificação da cultivar, quando necessário. Adicionalmente, análises químicas e genéticas podem contribuir para a identificação precisa da espécie.

ii. Cada espécie vegetal identificada deve ter uma monografia (documento contendo informações referentes a espécie vegetal ou drogas vegetais para ser apresentado aos órgãos de regulamentação mas também podem ser usados pelas empresas ou pelo público consumidor). A utilização de uma nova parte do vegetal, outro derivado vegetal ou novo método de prospecção e metodologia ainda não presente na monografia precisa resultar em alteração da mesma (Brasil, 2020).

iii. Registrar o acesso do material vegetal no Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN): atualmente, a legislação brasileira referente ao acesso ao Patrimônio Genético e/ou ao Conhecimento Tradicional associado e a respectiva repartição de benefícios está vinculada à Lei 13.123, conhecida por “Lei da Biodiversidade”. A regulamentação da lei, Decreto 8772, foi publicada em 11 de maio de 2016, estabelecendo a necessidade de um cadastro das atividades de pesquisa e desenvolvimento realizadas com a biodiversidade brasileira em um sistema eletrônico (disponibilizado em 6 de novembro de 2017) onde são realizados os cadastros e as notificações: o Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen).

iv. Realizar as atividades e o registro dos estudos agrônômicos (Brasil, 2020): os estudos visam tanto a produção da matéria-prima em escala e homogênea quanto a preservação da espécie, do meio ambiente e da biodiversidade; estudos como a otimização da produção (estudos edáficos climáticos, densidade de plantio, necessidades nutricionais, ocorrência de pragas entre outros) (Brasil, 2006; Falkenberg et al., 2007; Correia Junior; Scheffer, 2013; Serviço Nacional de Aprendizagem Rural, 2017; Organisation for Economic Cooperation and Development, 2017). Neste caso, é importante realizar as Boas Práticas Agrícolas que objetivam realizar uma agricultura sustentável do ponto de vista técnico, ambiental, social e econômico tais como: a) material de propagação (sementes, mudas, estacas entre outros) deve atender às exigências e/ou padrões estabelecidos relativos à pureza e germinação se estes estiverem estabelecidos nas Normas de Produção de Sementes e Mudas do Ministério da Agricultura; b) cultivo: solo e adubação; c) irrigação: aplicada de acordo com as necessidades de cada espécie em relação à quantidade e o sistema de irrigação e segundo as características do solo; d) manejo e proteção da cultura; e) colheita: registrar informações importantes (exemplo, a colheita no estágio de maior teor de princípios ativos; correto manuseio durante e após a colheita; beneficiamento adequado e armazenagem apropriada); f) beneficiamento primário (pré-limpeza e preparo das amostras); g) secagem; e) armazenamento e transporte; g) equipamento (devem ser fáceis de limpar para eliminar o risco de contaminação); h) documentação [exemplo, ficha agrônômica (dados do produtor, espécie vegetal, período de coleta, parte coletada, método de secagem, tipo de solo, data da última análise do solo, data e quantidade de calcário utilizado, tipo/quantidade/data de adubação, especificar se área é irrigada, ocorrência de pragas ou doenças, condições de armazenagem), Ficha de Uni-

dade de cultivo/colheita; Ficha Unidade de Pré-preparo; Ficha de Secagem e armazenamento; Ficha de Unidade de Secagem].

Os dados e informações podem ser armazenados em sistemas organizados e padronizados de Bases de Dados (exemplo, Sistema ALELO da Embrapa).

Para os ensaios a campo é necessário o Registro Especial Temporário (RET).

3. Processamento do material vegetal

Para garantir a qualidade das amostras é necessário a utilização de protocolos padronizados nas etapas do processamento de acordo com a matéria prima vegetal utilizada, bem como o registro destas informações para garantir que o processo seja rastreável e reproduzível (Falkenberg, et al., 2007; Correia Junior; Scheffer, 2013; Organisation for Economic Cooperation and Development, 2017). Neste caso, é importante seguir as metodologias internacionalmente reconhecidas, as quais podem ser conduzidas conforme os princípios de Boas Práticas de Laboratório (BPL).

O material vegetal pode resultar em um derivado vegetal (definido como um produto intermediário ou final, obtido a partir da planta fresca ou da droga vegetal, que contém o fitocomplexo, podendo ocorrer na forma de extrato, óleo fixo e volátil, cera, exsudato e outros e a sua obtenção depende do processamento a ser realizado). O processamento deve priorizar a preservação da integridade química dos princípios ativos e consequentemente garantir a ação desejada para o controle do organismo alvo (exemplo, praga).

Etapas do processamento e armazenamento:

i. Registro das informações de processamento e armazenamento: a) forma de processamento (exemplo, método de estabilização, condições de secagem, moagem); b) condições de armazenamento; c) forma de apresentação (exemplo, íntegra, rasurada, triturada, pulverizada); d) a relevância da variabilidade dos compostos para a caracterização do fitocomplexo (exemplo: se a espécie vegetal cultivada em determinada região/ época apresenta variação significativa de algum dos seus compostos em relação à mesma espécie vegetal cultivada em outra região/época; se as variações encontradas implicam em alteração da toxicidade do fitocomplexo);

ii. Processamento do material vegetal: a) protocolos de limpeza das amostras: retirada das partes desnecessárias, indesejadas e lavagem das amostras (visando diminuir a contaminação da matéria-prima vegetal considerada um problema de qualidade altamente crítico); b) protocolos de beneficiamento: precisam ser realizadas em construções limpas, bem arejadas e de uso exclusivo para esta finalidade visando proteger o material da exposição diretamente à luz do sol e da chuva. c) protocolos de secagem do material: as amostras na forma seca é a mais utilizada e segura devido a maior estabilidade química dos compostos e também por favorecer a proteção contra o crescimento microbiano. O processo consiste em retirar água do material e pode ser realizada utilizando-se estufas com circulação de ar (forma mais adequada para o preparo das amostras), a secagem ao ar livre (exposição ao sol ou sombra) é a estratégia menos indicada. Alguns fatores podem influenciar o tempo de secagem tais como o tipo de amostra vegetal, o tipo de solução extratora, o fluxo de ar, a temperatura e a umidade relativa do ar. As amostras obtidas devem ser devidamente acondicionadas. Adicionalmente, dependendo das características de alguns metabólitos é necessário o uso de amostras frescas ou congeladas sem passar pelo processo de secagem.

iii. Moagem: consiste na trituração mecânica do material vegetal (geralmente com auxílio de um almofariz ou triturador mecânico), visando um aumento da superfície de contato entre o material e o líquido extrator, para melhorar a eficiência da extração. O processo de moagem deve ser realizado, preferencialmente, no momento do preparo dos extratos seguindo um protocolo padronizado.

iv. Extração: O processo de extração consiste na utilização, principalmente de solventes, para retirar seletivamente os compostos que constituem um órgão/ tecido vegetal, com objetivo de obter uma solução extrativa com elevada quantidade de metabólitos (Sonaglio et al., 2007). Os extratos podem ser definidos como “preparações de consistência líquida, sólida ou intermediária, obtidas a partir de matéria-prima de origem vegetal” (Anvisa, 2013).

O processo de obtenção destes materiais é determinado de acordo com a finalidade do extrato tais como: a) triagem (*screening*) fitoquímica preliminar; b) isolamento e caracterização de determinados metabólitos (Falkenberg et al., 2007).

Segundo Ong (2004), Falkenberg et al. (2007) e Qi et al. (2017) os fatores que podem influenciar a composição dos extratos vegetais são:

a) propriedades do material vegetal (exemplos, parte da planta, origem, teor de água, grau de processamento); b) dimensões das partículas deste material: a compactação do material vegetal influencia diretamente a entrada do solvente e quanto mais compacto for o material menor deve ser a dimensão de suas partículas após o processo de moagem e maior é a superfície de contato entre a amostra e o solvente; c) propriedades do solvente: a seletividade do solvente determina a diversidade de metabólitos presentes no extrato que se baseia na polaridade dos compostos onde o conhecimento da polaridade dos compostos que se deseja extrair é uma importante estratégia para a escolha do solvente apropriado (Falkenberg et al., 2007). Por exemplo, para a extração de compostos apolares, são utilizados solventes como hexano e éter de petróleo, à medida que a polaridade dos metabólitos de interesse aumenta utilizam-se solventes como clorofórmio, diclorometano e acetato de etila, que apresentam polaridade intermediária. Já para a extração de compostos polares metanol, etanol e água são os líquidos extratores mais utilizados (Maciel et al., 2002; Falkenberg et al., 2007). Ademais, a seleção do solvente a ser utilizada está relacionada à eficiência do processo extrativo, dependente de fatores como, a seletividade, o pH, toxicidade, tipos de compostos que se deseja extrair, estabilidade destes, no solvente e na relação custo-benefício (Falkenberg et al., 2007).

v. Método de extração utilizado: fatores como temperatura e agitação do material durante a extração, variam entre os métodos e exercem influência na eficiência e no tempo de duração do processo. Por exemplo, no caso da temperatura, quanto maior o tempo de contato entre o solvente e o material maior é a extração. A temperatura exerce influência na solubilidade dos metabólitos onde o aumento da temperatura está relacionado a um aumento da solubilidade desses compostos no líquido extrator, mas, em contrapartida estão relacionadas a uma maior instabilidade dos metabólitos secundários, limitando suas aplicações. A agitação do material promove um aumento na eficiência e diminuição na duração do processo. Neste caso, os principais métodos utilizados para extração de metabólitos secundários são: a) maceração; b) digestão; c) maceração dinâmica; d) infusão; e) decocção; f) extração em refluxo; g) percolação; h) extração com aparelho de Soxhlet; i) sonicação, entre outros.

As escolhas dos parâmetros e métodos dependem da análise a ser realizada.

vi. Rendimento da extração dos compostos vegetais: é influenciado pelas condições utilizadas no processo de extração (Wongkittipong et al., 2004). Os fatores que influenciam o rendimento são: a escolha do solvente; a temperatura de extração; a ação mecânica (agitação e/ou pressão) e a matriz vegetal.

vii. Escalonamento: devido à necessidade de um contexto industrial, existe uma demanda para o desenvolvimento de métodos rápidos e de confiança para implementação das condições operacionais de extração. O ponto crítico é a obtenção de informações preliminares utilizando-se ensaios laboratoriais (determinação das condições ótimas de funcionamento) que visa assegurar a praticabilidade do processo e obter informação para validar o impacto econômico do processo em escala industrial. Neste caso, o uso de simuladores de processos podem resultar na redução do tempo envolvido para o desenvolvimento de processos que possibilitem a comparação entre processos alternativos (Rouff et al., 2001).

Os protocolos para a obtenção de extratos podem ser estabelecidos conforme as demandas (estratégias) estabelecidas pela equipe.

4. Métodos para análise qualitativa e quantitativa de extratos vegetais

As especificações da amostra vegetal, incluindo o composto ou a mistura de compostos, em termos de estrutura química e propriedades físico-químicas, são informações essenciais para avaliação de segurança e posterior gerenciamento de risco (Organization for Economic Cooperation and Development, 2017; Brasil, 2020).

Os métodos analíticos possibilitam a avaliação da qualidade dos produtos de origem vegetal e visam garantir a segurança e reprodutibilidade, pois permitem avaliar o teor de compostos ou grupo de compostos ativos e do perfil dos constituintes químicos alvo presentes na matéria-prima vegetal, produtos intermediários e produto final sendo necessário o estabelecimento de protocolos padronizados. A avaliação pode ocorrer de forma qualitativa, semi-quantitativa ou quantitativa e utiliza métodos baseados em cromatografia, espectrometria, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier ou espectroscopia de infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear (RMN) entre outros (Ong, 2004; Van Der Kooy et al., 2009; Li et al., 2017; Liu et al.,

2020). Neste caso, a metabolômica, a genômica e a proteômica combinadas com as análises estatísticas podem ser estratégias importantes para a identificação dos componentes químicos e dos marcadores fitoquímicos.

Os marcadores fitoquímicos são importantes para a caracterização qualitativa e quantitativa da matéria-prima vegetal (droga vegetal ou derivado vegetal) (Organisation for Economic Cooperation and Development, 2017; Brasil, 2020). O marcador fitoquímico é definido como substância (s) ou classe(s) de substância(s) utilizada(s) como referência no controle da qualidade, desde a droga vegetal até o produto formulado, e, quando pertinente, nos estudos de resíduo, tendo correlação, preferencialmente, com a atividade biológica. O marcador pode ser classificado como ativo ou analítico, dependendo da sua correlação ou não com a atividade biológica do fitocomplexo, respectivamente (Brasil,2020). O marcador fitoquímico precisa ser identificado e quantificado. Além disso, se faz necessário o estabelecimento de uma padronização do mesmo, o qual será utilizado para o estabelecimento do padrão de qualidade do extrato e/ou produto final (produto formulado) que possibilite analisar a reprodutibilidade e a qualidade dos lotes.

Assim, informações referentes aos marcadores fitoquímicos são essenciais tais como: a) identificação do composto (nome químico, número CAS quando disponível, massa molecular, fórmula molecular e fórmula estrutural); b) perfil cromatográfico da matéria-prima vegetal (identificação dos principais compostos do fitocomplexo); c) descrição dos métodos analíticos empregados para a identificação e quantificação dos marcadores fitoquímicos: perfil analítico característico [(exemplo, o perfil cromatográfico ou espectro de massas, espectro de infravermelho (contendo áreas e tempos de retenção dos picos cromatográficos, curvas de calibração, memórias de cálculo, pureza dos padrões)]; d) a quantificação dos marcadores fitoquímicos; e) descrição do controle de qualidade realizado em todas as etapas, incluindo os procedimentos e as metodologias utilizadas (Brasil,2020). Além da quantificação dos marcadores fitoquímicos e/ou princípios ativos, são necessárias outras análises físico-químicas em produtos vegetais (dependendo do de produto a ser registrado).

Estudos para avaliação do comportamento ambiental, caracterização toxicológica e ecotoxicológica

Para o registro do fitoquímico, caracterizado como agrotóxico ou afim, os estudos a serem realizados para o comportamento ambiental da matéria-prima vegetal são (Brasil,2020): i. fotólise; ii. hidrólise; iii. biodegradabilidade; iv. coeficiente de partição (n-octanol/água) sendo dispensado caso a substância seja solúvel em água.

Para os estudos toxicológicos requeridos para o ingrediente ativo e para o produto formulado referem-se aos seguintes testes: a) toxicidade (oral, cutânea, inalatória sendo usado as DL50 e/ou CL50 bem como doses repetidas em tempos diferentes, entre outros); b) corrosão/irritação (ocular aguda e cutânea aguda); c) sensibilização cutânea; d) mutações (mutação gênica em células bacterianas); e) danos cromossômicos (*in vitro* em células de mamíferos e *in vivo* em células somáticas); f) modo/mecanismo de ação. Neste contexto, dependendo dos resultados, podem ser solicitados testes condicionalmente requeridos tais como: a) mutação gênica *in vitro* em células de mamíferos; b) dano cromossômico *in vivo* em células somáticas; c) neurotoxicidade em roedores, tardia após exposição aguda, tardia doses repetidas 28 dias e do desenvolvimento); d) metabolismo em plantas (estudos referentes ao comportamento do produto na planta) (Brasil,2020).

Os estudos ecotoxicológicos necessários são: a) transformação do carbono; b) transformação do nitrogênio; c) minhocas [toxicidade aguda (CL50 14 dias)]; d) abelhas [toxicidade oral aguda (CL50 oral); toxicidade de contato (CL50 contato); toxicidade oral aguda (CL50 oral); toxicidade crônica]; e) aves [toxicidade oral aguda (DL50 oral)]; f) ratos [toxicidade oral aguda (DL50 oral)]; g) microcrustáceos [toxicidade aguda (EC50 48 horas)]; h) peixes [toxicidade aguda (CL50 96 horas)]; i) algas [toxicidade aguda (EC50 96 horas)] estudo condicional (Brasil, 2020).

Neste contexto, a falta de alguma informação referente aos estudos toxicológicos ou ecotoxicológicos do produto fitoquímico (solicitação de registro como agrotóxico ou afins) precisa ter uma justificativa técnica específica conforme orientações descritas na normativa 01/2020 (Brasil,2020).

Caracterização e qualificação do produto formulado e estudos físico-químicos

As formulações dos produtos tem como objetivo aumentar a eficiência e diminuir possíveis danos ao meio ambiente. Os princípios ativos encontram-se na concentração adequada (exemplo, para o controle do organismo alvo) e podem ser adicionadas substâncias coadjuvantes para que o produto final contenha algumas características de interesse relacionadas a manutenção das propriedades física, química e biológicas; preservação da estabilidade e da solubilidade; redução do número de aplicações; segurança no seu manuseio (influência na classificação toxicológica) e evitar a contaminação do produto (Organisation for Economic Cooperation and Development, 2017; Zuleta-Castro et al., 2017). As formulações precisam de um relatório de caracterização e qualificação do produto formulado e os estudos físico-químicos a serem utilizados são: i. descrição do estado físico, aspecto e cor; ii. descrição do processo de produção do produto formulado; iii. teor de ingredientes ativo na formulação; iv. teor do marcador fitoquímico; v. solubilidade, miscibilidade em água e em outros solventes; vi. potencial hidrogênio (pH); vii. Corrosividade; viii. volatilidade e pressão de vapor (Mapa,2020).

Registros

Os produtos naturais à base vegetal podem ser utilizados como um biofertilizante ou registrados como um produto fitoquímico para controle de pragas (Minuta de Instrução Normativa conjunta MAPA, IBAMA e ANVISA Minuta nº 01/2020, Art. 1º Estabelecer procedimentos a serem adotados para efeito de registro de produto fitoquímico que se caracterize como agrotóxico ou afim, cujo (s) ingrediente (s) alvo (s) seja (m) obtido (s), exclusivamente, de matéria-prima vegetal) para o controle de pragas) (Brasil, 2020). Neste caso, para esse tipo de registro podem ser solicitados: Relatório Técnico da Matéria-Prima Vegetal; Relatório de Caracterização e Qualificação do Produto Formulado e Estudos Físico-Químicos; MAPA (Estudos de Eficiência e Praticabilidade Agrônômica); ANVISA (Dossiê Toxicológico) e IBAMA (Dossiê ecotoxicológico).

Deste modo, o desenvolvimento de um produto a base vegetal padronizado agrega valor tecnológico pois, garante sua a qualidade e eficácia.

Sistema de qualidade

Segundo a minuta de instrução normativa conjunta MAPA, IBAMA e ANVISA (Nº 01/2020), que apresenta norma específica para fins de registro de produtos fitoquímicos que se caracterizem como agrotóxicos ou afim, os estudos toxicológicos e ecotoxicológicos requeridos para o ingrediente ativo e para o produto formulado recomenda-se seguir metodologias internacionalmente reconhecidas e podem ser conduzidos com princípios de Boas Práticas de Laboratório (BPL).

Boas Práticas de Laboratório é um sistema de qualidade que abrange o processo organizacional e as condições nas quais estudos não clínicos de segurança à saúde e ao meio ambiente são planejados, desenvolvidos, monitorados, registrados, arquivados e relatados (Inmetro, 2019).

Atualmente, o INMETRO, por meio da Coordenação Geral de Acreditação (CGCRE), é o órgão que faz o reconhecimento da conformidade dos estudos de um laboratório em BPL e para isso, utiliza documentos normativos provenientes da *Organization for Economic Cooperation and Development – OECD*. A habilitação do laboratório em BPL é realizada pela ANVISA (Anvisa, 2001). Desde março de 2011, o Brasil foi inserido de forma plena aos Atos do Conselho da OECD relacionados à Aceitação Mútua de Dados (MAD) para avaliação de compostos químicos. Essa inclusão permite que os testes realizados em laboratórios brasileiros reconhecidos pelo INMETRO/CGCRE sejam aceites nos países membros da OECD. Os benefícios da inclusão do Brasil incluem a dinamização no processo das exportações brasileiras, reduzindo assim as barreiras técnicas que os produtos de exportação brasileiros sofrem constantemente. Outro ganho diz respeito à possibilidade que os estudos realizados pelas empresas para fins de registro de determinados produtos sejam conduzidos em laboratórios brasileiros, dado que esses registros são aceites em países da Europa e nos EUA (Rodrigues et al., 2012).

Estudos de segurança relacionados à saúde humana e ao meio ambiente cobertos pelos Princípios das Boas Práticas de Laboratório incluem testes conduzidos em laboratórios, campo e casas de vegetação. Os princípios da

BPL compreendem requisitos destinados à (Inmetro, 2019):

i) Organização (responsabilidades da gerência, dos pesquisadores e do pessoal de estudo que trabalham nas instalações) sendo recomendado o programa 5S (Ribeiro, 1994);

ii) Programa de Garantia da Qualidade, que visa assegurar que os estudos executados estejam em conformidade com os princípios das BPLs;

iii) Instalações, que possam abranger todos os espaços necessários para a realização dos estudos e suas exigências;

iv) Equipamentos, materiais e reagentes, que apresentem descrição das especificações e condições necessárias para utilização desses itens nos estudos/pesquisas;

v) Sistema teste, que estabelece todas as condições exigidas de recebimento, estocagem e registro de quaisquer sistemas biológico, químico ou físico, ou uma combinação destes usados nos estudos/pesquisas;

vi) Item de teste e item de referência, que abrange os requisitos exigidos para o recebimento, manuseio, amostragem e caracterização do objeto de estudo e do padrão de referência;

vii) Procedimentos Operacionais Padrão, que trata da escrita, conferência e disponibilização de todos os protocolos envolvidos nos estudos/pesquisas;

viii) Execução do estudo, que descreve as exigências requeridas para o documento que define o objetivo do estudo e o desenho experimental para a condução do estudo/pesquisa;

ix) Relato dos resultados do estudo/pesquisa, que abrange todas as informações necessárias para o relatório final do estudo e para sua aprovação;

x) Armazenamento e Retenção de Registros e Materiais, que trata dos procedimentos de guarda de todos os registros relacionados ao estudo/pesquisa;

xi) Os dados e informações podem ser armazenados em sistemas organizados

e padronizados de Bases de Dados (exemplo, Sistema ALELO da Embrapa).

Apesar da complexidade dos princípios da BPL e de sua aplicação, todos os estudos toxicológicos e ecotoxicológicos de fitoquímicos realizados sob a orientação de um profissional serão reconhecidos como possuidores de alto padrão de qualidade, e por essa razão são frequentemente exigidos por órgãos fiscalizadores e reguladores, como o MAPA, ANVISA e IBAMA. A confiabilidade dos estudos efetuados sob as normas de BPL utilizados para registro de produtos fornece maior segurança, principalmente no que tange à análise de risco decorrente da utilização dos mesmos, proporcionando impactos positivos na preservação da saúde da população (Rodrigues et al., 2012). A implantação do sistema de qualidade poderia ser também realizada em laboratórios de vários segmentos com vistas não só aos ensaios toxicológicos e ecotoxicológicos, mas também na fase de obtenção à caracterização dos extratos vegetais, o que seria extremamente vantajoso para a garantia da precisão, rastreabilidade e exatidão dos resultados. Entretanto, sabendo-se que os custos destinados à implantação de um sistema de qualidade são bastante onerosos, um equilíbrio entre custos e benefícios teria que ser examinado cautelosamente.

Para início da implantação de um sistema de qualidade num laboratório de fitoquímica, algumas orientações serão sugeridas aqui, além das que já foram abordadas neste documento. Estas orientações foram baseadas nos seguintes documentos (Inmetro, 2019 e NBR ISO IEC 17025, 2017).

- Organizar e limpar o espaço de trabalho, com definição de espaços para recepção das amostras vegetais, armazenamento das amostras, preparo de extratos e análise dos extratos. Neste caso, é recomendado o programa 5S (Ribeiro, 1994);
- Promover treinamento de toda a equipe do laboratório em normas de segurança laboratorial e requisitos mínimos de qualidade;
- Utilizar reagentes com grau de pureza superior, com fornecedores que disponibilizem certificados de qualidade de seus produtos. Utilizar materiais de consumo (ponteiras, microtubos, tubos) limpos e esterilizados;

- Dispor de balança e pipetas com calibração em dia, ou então com verificação intermediária sendo realizada periodicamente. Usar tampões certificados para calibração dos pH-metros. Para todo equipamento ter ficha de identificação, previsão de manutenções, calibrações e relatórios de manutenções preventivas/corretivas realizadas (Inmetro, 2020);
- Utilizar amostras de referência ou padrões de referência para efetuar a validação dos métodos e para realizar o controle de qualidade dos métodos (Inmetro, 2019);
- Usufruir de métodos oficiais ou quando não for possível, utilizar métodos reconhecidos e publicados pela comunidade científica. Ao utilizar métodos não oficiais efetuar a validação. Se houver modificação do método oficial também realizar a validação (Inmetro, 2020);
- Determinar e efetuar os controles de qualidade nas etapas envolvendo desde a obtenção das amostras à análise do produto final;
- Estabelecer e seguir rigorosamente protocolos padronizados escritos ou procedimentos operacionais padrão (POP) durante as experimentações ou etapas críticas do processo;
- Efetuar o registro rigoroso em Ata ou em formulários próprios das observações, resultados brutos, não conformidades e eventos isolados que possam interferir nos resultados de todo o processo envolvendo os ensaios. Os dados armazenados no computador devem ser controlados, revisados pelo supervisor e possuir procedimento de guarda e segurança;
- Controlar as condições ambientais que possam interferir nos resultados (equipamentos, salas de cultivo, salas de experimentos, entre outros) em relação à temperatura, umidade, luz, radiação solar, entre outros. Geladeiras e freezers devem ter termômetros de máximo e mínimo para monitoramento de temperatura.
- Submeter o laboratório a auditorias internas para verificação do status do laboratório em relação ao cumprimento dos requisitos de qualidade.

- Deste modo, o sistema de qualidade é uma estratégia fundamental para o desenvolvimento biotecnológico e científico de derivados ou produtos a base vegetal para o controle sustentado de pragas e visa atender as demandas de qualidade, rastreabilidade e segurança.

Referências

ABNT. **NBR ISO/IEC 17025:2017**: requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <https://www.abntcatalogo.com.br/norma.aspx?ID=384244>. Acesso em: 10 dez. 2020.

AMOABENG, B. W.; GURR, G. M.; GITAU, C. W.; STEVENSON, P. C. Cost: benefit analysis of botanical insecticide use in Cabbage: implications for smallholder farmers in developing countries. **Crop Protection**, v. 57, p. 71-76, 2014. DOI: 10.1016/j.cropro.2013.11.019.

ANVISA. **Critérios para a habilitação de laboratórios segundo os princípios das Boas Práticas de Laboratório (BPL)**. Brasília, DF, 2001. (Procedimento GGLAS 02/BPL). Disponível em: http://qualidade.ipen.br/Doc_Externos/BPLANVISA.pdf. Acesso em: 12 dez. 2020.

ANVISA. **Instrução Normativa ANVISA Nº 15/ 2017**. Brasília, DF, 2017. Disponível em: https://www.in.gov.br/web/guest/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/20165602/do1-2017-04-17-instrucao-normativa-n-15-de-13-de-abril-de-2017-20165495. Acesso em 28/11/2020.

ANVISA. **Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 26, de 13 de maio de 2014**. Brasília, DF, 2014. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf. Acesso em: 12 dez. 2020.

ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 14, de 14 de março de 2013**. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Insumos Farmacêuticos Ativos de Origem Vegetal. Brasília: Diário Oficial da União, 2013.

AVOSEH, O.; OYEDEJI, O.; RUNGQU, P.; NKEH-CHUNGAG, B.; OYEDEJI, A. Cymbopogon species; ethnopharmacology, phytochemistry and the pharmacological importance. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 7438-7453, 2015. DOI: [10.3390/molecules20057438](https://doi.org/10.3390/molecules20057438).

BELGACEM, I.; LI DESTRI NICOSIA, M. G.; PANGALLO, S.; ABDELFATTAH, A.; BENUZZI, M.; AGOSTEO, G. E.; SCHENA, L. Pomegranate peel extracts as safe natural treatments to control plant diseases and increase the shelf-life and safety of fresh fruits and vegetables. **Plants**, v. 10, p. 1-13, 2021. DOI: 10.3390/plants10030453.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Boas práticas agrícolas (BPA) de plantas medicinais, aromáticas e condimentares**. Brasília, DF, 2006. 47 p. (Plantas medicinais & orientações gerais para o cultivo, I).

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Minuta de Instrução Normativa Conjunta MAPA, IBAMA e ANVISA: Minuta Nº 01/2020**. Brasília, DF, 2020. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/aceso-a-informacao/participacao-social/consultas_publicas/documentos/Minutafitoquimico.pdf. Acesso em: 22 dez. 2020.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. **Quarto relatório nacional para a Convenção sobre Diversidade Biológica Brasil**. Brasília, 2010.

BRUSOTTI, G.; CESARI, I.; DENTAMARO, A.; CACCIALANZA, G.; MASSOLINI, G. Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: the role of analysis in the ethnopharmacological approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 218-228, 2014. DOI: [10.1016/j.jpba.2013.03.007](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.03.007).

CLARKE, R.; CONNOLLY, L.; FRIZZELL, C.; ELLIOTT, C. T. Challenging conventional risk assessment with respect to human exposure to multiple food contaminants in food: a case study using maize. **Toxicology Letters**, v. 238, n. 1, p. 54-64, 2015. DOI: 10.1016/j.toxlet.2015.07.006.

CORRÊA JUNIOR, C.; SCHEFFER, M. C. **Boas Práticas Agrícolas (BPA) de plantas medicinais, aromáticas e condimentares**. Curitiba: EMATER, 2013. (Série informação técnica, n. 88).

DUKE, S. O.; DAYAN, F. E.; RIMANDO, A. M.; SCHRADER, K. K.; ALIOTTA, G.; OLIVA, A.; ROMAGNI, J. G. Chemicals from nature for weed management. **Weed Science**, v. 50, n. 2, p. 138-151, 2002. DOI: 10.1614/0043-1745(2002)050[0138:IPCFNFJ]2.0.CO;2.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacol Research**, v. 112, p. 4-29, 2016. DOI: 10.1016/j.phrs.2016.01.021.

FALKENBERG, M. de B.; SANTOS, R. I. dos; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS Editora, 2007. p. 229-245.

GHISLENI, D. D.; BRAGA, M.; KIKUCHI, I. S.; BRAȘOVEANU, M.; NEMȚANU, M. R.; DUA, K.; PINTO, T. The microbial quality aspects and decontamination approaches for the herbal medicinal plants and products: an in-depth review. **Current pharmaceutical design**, v. 22, n. 27, p. 4264-4287, 2016. DOI: [10.2174/1381612822666160623070829](https://doi.org/10.2174/1381612822666160623070829).

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éti-

cos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre, RS: UFRGS, 2007. v. 3, p. 15.

HERNÁNDEZ-CARLOS, B.; GAMBOA-ÂNGULO, M. Insecticidal and nematocidal contributions of mexican flora in the search for safer biopesticides. **Molecules**, v. 24, n. 5, p. 897, 2019. DOI: 10.3390/molecules24050897.

HIKAL, W. M.; BAESHEN, R. S.; SAID-AL-AHL, U. A. H.; UJHÁZY, K. Botanical insecticide as simple extractives for pest control. **Cogent Biology**, v. 3, n. 1, 2017. DOI: [10.1080/23312025.2017.1404274](https://doi.org/10.1080/23312025.2017.1404274).

HUANG, J.; RÜCKER, A.; SCHMIDT, A.; GLEIXNER, G.; GERSHENZON, J.; TRUMBORE, S.; HARTMANN, H. Production of constitutive and induced secondary metabolites is coordinated with growth and storage in Norway spruce saplings. **Tree physiology**, v. 40, n. 7, p. 928-942, 2020. DOI: [10.1093/treephys/tpaa040](https://doi.org/10.1093/treephys/tpaa040).

HUTTER, H. P.; KHAN, A. W.; LEMMERER, K.; WALLNER, P.; KUNDI, M.; MOSHAMMER, H. Cytotoxic and genotoxic effects of pesticide exposure in male coffee farmworkers of the Jarabacoa Region, Dominican Republic. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 8, p. 1641, 2018. DOI: [10.3390/ijerph15081641](https://doi.org/10.3390/ijerph15081641).

INMETRO. **DOQ-Cgcre 008**: orientação sobre validação de métodos analíticos. Rev. 09, junho 2020. Brasília, DF, 2020. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?tOrganismo=CalibEnsaio. Acesso em: 22 dez. 2020.

INMETRO. **DOQ-Cgcre-016**: orientações para a seleção e uso de materiais de referência com foco em ensaios químicos. Rev. 03, junho 2019. Brasília, DF, 2019. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?tOrganismo=CalibEnsaio. Acesso em: 22 dez. 2020.

INMETRO. **DOQ-Cgcre-036**: orientações sobre checagem intermediária das balanças. Rev. 03, julho 2020. Brasília, DF, 2020. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?tOrganismo=CalibEnsaio. Acesso em: 22 dez. 2020.

INMETRO. **Princípios das Boas Práticas de Laboratório – BPL**. Norma N° NIT-DICLA-035. Rev. 04, 16 p, 2019. Brasília, DF, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/inmetro/pt-br/assuntos/monitoramento-de-boas-praticas-de-laboratorio/documentos-aplicaveis>. Acesso em: 22 dez. 2020.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. C.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. **Sistemática vegetal**: um enfoque filogenético. 3. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2009. Tradução [André Olmos Simões](#), [Rodrigo B. Singer](#), [Rosana Farias Singer](#) e [Tatiana Teixeira de Souza](#)

[Chies.](#)

LENGAI, G. M. W.; MUTHOMI, J. W.; MBEGA, E. R. Phytochemical activity and role of botanical pesticides in pest management for sustainable agricultural crop production, **Scientific African**, v. 7, e00239, 2020. DOI: 10.1016/j.sciaf.2019.e00239.

LI, J.; ZHANG, J.; ZHAO, Y. L.; HUANG, H. Y.; WANG, Y. Z. Comprehensive quality assessment based specific chemical profiles for geographic and tissue variation in *Gentiana rigescens* using HPLC and FTIR method combined with principal component analysis. **Frontiers in Chemistry**, v. 5, p. 125, 2017. DOI: 10.3389/fchem.2017.00125.

LI, Y.; KONG, D.; FU, Y.; SUSSMAN, M. R.; WU, H. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 148, p 80-89, 2020. DOI: [10.1016/j.plaphy.2020.01.006](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.006).

LIU, L.; ZUO, Z. T.; XU, F. R.; WANG, Y. Z. Study on quality response to environmental factors and geographical traceability of wild *Gentiana rigescens* Franch. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 1128, 2020. DOI: 10.3389/fpls.2020.01128.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JÚNIOR, V. V. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quimica Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002. DOI: [10.1590/S0100-40422002000300016](https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000300016).

MONTIBUS, M.; VITRAC, X.; COMA, V.; LORON, A.; PINSON-GADAIS, L.; FERRER, N.; VERDAL-BONNIN, M-N.; GABASTON, J.; WAFFO-TÉGUO, P.; RICHARD-FORGET, F.; ATANASOVA, V. Screening of wood/forest and vine by-products as sources of new drugs for sustainable strategies to control *Fusarium graminearum* and the production of sycotoxins. **Molecules**, v. 26, p. 1-18, 2021. DOI: [10.3390/molecules26020405](https://doi.org/10.3390/molecules26020405).

MORAES, R. M.; CERDEIRA, A. L.; DUKE, S. O.; CANTRELL, C. L.; QUEIROZ, S. C. do N. de. Pesticidas naturais derivados de plantas: descoberta e usos. In: HALFELD-VIEIRA, B. A.; MARINHO-PRADO, J. S.; NECHET, K. de L.; MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. (Ed.). **Defensivos agrícolas naturais: uso e perspectivas**. Brasília, DF: Embrapa, 2016. p. 505-541.

MPUMI, N.; MTEI, K.; MACHUNDA, R.; NDAKIDEMI, P. A. The toxicity, persistence and mode of actions of selected botanical pesticides in Africa against insect pests in common beans, *P. vulgaris*: a review. **American Journal of Plant Sciences**, v. 7, p. 138-151, 2016. DOI: 10.4236/ajps.2016.71015.

NTALLI, N.; KASIOTIS, K. M.; BAIRA, E.; STAMATIS, C. L.; MACHERA, K. Nematicidal activity of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) assisted by phytochemical analysis. **Toxins (Basel)**, v. 12, n. 5, p. 319, 2020. DOI: 10.3390/toxins1205031.

ONG, E. S. Extraction methods and chemical standardization of botanicals and herbal preparations. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 812, n. 1-2, p. 23-33, 2004. DOI: 10.1016/j.jchromb.2004.07.041.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Guidance document on botanical active substances used in plant protection products**. Paris, 2017. (Series on Pesticides, n. 90). Disponível em: <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/31f295f3en.pdf?expires=1609030650&id=id&accname=quest&checksum=DA620E6839FA39EEF1884F-487D6FC0A1>. Acesso em: 05 dez. 2020.

QI, L. M.; ZHANG, J.; ZHAO, Y. L.; ZUO, Z. T.; JIN, H.; WANG, Y. Z. Quantitative and qualitative characterization of *Gentiana rigescens* Franch (Gentianaceae) on different parts and cultivations years by HPLC and FTIR spectroscopy. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2017, 3194146, 2017. DOI: 10.1155/2017/3194146.

RIBEIRO, H. **Programa 5S: a base para a qualidade total: um roteiro para uma implantação bem sucedida**. Salvador: Casa da Qualidade. 1994.

RIBES MOYA, A. M.; RAIGÓN, M. D.; MORENO PERIS, E.; FITA, A.; RODRÍGUEZ BURRUEZO, A. Response to organic cultivation of heirloom *Capsicum peppers*: variation in the level of bioactive compounds and effect of ripening. **PLoS One**, v. 13, n. 11, e0207888, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0207888.

ROCHA, T. L.; SOLL, C. B.; BOUGHTON, B. A.; SILVA, T. S.; OLDACH, K.; FIRMINO, A. A. P.; CALLAHAN, D. L.; SHEEDY, J.; SILVEIRA, E. R.; CARNEIRO, R. M. D. G.; SILVA, L. P.; POLEZ, V. L. P.; PELEGRINI, P. B.; BACIC, A.; GROSSI-DE-SA, M. F.; ROESSNER, U. Prospection and identification of nematotoxic compounds from *Canavalia ensiformis* seeds effective in the control of the root knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, 87-100, 2017. DOI: [10.1016/j.biori.2017.10.003](https://doi.org/10.1016/j.biori.2017.10.003).

RODRIGUES, N. R.; SOUZA, A. P. F. de; WATANABE, M. Implementação das normas das Boas Práticas Laboratoriais (BPL) no Laboratório de Análises de Resíduos da Universidade Estadual de Campinas. **Química Nova**, v. 35, n. 6, p. 1276-1280, 2012. DOI: [10.1590/S0100-40422012000600038](https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000600038).

ROUF, S. A.; DOUGLAS, S. A.; MOO-YOUNG, M.; SCHARER, J. M. Computer simulation for large scale bioprocess design. **Biochemical Engineering Journal**, v. 8, p. 229-234, 2001. DOI: [10.1016/S1369-703X\(01\)00112-7](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(01)00112-7).

SANTOS, P. E. Boas Práticas de Laboratório (BPL): uma questão de qualidade. **Revista Inter-tox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 3, n. 2, p. 37-39, 2010. DOI: [10.22280/revintervol3ed2.54](https://doi.org/10.22280/revintervol3ed2.54).

SASIDHARAN, S.; CHEN, Y.; SARAVANAN, D.; SUNDRAM, K. M.; YOGA LATHA, L. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. **African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2011.

SERVIÇO NACIONAL DE APRENDIZAGEM RURAL. **Plantas medicinais aromáticas e condimentares**: produção e beneficiamento. Brasília, DF, 2017. (Coleção SENAR, 213).

SMITH-SPANGLER, C.; BRANDEAU, M. L.; HUNTER, G. E.; BAVINGER, J. C.; PEARSON, M.; ESCHBACH, P. J.; SUNDARAM, V.; LIU, H.; SCHIRMER, P.; STAVE, C.; OLKIN, I.; BRAVATA, D. M. Are organic foods safer or healthier than conventional alternatives?: a systematic review. **Annals of Internal Medicine**, v. 157, n. 5, p. 348-366, 2012. DOI: [10.7326/0003-4819-157-5-201209040-00007](https://doi.org/10.7326/0003-4819-157-5-201209040-00007).

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.) **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2007. p. 289-326.

TEMBO, Y.; MKINDI, A. G.; MKENDA, P. A.; MPUMI, N.; MWANAUTA, R.; STEVENSON, P. C.; NDAKIDEMI, P. A.; BELMAIN, S. R. Pesticidal plant extracts improve yield and reduce insect pests on legume crops without harming beneficial arthropods. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1425, 2018. DOI: [10.3389/fpls.2018.01425](https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01425).

THOLL, D. Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 148, p. 63-106, 2015. DOI: [10.1007/10_2014_295](https://doi.org/10.1007/10_2014_295).

VALARES MASA, C.; SOSA DÍAZ, T.; ALÍAS GALLEGU, J. C.; CHAVES LOBÓN, N. Quantitative variation of flavonoids and diterpenes in leaves and stems of *Cistus ladanifer* L. at different ages. **Molecules (Basel)**, v. 21, n. 3, p. 275, 2016. DOI: [10.3390/molecules21030275](https://doi.org/10.3390/molecules21030275).

VAN DER KOOY, F.; MALTESE, F.; CHOI, Y. H.; KIM, H. K.; VERPOORTE, R. Quality control of herbal material and phytopharmaceuticals with MS and NMR based metabolic fingerprinting. **Planta Medica**, v. 75, n. 5, p. 763-775, 2009. DOI: 10.1055/s-0029-1185450.

VU, T. T.; KIM, H.; TRAN, V. K.; VU, H. D.; HOANG, T. X.; HAN, J. W.; CHOI, Y. H.; JANG, K. S.; CHOI, G. J.; KIM, J. C. Antibacterial activity of tannins isolated from *Sapium baccatum* extract and use for control of tomato bacterial wilt. **PLoS One**, v. 12, n. 7, e0181499, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0181499.

WONGKITTIPONG, R.; PRAT, L.; DAMRONGLERD, S.; GOURDON, C. Solid-liquid extraction of andrographolide from plants-experimental study, kinetic reaction and model. **Separation and Purification Technology**, v. 40, p. 147-154, 2004. DOI: [10.1016/j.seppur.2004.02.002](https://doi.org/10.1016/j.seppur.2004.02.002).

YAKHLEF, W.; ARHAB, R.; ROMERO, C.; BRENES, M.; CASTRO, A.; MEDINA, E. Phenolic composition and antimicrobial activity of Algerian olive products and by-products. **LWT - Food Science and Technology**, v. 93, p. 323-328, 2018. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.03.044.

YANG, S. P.; YUE, J. M. Discovery of structurally diverse and bioactive compounds from plant resources in China. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 33, n. 9, p. 1147-1158, 2012. DOI: [10.1038/aps.2012.105](https://doi.org/10.1038/aps.2012.105).

ZHANG, X.; ZHAN, G.; JIN, M.; ZHANG, H.; DANG, J.; ZHANG, Y.; GUO, Z.; ITO, Y. Botany, traditional use, phytochemistry, pharmacology, quality control, and authentication of *Radix Gentiana* Macrophyllae-A traditional medicine: a review. **Phytomedicine**, v. 46, p. 142-163, 2018. DOI: [0.1016/j.phymed.2018.04.020](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.04.020).

ZULETA-CASTRO, C.; RIOS, D.; HOYOS, R.; OROZCO-SÁNCHEZ, F. First formulation of a botanical active substance extracted from neem cell culture for controlling the armyworm. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 37, n. 40, 2017. DOI: 10.1007/s1.

