

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
CÂMPUS CENTRAL DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
MESTRADO *STRICTO SENSU* EM ENGENHARIA AGRÍCOLA

**EFEITOS DO EXTRATO DE FOLHAS E FLORES DE *Tithonia diversifolia*
(HEMSL.) A. GRAY (ASTERACEAE) SOBRE PRAGAS DE ARMAZENAMENTO**

Alessandra Soares Félix

ANÁPOLIS-GO

2022

ALESSANDRA SOARES FÉLIX

**EFEITOS DO EXTRATO DE FOLHAS E FLORES DE *Tithonia diversifolia*
(HEMSL.) A.GRAY (ASTERACEAE) SOBRE PRAGAS DE ARMAZENAMENTO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Goiás Campus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas, para obtenção do título de Mestre em Engenharia Agrícola.

Área de concentração CNPQ: Tecnologia Agrícola

Orientador: Prof. Dr. Ivano Alessandro Devilla

Coorientador: Prof^a. Dr^a. Joelma Abadia Marciano de Paula

Anápolis-GO
2022

ALESSANDRA SOARES FELIX

**EFEITOS DO EXTRATO DE FOLHAS E FLORES DE *Tithonia diversifolia*
(HEMSL.) A.GRAY (ASTERACEAE) SOBRE PRAGAS DE ARMAZENAMENTO**

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Goiás, Campus
Central de Ciências Exatas e Tecnológicas
para obtenção do título de Mestre em
Engenharia Agrícola.

Aprovado em:

Banca Examinadora



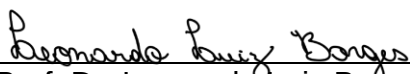
Prof. Dr. Ivano Alessandro Devilla – UEG

Orientador



Prof^a. Dr(a) Cristiane Maria Ascari Morgado

Membro



Prof. Dr. Leonardo Luiz Borges– UEG

Membro

*Para todos que já tiveram um momento de
fraqueza.
Não vai doer para sempre.
Então não deixe isso afetar o que há de melhor em você.*

AGRADECIMENTOS

Um trabalho de mestrado é uma longa viagem, que inclui uma trajetória permeada por inúmeros desafios, tristezas, incertezas, alegrias e muitos percalços pelo caminho, mas apesar do processo solitário a que qualquer investigador está destinado, reúne contributos de várias pessoas, indispensáveis para encontrar o melhor rumo em cada momento da caminhada. Trilhar este caminho só foi possível com o apoio, energia e força de várias pessoas, a quem dedico especialmente este projeto de vida. Especialmente aos meus orientadores, Professor Doutor Ivano Alessandro Devilla e Professora Doutora Joelma de Paula Marciano, que sempre acreditaram em mim, agradeço a orientação exemplar pautada por um elevado e rigoroso nível científico, um interesse permanente e fecundo, uma visão crítica e oportuna, um empenho inexcedível e saudavelmente exigente, os quais contribuíram para enriquecer, com grande dedicação, passo por passo, todas as etapas subjacentes ao trabalho realizado. À minha amiga de sempre, Mestranda Ana Maria Gomes, agradeço o apoio e motivação incondicional que ajudou a tornar este trabalho uma válida e agradável experiência de aprendizagem. Sou muito grata pela nossa amizade. Aos meus pais Roberto e Celia, minha irmã Lisandra Felix, meu sobrinho Jorge Miguel e meu cunhado João Eduardo, meus tios Maria e Itamar e minhas primas Lorranny e Danielle pelo acolhimento durante a etapa final dessa jornada. Sou imensamente grata pelos conselhos preciosos, pela elevada competência, total disponibilidade e encorajamento naqueles momentos cruciais desta difícil jornada, foram eles o meu grande estímulo nesta caminhada. Por fim, o meu profundo e sentido agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta dissertação, estimulando-me intelectual e emocionalmente, em especial a Doutoranda Anielly Monteiro, Doutorando Igor Romeiro e Mestre Pabline Gasparoti. Por fim, agradeço às agências de fomento UEG e CAPES, e também à profa. Daniela Aparecida Chagas de Paula, da Universidade Federal de Alfenas (MG) por fornecer a tagitinina C, e a Universidade Federal de Goiás pelas análises que foram realizadas.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análises físico-química do material vegetal de <i>T. diversifolia</i>	36
Tabela 2 - Caracterização fitoquímica do material vegetal <i>T. diversifolia</i>	39
Tabela 3 - Resultado das concentrações do Extrato Graxoso (EG).	46
Tabela 4 - Resultado das concentrações do Extrato Graxoso (EG).	46
Tabela 5 - Valores previstos de DL ₅₀ de <i>Acanthoscelides obtectus</i> utilizando EG.	48
Tabela 6 - Valores previstos de DL ₅₀ de <i>Acanthoscelides obtectus</i> , utilizando ES.....	50
Tabela 7 - Valores previstos de DL ₅₀ de <i>Sitophilus</i> spp, utilizando EG.	52
Tabela 8 - Valores previstos de DL ₅₀ de <i>Sitophilus</i> spp, utilizando ES.....	53
Tabela 9 - Valores previstos de DL ₅₀ de <i>Sitophilus</i> spp, utilizando ES.....	52
Tabela 10 - Mortalidade de <i>Acanthoscelides obtectus</i> , submetidos à extrato líquido, EG de <i>Tithonia Diversifolia</i>	62
Tabela 21- Mortalidade de <i>Acanthoscelides obtectus</i> , submetidos à extrato líquido, ES de <i>Tithonia diversifolia</i>	63
Tabela 32- Mortalidade de <i>Sitophilus</i> Spp, submetidos à extrato líquido, EG de <i>Tithonia diversifolia</i>	64
Tabela 43- Mortalidade de <i>Sitophilus</i> Spp submetidos à extrato líquido, ES de <i>Tithonia Diversifolia</i>	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estruturas químicas das tagitininas A, C e F.	16
Figura 2 - Adulto de <i>Acanthoscelides obtectus</i>	17
Figura 3 - Adulto de <i>Sitophilus</i> spp	19
Figura 4 - <i>Tithonia diversifolia</i> (HEMSL.) A.GRAY registrada no local de coleta, Agência Goiana de Assistência Técnica, Extensão Rural e Pesquisa Agropecuária Estação (Emater).(A) Visão geral da planta. (B) Flor. (C) Folhas.	23
Figura 5 - (A) Extração do material vegetal pulverizadas de <i>Tithonia diversifolia</i> , em banho de ultrassom; B) Rotaevaporação do extrato alcoólico de <i>Tithonia diversifolia</i>	28
Figura 6 - A) Extrato Graxoso do material vegetal de <i>Tithonia diversifolia</i> ; B) Extrato Sobrenadante do material vegetal de <i>Tithonia diversifolia</i>	28
Figura 7 - A) Concentrações da solução do Extrato Graxoso de <i>Tithonia diversifolia</i> . B) Concentrações da solução do Extrato Sobrenadante.....	33
Figura 8 - (A) Aplicação de diferentes dosagens de extrato, em sementes de milho; (B) Aplicação de diferentes dosagens de extrato, em sementes de feijão; (C) Sementes tratadas e com os insetos em estudo	34
Figura 9 - Cromatograma do EG (A), ES (B) de <i>Tithonia diversifolia</i> e do padrão tagitina C (C) obtido em CLAE-DAD (mAu x min), volume de injeção de 10.000 µl e UV λ = 254,4 nm	41
Figura 10 - Cromatograma Padrão de <i>Tithonia diversifolia</i> obtido em HPLC (mAu x min) 10.000 µl, UV λ = 254,4 nm.....	42
Figura 11 - Análise de regressão linear (Area x Concentrações) do padrão tagitina C.....	45
Figura 12 - Curva dose-resposta de <i>Acanthoscelides obtectus</i> submetidos ao Extrato Graxoso (EG) de <i>Tithonia diversifolia</i> , nas diferentes dosagens estudadas, com nível de confiança 95%, após 168 horas de exposição dos insetos.	47

Figura 13 - Curva dose-resposta de <i>Acanthoscelides obtectus</i> submetidos ao Extrato Sobrenadante (ES) de <i>Tithonia diversifolia</i> , nas diferentes dosagens estudadas, com nível de confiança 95%.....	49
Figura 14- Curva dose-resposta de <i>Sitophilus</i> spp. submetidos ao Extrato Sobrenadante (EG) de <i>Tithonia diversifolia</i> , nas diferentes dosagens estudadas, com nível de confiança 95%.	51
Figura 15- Curva dose-resposta de <i>Sitophilus</i> spp. submetidos ao Extrato Sobrenadante (ES) de <i>Tithonia diversifolia</i> , nas diferentes dosagens estudadas, com nível de confiança 95%.	52

LISTA DE ABREVIACÕES

EG: Extrato Graxoso

ES: Extrato Sobrenadante

RESUMO

Recentemente, a difusão de pragas/insetos que atacam os grãos cresceu significativamente, devido a resistência adquirida por sucessivas aplicações de inseticidas químicos, causando danos físicos e econômicos. Assim, é necessário a utilização de um biopesticida eficaz no controle de insetos. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a composição química e o potencial inseticida do extrato alcóolico de folhas e flores de *Tithonia diversifolia* sobre o controle das pragas *Acanthoscelides obtectus* e *Sitophilus* spp. O material vegetal (folhas e flores) foi coletado na EMATER em Goiás, a planta também foi coletada para a confecção de uma exsicata, que foi enviada para identificação e depósito no Herbário da Universidade Estadual de Goiás do Campus Central - Sede Anápolis (registro nº UEG-14411). O extrato de *Tithonia diversifolia* foi preparado, empregando o método de extração direta em solventes, com auxílio de ultrassom por 40 minutos e posteriormente o solvente foi evaporado sob pressão reduzida com o auxílio de um rotaevaporador à vácuo, sendo o processo realizado até obtenção de 1286ml. Para identificar as principais classes de metabólitos secundários presentes no material foi realizada uma triagem fitoquímica, resultando na detecção de alcaloides, taninos, flavonoides, cumarinas, terpenos e saponinas. O extrato do material vegetal de *Tithonia diversifolia* foram avaliados quanto a sua composição química por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Um bioensaio foi realizado para avaliar a mortalidade dos insetos em seis concentrações (0; 10; 100; 350; 700 e 1000 mL L⁻¹); (0; 300; 650; 1000; 1350, e 1700 mL L⁻¹) dos extratos graxo e sobrenadante, respectivamente. Para testar os extratos vegetais no controle dos insetos, cada unidade experimental constava 10 indivíduos adultos não sexados. A cada 24 horas do controle era feito à contagem do número de insetos mortos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em um esquema fatorial 6 x 7, para os dois insetos, sendo os fatores concentrações e períodos de avaliação, com três repetições. Os resultados obtidos permitiram concluir que, o extrato graxo na concentração de 1000 mg L⁻¹ apresentou mortalidade de 90% dos insetos de *Acanthoscelides obtectus*. O extrato sobrenadante na concentração de 1000 mg L⁻¹ apresentou mortalidade de 70% dos insetos de *Acanthoscelides obtectus*. O extrato

graxoso na concentração de 1700 mg L⁻¹ apresentou mortalidade de 50% dos insetos de *Sitophilus* sp e, na concentração de 1700 mg L⁻¹, apresentou mortalidade de 40% dos insetos de *Sitophilus* spp.

Palavras-chave: *Acanthoscelides obtectus*. *Sitophilus* spp. Tagitinina c.
Bioinsumos

ABSTRACT

Recently, the spread of pests/insects that attack grains has grown significantly, due to the resistance acquired by successive applications of chemical insecticides, causing physical and economic damage. Thus, it is necessary to use an effective biopesticide to control insects. Therefore, the objective of this study was to evaluate the chemical composition and the insecticidal potential of the alcoholic extract of leaves and flowers of *Tithonia diversifolia* on the control of the pests *Acanthoscelides obtectus* and *Sitophilus* spp. The plant material (leaves and flowers) was collected at EMATER-GO, the plant was also collected for the manufacture of an exsiccate, which was sent for identification and deposit in the Herbarium of the Universidade Estadual de Goiás do Campus Central - Sede Anápolis (registration no. UEG-14411). The *Tithonia diversifolia* extract was prepared using the method of direct extraction in solvents, with the aid of ultrasound for 40 minutes and then the solvent was evaporated under reduced pressure with the aid of a vacuum rotary evaporator, the process being carried out until obtaining 1286 ml. To identify the main classes of secondary metabolites present in the material, a phytochemical screening was performed, resulting in the detection of alkaloids, tannins, flavonoids, coumarins, terpenes and saponins. The plant material extract of *Tithonia diversifolia* was evaluated for its chemical composition by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). A bioassay was performed to evaluate insect mortality at six concentrations (0; 10; 100; 350; 700 and 1000 mL L⁻¹; (0; 300; 650; 1000; 1350, and 1700 mL L⁻¹) of fatty extracts and supernatant respectively. To test plant extracts for insect control, each experimental unit consisted of 10 non-sexed adult individuals. Every 24 hours of control, the number of dead insects was counted. The experimental design was completely randomized, in a 6 x 7 factorial scheme, for the two insects, being the factors concentrations and evaluation periods, with three replications. The results obtained allowed us to conclude that, the Fatty Extract at a concentration of 1000 mg L⁻¹, had a mortality of 90% of *Acanthoscelides obtectus* insects, Supernatant Extract at a concentration of 1000 mg L⁻¹, presented a mortality of 70% of *Acanthoscelides* insects obtained. Fatty Extract at a concentration of 1700 mg L⁻¹, showed a mortality of 50% of *Sitophilus* spp insects

and, at a concentration of 1700 mg L⁻¹, it presented a mortality of 40% of *Sitophilus* spp.

Key-words: *Acanthoscelides obtectus*. *Sitophilus* spp. tagitinine c. bioinputs.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vi
RESUMO	x
ABSTRAT	xii
1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
3.1 <i>Tithonia diversifolia</i> (HELMS) A. GRAY	14
3.2 LACTONAS SESQUITERPÊNICAS (LSTS) UM SESQUITERPENOS USUALMENTE DESCRITO COMO COMPOSTO DOMINANTE DAS FOLHAS DA <i>Tithonia diversifolia</i>	15
3.3 <i>Acanthoscelides obtectus</i>	16
3.4 <i>Sitophilus</i> spp.....	18
3.5 CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS	19
3.6 TOXICIDADE	21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 Obtenção dos materiais vegetais	22
4.2 Planejamento experimental	23
4.4 CARACTERIZAÇÃO FARMACOGNÓSTICA DO MATERIAL VEGETAL	24
4.4.1 Determinação da granulometria dos pós	24
4.4.2 Determinação de cinzas totais	24
4.4.3 Determinação de cinzas insolúveis em ácido	25
4.4.4 Perda por dessecação	25
4.4.6 Determinação dos constituintes do óleo essencial por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)	26
4.4.7 Triagem fitoquímica	27
4.5 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO	27

4.6	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS EXTRATOS GRAXOSO (EG) E SOBRENADANTE (ES)	29
4.6.1	Rendimento da extração	29
4.6.2	Viscosidade	29
4.6.3	Determinação da densidade relativa	30
4.6.4	Determinação de tagitinina C	30
4.6.5	Determinação de lipídeos	32
4.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA	32
4.7.1	Cultivo de insetos-praga	32
4.7.2	Dosagens utilizadas	32
4.7.3	Determinação do índice de mortalidade de <i>Acanthoscelides obtectus</i> e de <i>Sitophilus</i> spp.	33
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO MATERIAL VEGETAL	36
5.2	RENDIMENTO DE ÓLEOS ESSENCIAIS	37
5.3	TRIAGEM FITOQUÍMICA	38
5.4	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS EXTRATOS EG E ES	40
5.4.1	RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO	40
5.4.2	DETERMINAÇÃO DA VISCOSIDADE	40
5.3.4	DETERMINAÇÃO DE LIPÍDEOS	41
5.4	QUANTIFICAÇÃO DA TAGITININA C POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO (HPLC) EM FASE MÓVEL	41
5.4	QUANTIFICAÇÃO DE TAGITININA C NOS EXTRATOS	45
5.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA	46
6	CONCLUSÕES	55
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
	ANEXO	62

1. INTRODUÇÃO

Espécies vegetais da família Asteraceae apresentam diversos constituintes químicos como poliacetilenos, lactonas sesquiterpênicas, óleos essenciais, terpenoides, monoterpenos, alcaloides, látex com triterpenos, saponinas e flavonoides, fazendo com que as espécies apresentem grande potencial químico e biológico, sendo responsável pela importância econômica da família, tanto na medicina tradicional como na produção de biopesticidas (EVANS, 2002). Nesse sentido, a espécie *Tithonia diversifolia* (HEMSL.) A.GRAY (Asteraceae) se sobressai por suas propriedades inseticidas relacionadas principalmente na presença de metabólitos secundários como lactonas sesquiterpênicas e flavonoides, que são encontrados em suas folhas e flores, além de altas concentrações de fósforo e potássio em sua biomassa (SCHUSTER *et al.*, 1992).

Extratos vegetais que apresentam atividade inseticida representam uma alternativa considerável de controle de insetos-praga tanto em áreas de grandes extensões, como em áreas de pequeno cultivo (DEQUECH *et al.*, 2008). Adedire e Akinneye (2004) em seu trabalho avaliaram a atividade biológica da *Tithonia diversifolia* sobre a praga de armazenamento *Sitophilus* spp, citando Kou & Lin (1999) em que isolaram o sesquiterpeno de dinorxantano denominado diversifolida [4,15-dinor-3-hidroxi-1(5)-xanteno12,8-olide], uma nova cromona e quatro outros compostos conhecidos da planta *Tithonia diversifolia*. Segundo os autores alguns desses compostos são responsáveis pela atividade inseticida da espécie.

Insetos-praga que atacam vários estágios de desenvolvimento da cultura no campo e durante o armazenamento dos grãos representam um grande desafio nos processos de armazenamento. Inclui-se dentre essas pragas o caruncho do feijão, denominado *Acanthoscelides obtectus* que é um dos principais agentes causadores de perdas durante o armazenamento, tanto quantitativas quanto qualitativas nos grãos (GALLO *et al.*, 2002).

Em geral, os insetos apresentam elevadas diversidades e densidades populacionais, em especial para os grãos de milho, e os insetos que ressaltam por

sua ação direta no grão, ou seja, por sua capacidade de danificar os grãos ainda sadios se destacam os do gênero *Sitophilus* spp. Estes insetos são pragas primárias consideradas de maior importância para os grãos armazenados no Brasil por apresentarem infestação cruzada, serem pragas de profundidade, terem elevado potencial biótico, e tanto na fase larval quanto na fase adulta causarem danos aos grãos (COPATTI; MARCON; MACHADO, 2013).

Sitophilus spp e *Acanthoscelides obtectus* são duas pragas primárias internas, visto que têm capacidade para atacarem o grão ainda sadio alimentando-se de todo o interior do grão, além de possibilitarem a instalação de outros agentes de deterioração completando seu ciclo de vida no interior do grão. Dispõem também à infestação cruzada, ou seja, mesmo no campo pode haver a ocorrência dos mesmos (JUNIOR, 2011). Além disso, apresentam elevado potencial de reprodução e detêm muitos hospedeiros como o feijão, o arroz, o milho e o trigo, sendo adaptados tanto para viverem e reproduzirem em regiões tropicais como nas temperadas em condições de baixa umidade (LORINI et al., 2015).

Nesse contexto, extratos obtidos da planta *Tithonia diversifolia* podem ser alternativas viáveis no controle de insetos e demais pragas de armazenamento. Considerando que as principais perdas quantitativas e qualitativas na pós-colheita de grãos são geradas por pragas e insetos de armazenamento, extratos vegetais surgem como opção que pode ser associada a outras práticas de controle de pragas visando reduzir o crescimento dessas populações (MIRANDA, 2015). Essas exigências crescem à medida que os produtores preferem optar por tratamentos livres de agrotóxicos, além da ocorrência de resistência de pragas a inseticidas e principalmente pela eficiência e praticidade na aplicação (ALMEIDA et al., 2013).

O emprego de inseticidas sintéticos vem sendo o principal método de controle da praga. Apesar disso, o uso indiscriminado e usualmente de forma incorreta desses princípios ativos tem aumentado o número de aplicações e diminuído suas eficiências principalmente devido ao desenvolvimento de populações de insetos resistentes (FREITAS; PINHEIRO, 2010). Tal uso acentua o problema de contaminação do ambiente e produtos agrícolas (MOHAPATRA; RAO, 2005).

A FAO (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação) publicou um relatório mostrando que o Brasil no ano de 2013 consumiu mais de 10 bilhões de reais com a compra de inseticidas. Entre os anos de 2012 e 2014 a média anual de agrotóxicos no Brasil totalizaram mais de 877.000 toneladas, de acordo com o atlas Geografia do Uso de Agrotóxicos no Brasil e conexões com a União Europeia de 2017. Sendo que desse total, 334.000 toneladas no centro-oeste, 244.000 no Sul, 188.000 no Sudeste, 101.000 no Nordeste, e 28.000 no Norte. Em 2017, o Brasil passou a ser o maior consumidor de agrotóxicos do mundo consumindo cerca de 550.000 toneladas por ano (GRIGORI, 2019).

Extratos de plantas estão sendo cada vez mais estudados, e em grande parte já com efeito comprovado para o controle de pragas. A atividade inseticida de extratos de plantas pode ser manifestada por meio da mortalidade direta, repelência, esterilidade, interferência no desenvolvimento e modificação no comportamento dos artrópodes (LIMA; MOREIRA; ARAGÃO, 2013).

Os bioensaios são métodos de pesquisa importantes relacionados a interação inseto-planta. São utilizados principalmente para avaliar o efeito das substâncias químicas visando o controle de insetos, além de determinar o modo de ação e a dosagem mais eficaz que possa causar a morte de 50% da população (DL_{50}) de determinado inseto-praga, além de identificar a resistência de insetos aos produtos que são submetidos (CORRÊA; VIEIRA, 2007).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a composição química e o potencial inseticida do extrato alcóolico de *Tithonia diversifolia* sobre o controle das pragas *Acanthoscelides obtectus* e *Sitophilus* spp.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar as pragas *Acanthoscelides obtectus* e *Sitophilus* spp obtidas a partir de grãos infestados para posteriores aplicações dos extratos.
- Obter o extrato vegetal e suas frações a partir do material vegetal de *Tithonia diversifolia* extraídas com álcool, como alternativa ao uso de inseticidas sintéticos para tratar grãos armazenados contra o ataque e danos de *Acanthoscelides obtectus* e *Sitophilus* spp.
- Realizar a triagem fitoquímica a fim de identificar as principais classes de compostos presentes no material vegetal *Tithonia diversifolia*.
- Extrair o óleo essencial do material vegetal e identificar os seus principais compostos por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas.
- Quantificar a lactona sequitepênica tagitinina C nos extratos de *Tithonia diversifolia*.
- Determinar o índice de mortalidade das pragas *Acanthoscelides obtectus* e *Sitophilus* spp. submetidas à diferentes concentrações dos extratos de *Tithonia diversifolia*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Tithonia diversifolia* (HELMS) A. GRAY

Asteraceae é a maior família das angiospermas, atingindo mais de 25.000 espécies pertencentes a 1.600 gêneros habitados em 17 tribos e três subfamílias. No Brasil a família está representada por aproximadamente 196 gêneros e aproximadamente 1.900 espécies (BREMER, 1994).

Todas essas tribos estão retratadas no Brasil principalmente por espécies nativas e por algumas que foram inseridas, devido à grande capacidade adaptativa dos seus representantes. A família é encontrada em várias formações vegetais predominando nas formações campestres do sul do país, onde há uma grande diversidade de espécies (MATZENBACHER, 2003).

A espécie *Tithonia diversifolia* pertence à Divisão: Sphermatophyta, à Classe: Dicotiledoneae, à Subclasse: Metaclamídeas, Ordem: Campanulada, Família: Asteraceae, ao Gênero: *Tithonia* e à Espécie: *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (SILVA, 2004). A planta é um arbusto perene que pode crescer de 2 à 5 m de altura, sendo conhecida também como margaridão, mão-de-Deus, botão de ouro, unha de gavião ou girassol mexicano. No Brasil a planta pode ser encontrada em todo o território, embora seja originária do México está distribuída nas Américas Central e do Sul, na Ásia e África. (ALMEIDA, 2018).

De acordo com Silva (2004), a análise da composição química do pó da folha da *Tithonia diversifolia* em porcentagem é: Umidade 11.88%, Proteína crua 22.07%, Extrato etéreo 8.12%, Fibra crua 6.74%, Cinza 12.47%, Carboidratos (por diferença) 38.72%, Cálcio¹ 390.60, Fósforo¹ 444.85, Vitamina A¹ 0.299, Taninos¹ 83.33, Carotenos² 130.94, Xantofilas² 333.93, Xantofilas hidroxiladas² 161.60 ((1): mg/100g de pó;(2) µg/100g de pó).

3.2 LACTONAS SESQUITERPÊNICAS (LSTS): UM SESQUITERPENÓ USUALMENTE DESCRITO COMO COMPOSTO DOMINANTE DAS FOLHAS DA *Tithonia diversifolia*

Os principais constituintes químicos de *Tithonia diversifolia* pertencem a classe das Lactonas Sesquiterpênicas (LSTs) e flavonoides, que são metabólitos secundários armazenados, assim como as tagitininas presentes na parte aérea da planta. Sendo as LSTs de coloração incolor, sabor amargo e levemente estável, apresentando elevada importância biológica e taxonômica. Apesar de muitas serem tóxicas, as LSTs encontradas em *Tithonia diversifolia* são consideradas medicinais (ROCHA, 2009).

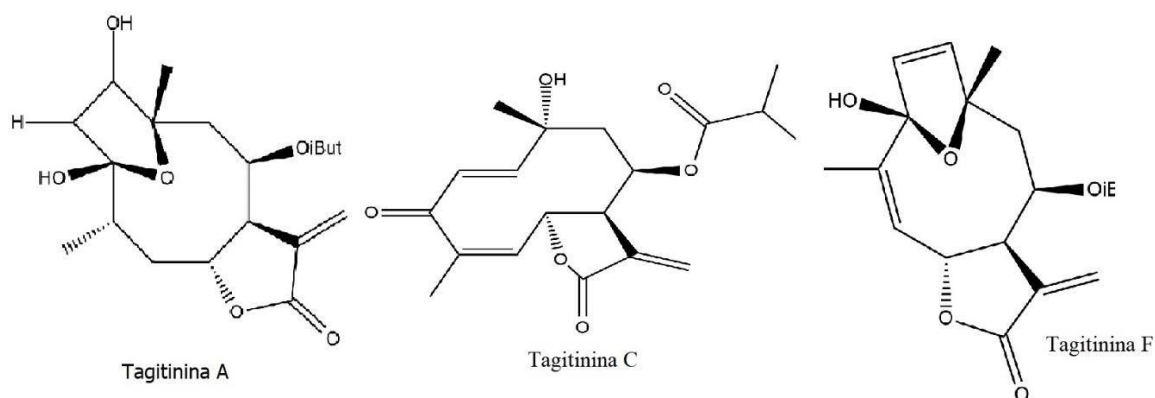
Dentre os compostos isolados de *Tithonia diversifolia*, a tagitinina é a mais estudada devido ao seu amplo espectro farmacológico, sendo a mesma isolada de uma espécie identificada como *Tithonia tagitiflora* que proporcionou a obtenção de germacranolídeos com nome de Tagitininas A-F (Figura 1), sendo a A, C e F as mais estudadas (BROERING, 2019).

Os metabólitos secundários apresentam-se como estruturas complexas, seu peso molecular pode ser de baixo a alto, e podem ser polares ou apolares e ocorrem, em pequenas quantidades. São considerados metabólitos secundários de destaque, para animais e plantas, os alcalóides, os terpenóides, os fenóis, os óleos essenciais, os taninos, os flavonoides e as saponinas (RODRIGUES *et al.*, 2016). A tagitinina C, lactona sesquiterpênica isolada de *Tithonia diversifolia* em estudo está localizada principalmente nos tricomas glandulares na face adaxial das folhas (MIRANDA, 2015).

Na área agrícola, lactonas sesquiterpênicas apresentam também propriedades benéficas, porém alguns metabólitos secundários podem influenciar na germinação e crescimento de algumas espécies de plantas apesar de que a natureza e extensão dos efeitos produzidos dependam de diversos fatores, e entre eles a estrutura da lactona testada, sua concentração e a espécie na qual ela irá atuar (PICMAN, 1986). Esse efeito é chamado de alelopatia e pode ser de grande importância na agricultura para o controle de plantas daninhas, desde que se estabeleça uma correta associação

entre as espécies produtoras de substâncias alelopáticas e as espécies cultivadas (BARUAH *et al.*, 1994).

Figura 1- Estruturas químicas das tagitininas A, C e F.



Fonte: Autor (2022), com auxílio de *ChemDraw Pro*

3.3 *Acanthoscelides obtectus*

Acanthoscelides obtectus, (Figura 2), medem de 2 a 4mm de comprimento, possuem coloração pardo-escuros com pequenas pontuações avermelhadas no abdômen pernas e antenas, sendo os olhos perfeitamente emarginados e os fêmures posteriores apresentam um largo espinho ventral, sendo as fêmeas maiores que os machos. Os ovos podem ser colocados nas vagens ainda no campo ou diretamente nos grãos e sementes armazenadas, cada fêmea deposita de 40 a 60 ovos e a eclosão ocorre em 3 a 9 dias (LORINI *et al.*, 2015).

O desenvolvimento larval compreende 4 instares e dura de 12 a 150 dias de acordo com as condições ambientais. O ciclo de vida pode ser completado em apenas 23 dias e é por isso que a espécie tem um grande potencial de desenvolvimento. Condições ótimas de desenvolvimento são de aproximadamente 30 °C e 70% de UR, sendo o desenvolvimento mais lento abaixo de 18 °C (PEREIRA, 1993).

Normalmente, a fêmea deposita seus ovos entre vagens ainda no campo ou em grãos expostos em seu armazenamento. Após a eclosão as larvas transpassam para esses grãos através do tegumento onde desfrutam dos cotilédones, onde são

realizadas as câmaras. Em seu período larval eles se nutrem constantemente, e no fim do seu último instar empupam no interior de câmaras com auxílio de suas mandíbulas dirigidas a janela de saída dos adultos de *Acanthoscelides obtectus*. Assim, permanecem por vários dias no interior dessas câmaras, até que impulsionam a janela com cabeça e pernas, ocorrendo a emergência para acasalar e novamente recomeçar o ciclo reprodutivo (BALDIN, 2001).

A espécie pode causar prejuízos consideráveis aos grãos, como perda de massa, redução da qualidade nutricional e do poder germinativo das sementes, além da introdução de contaminantes secundários como fungos e micotoxinas. Diversas infestações iniciam ainda no campo, assim as larvas alimentam-se dos grãos ainda em maturação. Em razão do seu rápido desenvolvimento há um alto potencial para o seu crescimento populacional. (PEREIRA, 1993).

Segundo GALLO et al. (1970), o período de postura nos armazéns chega a ser de sete dias, e mais de 70% dos ovos são postos nos quatro primeiros dias. A postura média por fêmea pode atingir 60 ovos. Adultos de *Acanthoscelides obtectus* apresentam forma ovoide, de dois a quatro milímetros de comprimento e coloração pardos escura com pontuações avermelhadas na parte vertical do abdome e no pigídio, pernas e antenas. As larvas são de coloração branco-leitosa com três a quatro milímetro de comprimento e as pupas são da mesma cor passando a marrom quando próximas a emergências dos adultos (GALLO et al., 2002).

Para Halstead (1963), a distinção entre os sexos de *Acanthoscelides obtectus* se dá pelo tamanho, sendo que a fêmea é maior, além disso sua curvatura de extremidade do pigídio é menos realçada, e a abertura anal é terminal. Quanto aos machos, sua inclinação é mais vertical que nas fêmeas e sua abertura anal é ventral.

Figura 2 - Adulto de *Acanthoscelides obtectus*



Fonte: Autor (2022)

3.4 *Sitophilus* spp

É uma praga primária interna de suma importância pois pode apresentar infestação cruzada, ou seja, infestar grãos no campo e no armazém, onde penetra na massa de grãos. Além de apresentar elevado potencial de reprodução, sendo os principais hospedeiros do trigo, milho, arroz, cevada e tritcale. Mesmo em sua fase larval já são considerados prejudiciais e atacam grãos e sementes. A postura é feita nos grãos e sementes, as larvas após se desenvolverem empupam e se transformam em adultos ainda no grão ou semente, sendo alguns dos danos causados, a redução e qualidade do grão (LORINI, 2008).

Os adultos de *Sitophilus* spp (Figura 3), são gorgulhos de 2,0 a 3,5 mm de comprimento, de coloração castanho-escuro, com manchas mais claras nos élitros (asas anteriores) visíveis logo após a emergência. O período de oviposição é de 104 dias, e o número médio de ovos por fêmea é de 282. A longevidade das fêmeas é de 140 dias. O período de incubação oscila entre 3 e 6 dias, e o ciclo de ovo até a emergência de adultos é de 34 dias (LORINI, 2008).

A postura é realizada de forma individual nos grãos, por orifícios cavados pelas fêmeas com auxílio de sua mandíbula, assim o ovipositor excreta uma substância com aspecto gelatinoso, usado para fechar a cavidade (COTTON & WILBUR, 1974; EVANS, 1981), ficando os orifícios de postura com difícil visualização. Feita a eclosão,

a larva se alimenta do interior dos grãos, completando assim o seu estágio larval (quatro instares) que é realizado dentro do grão, empupando a seguir e culminando com a emergência do adulto do seu interior (LOECK, 2002).

Segundo Mound (1989) e Booth *et al.* (1990), conforme citado por Antune e Dionell (2010) as larvas são ápodes, apresentando coloração amarelo clara e cabeça marrom-escura, e exibem perfil dorsal semicircular, sendo seu perfil ventral retilíneo e os três primeiros segmentos abdominais com duas pregas ou sulcos transversais no dorso, e as pupas são brancas. O seu comprimento varia de 2 a 3 mm, sendo a pupa de cor branca leitosa.

Figura 3 - Adulto de *Sitophilus* spp.



Fonte: Autor (2022)

3.5 CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS

O emprego de inseticidas sintéticos vem sendo o principal método de controle de pragas agrícolas, apesar disso o uso indiscriminado e usualmente de forma incorreta desses princípios ativos tem aumentado o número de aplicações e diminuído suas eficiências, principalmente devido ao desenvolvimento de populações de insetos resistentes (BHISASHI, 2002). Tal uso acentua o problema de contaminação do ambiente e produtos agrícolas (MOHAPATRA & RAO, 2005).

O uso de plantas inseticidas para o controle de pragas não é recente, principalmente em países tropicais antes mesmo da introdução dos inseticidas sintéticos. Alguns dos primeiros inseticidas à base de plantas foram a nicotina, extraída do fumo (*Nicotiana tabacum*), e a rotenona extraída de *Derris* spp. e *Lonchocarpus* spp. Com o surgimento dos inseticidas sintéticos os mesmos deixaram de ser comercializados e só depois de alguns anos o uso de extratos vegetais no controle de pragas foi retomado. Esse retorno deve-se à crescente necessidade de novos compostos para o controle de pragas que sejam mais amigáveis ao ambiente, deixem menos resíduos nos alimentos e auxiliem no controle de insetos mais resistentes, sendo essas as características presentes em inseticidas vegetais (GALLO *et al.*, 2002).

Extratos de plantas inseticidas estão sendo cada vez mais estudados como alternativa no manejo integrado de pragas. A espécie da família Asteraceae tem se destacado pela eficiência de seus extratos (ROEL *et al.*, 2000). A atividade inseticida de extratos de plantas pode ser manifestada por meio da mortalidade direta, repelência, esterilidade, interferência no desenvolvimento e modificação no comportamento dos artrópodes (LIMA; MOREIRA; ARAGÃO, 2013).

De acordo com Sampaio (2015), a aplicação de extratos de *Tithonia diversifolia* na área agrícola vem sendo suportada por trabalhos que reportam a atividade tóxica dos extratos etanólicos das folhas sobre operárias de uma espécie de formiga cortadeira (*Atta cephalotes*), principalmente os extratos obtidos a partir das folhas secas a sombra, os quais foram capazes de causar uma taxa de mortalidade de até 97,5% entre as formigas operárias após um período de cinco dias de tratamento, sugerindo assim o potencial desta planta para o controle de pragas agrícolas.

Segundo Pavela, *et.al* (2018), os extratos de *Tithonia diversifolia* vem atraindo cada vez mais pesquisadores, como sendo um mecanismo na proteção de diversas lavouras. Através de diversos estudos, um deles foi contra o fitófago generalista *Atta cephalotes* onde a ação inseticida se deu por ingestão e contato do extrato metanoico sobre os insetos. Um outro trabalho realizado por Pavela *et al.* (2018) mostrou que o extrato alcóolico de folhas de *Tithonia diversifolia*, é também ativo contra as principais

espécies de pragas (por exemplo, pulgões e besouros) em plantas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*).

3.6 TOXICIDADE

A ecotoxicologia prognostica a aplicação de testes de toxicidade com organismos, que são também conhecidos como bioensaios, que são realizados testes em laboratório, a fim de gerar efeito biológico de uma substância conhecida. Normalmente esses testes são realizados em uma população de organismos testes, ou até mesmo em células. Através dos testes de toxicidade é possível encontrar a concentração na qual a substância conseguiu matar 50% da população observada (MARIANI, 2006).

4. MATERIAL E MÉTODOS

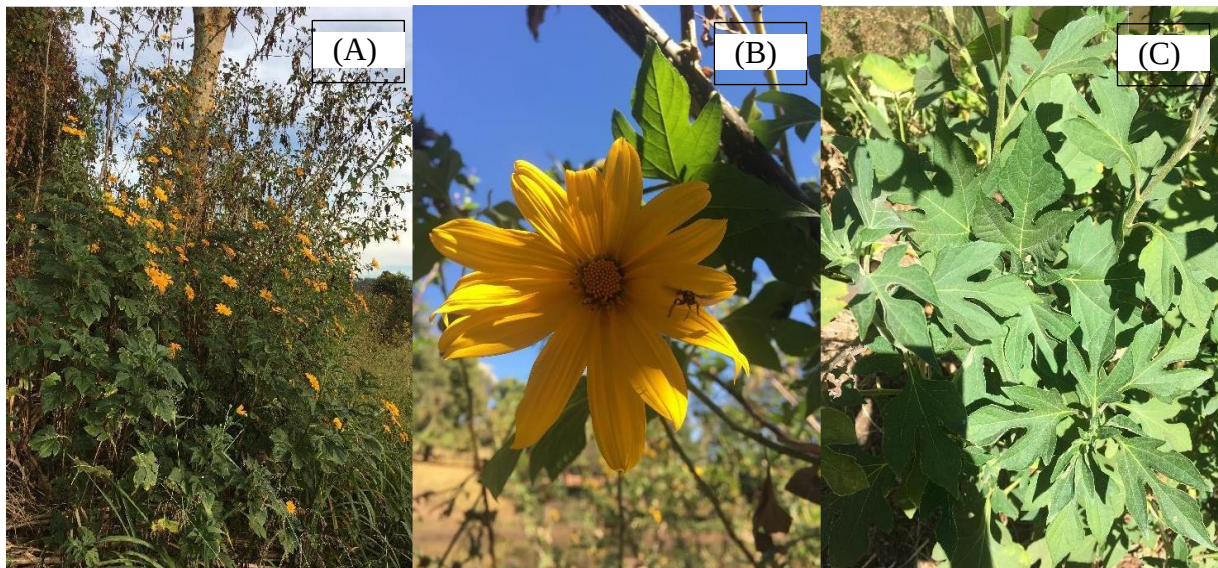
Os experimentos foram conduzidos nos laboratórios de Secagem e Armazenamento de Produtos Vegetais e no laboratório de Pesquisa Desenvolvimento & Inovação de Produtos da Biodiversidade, da Universidade Estadual de Goiás.

4.1 Obtenção dos materiais vegetais

Foram coletadas manualmente entre os meses de maio e julho de 2021 no período da manhã, 21kg de material vegetal constituído pelas flores e folhas da espécie *Tithonia diversifolia* (HEMSL.) A.GRAY (Asteraceae) (Figura 4). O material foi coletado na Agência Goiana de Assistência Técnica, Extensão Rural e Pesquisa Agropecuária Estação (Emater), localizada no município de Anápolis-GO, com latitude: 15°47'50"S, longitude: 43°18'31"O e altitude de 1017 m. A temperatura local varia de 16 °C a 33 °C de acordo com a Classificação de Köppen, do tipo Aw. Logo após a coleta, os materiais vegetais foram transportados para o Laboratório de Secagem e Armazenamento de Produtos Vegetais, onde foram realizados os experimentos.

Ramos floridos da planta também foram coletados e submetidos à técnica de herborização para a confecção de exsicatas, que foram depositadas no Herbário da Universidade Estadual de Goiás do Campus Central -Sede Anápolis (registro nº UEG-14411).

Figura 4 - *Tithonia diversifolia* (HEMSL.) A.GRAY registrada no local de coleta, Agência Goiana de Assistência Técnica, Extensão Rural e Pesquisa Agropecuária Estação (Emater). (A) Visão geral da planta. (B) Flor. (C) Folhas.



Fonte: Autor (2021).

4.2 Planejamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) em um esquema fatorial 6x 7 com três repetições, sendo os fatores dosagens utilizadas (0; 10; 100; 350; 700; 1000 mg L⁻¹) *Acanthoscelides obtectus*; (0; 300; 650; 1000; 1350; 1700mg L⁻¹) para *Sitophilus* spp em sete períodos de avaliação (24; 48; 72; 96; 120; 144; 168h).

4.3 Secagem e armazenamento do material vegetal de *Tithonia diversifolia*

O material vegetal de *Tithonia diversifolia* depois de transportados e levados ao laboratório, foram selecionados para retirada daqueles com danos físicos e posteriormente lavados em água corrente. Os mesmos, foram secos em estufa com circulação de ar quente por 72h à 40° C. Em seguida foram triturados em um moinho

de martelo SP 33 LABOR® e armazenados em frascos de vidro protegidos da luz e umidade para posteriores extrações e análises.

4.4 CARACTERIZAÇÃO FARMACOGNÓSTICA DO MATERIAL VEGETAL

As determinações de granulometria de pós, cinzas e perda por dessecação foram realizadas em triplicata de acordo com os métodos descritos na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019).

4.4.1 Determinação da granulometria dos pós

A granulometria foi determinada com o auxílio de tamizes operados por dispositivo mecânico (Agitador de peneiras para análises granulométricas. Foram utilizados tamises com abertura de malha (250, 425, 1000, e 1400 µm) acomodados da maior abertura para a menor abertura, apoiados sobre um coletor. Amostra de 25 g foi pesada e transferida para o tamis superior distribuindo uniformemente o pó. O aparelho foi acionado por cerca de 15 minutos em velocidade 2 com vibração adequada e, estimado o percentual retido em cada tamis. O tamanho das partículas foi avaliado pelo percentual de retenção de pó em cada tamis por meio da Equação 1.

$$\% \text{ Retida pelo tamis} = \frac{P_1}{P_2} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Em que:

P1 = peso da amostra retida em cada tamis (em gramas); e

P2 = soma dos pesos retidos em cada tamis e no coletor (em gramas).

4.4.2 Determinação de cinzas totais

O método foi baseado na determinação da perda de peso do material submetido à queima em temperaturas entre 550-570°C (MOREIRA *et.al*, 2008). A determinação de cinzas permite verificar a adição de matérias inorgânicas ao produto com exatidão. 3 g da amostra pulverizada foram transferidas para cadinhos de

porcelana previamente tarados e incinerados, sendo a temperatura aumentada gradativamente até 600 ± 50 °C, até que todo o carvão fosse eliminado. O gradiente de temperatura utilizado foi 30 minutos a 200 °C, 60 minutos a 400 °C e 90 minutos a 600 °C. Ao término do ensaio, os cadinhos foram resfriados em dessecador. A porcentagem de cinzas totais foi calculada conforme Equação 2:

$$\% \text{ cinzas totais} = \frac{(\text{peso cadinho com cinzas (g)}) - \text{peso cadinho vazio(g)}}{\text{peso inicial da amostra(g)}} \times 100 \text{ (Eq.2)}$$

4.4.3 Determinação de cinzas insolúveis em ácido

Cinzas insolúveis em ácido constituem o resíduo obtido na fervura de cinzas totais ou sulfatadas com ácido clorídrico diluído após filtragem, lavagem e incineração. O método destina-se à determinação de sílica e constituintes silícicos da droga. Sendo que, as cinzas obtidas no ensaio anterior foram aquecidas até ebulição com 25 mL de ácido clorídrico 2 M durante cinco minutos em um cadinho coberto por um vidro de relógio. Lavou-se o vidro de relógio com 5 mL de água quente, juntando a água de lavagem ao cadinho. O material insolúvel em ácido foi recolhido em um papel de filtro com teor de cinzas conhecidas, lavado com água quente até que o filtrado se mostrasse neutro. O papel de filtro contendo o resíduo foi transferido para o cadinho original, seco sobre chapa e incinerado a 500 °C. O cálculo da porcentagem de cinzas insolúveis em ácido em relação à droga seca foi obtido por meio da Equação 2.

$$\% \text{ cinzas totais} = \frac{(\text{peso cadinho com cinzas (g)}) - \text{peso cadinho vazio(g)}}{\text{peso inicial da amostra(g)}} \times 100 \text{ (Eq.2)}$$

4.4.4 Perda por dessecação

Para a determinação da perda por dessecação, foi empregado o método gravimétrico (dessecação). Foi utilizada uma balança de aquecimento halógeno UniBloc MOC63u SHIMADZU, em que foi pesado 1 g da amostra, em temperatura de 105 °C. O ensaio foi realizado em triplicata. O ensaio se destina a determinar a

quantidade de substância volátil de qualquer natureza eliminada nas condições especificadas na monografia individual.

4.4.5 Determinação de óleos essenciais

Para determinação de óleos essenciais no material vegetal foi realizada a extração utilizando o Aparato de Clevenger. Para tanto, 80g do material vegetal foram transferidos para balão de fundo redondo de 1000 mL, e acrescentou-se água purificada até metade do volume do balão que foi colocado na manta aquecedora, e acoplado ao Aparato de Clevenger. O processo de extração durou 3 horas, contadas a partir do início de ebulição da água. Ao término deste período o óleo essencial foi coletado, lavado com éter dietílico (Sigma- Aldrich) e, dessecado com sulfato de sódio anidro. Todo o éter foi retirado por evaporação em capela de exaustão. Ao fim da evaporação, o óleo essencial foi pesado em frasco escuro previamente tarado, a fim de obter o rendimento, de acordo com a Equação 4.

$$R\% = \frac{\text{massa do óleo (g)}}{80\text{g}} \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

4.4.6 Determinação dos constituintes do óleo essencial por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

O óleo essencial foi analisado na Universidade Federal de Goiás (UFG), em um cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (Shimadzu GC-MS QP5050A) equipado com coluna capilar de sílica fundida SBP-5 (30 m x 0,25 mm D.I.; 0,25 µm de espessura de filme) composta por 5% de fenil-metilpolissiloxano e temperatura programada da seguinte forma: 60-240 °C a 3 °C/min, depois a 280°C a 10 °C/min, terminando com 10 min a 280 °C. Hélio foi utilizado como gás de arraste a um fluxo de 1 mL/min, e o modo split a uma proporção de 1:20. A temperatura da injeção foi ajustada para 225 °C. Os parâmetros operacionais significativos do espectrômetro de massas quadrupolo foram: temperatura de interface de 240 °C; ionização por impacto de elétrons a 70 eV com uma faixa de massa de 40-350 m/z em uma taxa de amostragem de 1 varredura/s. Os constituintes foram identificados por comparação de seus índices de retenção (van Den Dool and Kratz, 1963) relativos

a uma série de n-alcenos (C9 C28) e espectros de massas, com dados da literatura (Adams, 2017). Alguns compostos também foram confirmados pela comparação com dados da biblioteca do equipamento (NIST).

4.4.7 Triagem fitoquímica

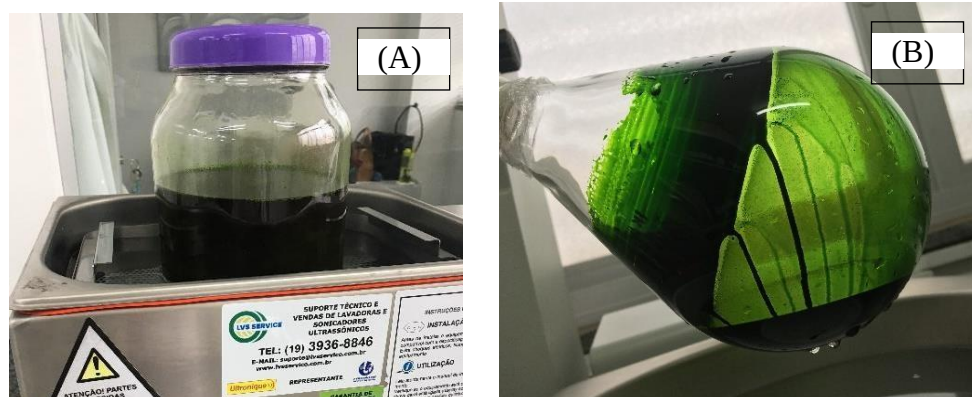
O material vegetal foi rastreado quanto à presença de metabólitos secundários como alcaloides, saponinas, esteroides, glicosídeos cardioativos, taninos e flavonoides utilizando métodos adaptados de Costa (2001), Matos (2009) e da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019).

4.5 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO

Foram utilizados 400g do material vegetal para 1800 mL do solvente (solução alcoólica a 95% P.A), totalizando 18L de solvente para 4 kg de material vegetal, conforme metodologia adaptada de DE ALMEIDA *et al.* (2015). O recipiente contendo o material vegetal e o etanol 95% P.A, foi mantido no banho em ultrassom UltraSonic Cleaner, UNIQUE durante 40 minutos a temperatura ambiente (25°C). O método de ultrassom consta com um aparelho que emite ondas na frequência 50/60 Hz, aumentando a penetração do solvente na matriz do soluto, por meio da fragmentação das membranas celulares (PANDEY, TRIPATHI, 2014).

Passado esse período, a mistura foi filtrada em funil de Buchner, com auxílio de uma bomba a vácuo. O resíduo foi descartado e o extrato recolhido foi concentrado sob pressão reduzida com o auxílio de um rotaevaporador a vácuo (IKA® RV 10 control) (Figura 5), em temperatura de 40°C até obtenção de 1286ml.

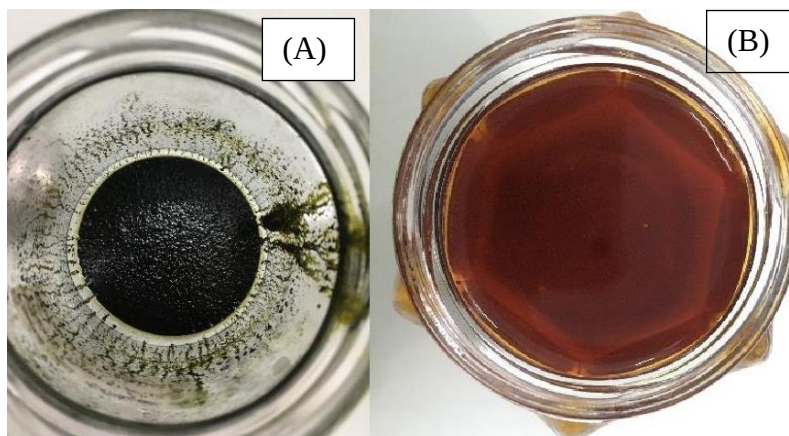
Figura 5 - (A) Extração do material vegetal pulverizadas de *Tithonia diversifolia*, em banho de ultrassom; B) Rotaevaporação do extrato alcoólico de *Tithonia diversifolia*



Fonte: Autor (2021)

Os extratos concentrados foram transferidos para pequenos frascos de vidro de boca larga e levados para capela de exaustão, a fim de terminar o processo de retirada do solvente. Com o auxílio de um mini ventilador foi realizada a evaporação completa do solvente em temperatura ambiente. O solvente foi considerado como totalmente evaporado, após constatação de que o peso do extrato se manteve constante ao ser submetido a seguidas pesagens dos frascos em balança analítica. Durante esse processo observou-se que o extrato se separou, espontaneamente, em duas fases distintas denominadas neste estudo, de Extrato Sobrenadante (ES), Figura 6A, e Graxoso (EG), Figura 6B. O EG apresentou uma consistência pegajosa/graxosa, de coloração verde escuro, enquanto que o ES apresentou consistência oleosa e coloração marrom.

Figura 6 – (A) Extrato Graxoso do material vegetal de *Tithonia diversifolia*; (B) Extrato Sobrenadante do material vegetal de *Tithonia diversifolia*.



Fonte: Autor (2021)

4.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS EXTRATOS GRAXOSO (EG) E SOBRENADANTE (ES)

4.6.1 Rendimento da extração

O rendimento da extração foi estimado segundo a Equação 5:

$$Re = \frac{MEScTD}{Mf} \times 100 \quad (\text{Eq. 5})$$

Em que:

Re: rendimento extrativo (%),

Mf: massa das folhas em gramas, e

MEScTD: massa do extrato da *Tithonia diversifolia*.

4.6.2 Viscosidade

A determinação da viscosidade foi realizada apenas no ES, por ter consistência líquida. Utilizou-se um viscosímetro da marca Brookfield (Modelo RVT), disponível no Laboratório de Química da Universidade Estadual de Goiás, sendo o instrumento equipado com cilindros de diâmetros diferentes (*spindles*). Cada *spindle* é apropriado para medir a viscosidade de fluidos em uma faixa específica: os de menor diâmetro são utilizados para determinar as maiores viscosidades; e os de maior diâmetro, as menores viscosidades.

Foi utilizado o manual de instruções da *Brookfield Dial Viscometer*, e metodologia conforme descrito na Farmacopéia Brasileira 6ª edição. Dentro destas especificações, ficou determinado o *spindle* adequado (LV1), para as amostras analisadas, bem como o recipiente ideal (Béquer de 250 mL) para receber o conteúdo da amostra, sendo que o raio do copo influencia no torque. Durante o ensaio a amostra foi submetida à velocidade de 100 rpm, torque: 6,4%, temperatura de 23,8 °C. Os ensaios foram realizados em triplicata, e os resultados foram expressos em centipoise (cP) em função da velocidade de rotação.

4.6.3 Determinação da densidade relativa

A densidade relativa do ES foi determinada em triplicata, conforme Farmacopeia Brasileira 6ª edição (BRASIL, 2019) por método gravimétrico, com utilização de picnômetro de 10 mL, limpo, seco, previamente calibrado e pesado. A densidade relativa foi calculada pela razão entre a massa da amostra e a massa da água purificada expressa na Equação 13.

$$Densidade\ Relativa = \frac{(Pe - Pv)}{(Pa - Pv)} \quad (Eq.8)$$

Em que:

Pe- massa do picnômetro com Extrato Sobrenadante (ES);

Pv- massa do picnômetro vazio

Pa- massa do picnômetro com água purificada.

4.6.4 Determinação de tagitinina C

A identificação e a quantificação do composto tagitinina C no ES e no EG foram realizadas por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE), em um equipamento Agilent Technologies 1260 Infinity II, software Openlab CDS, equipado com detector de arranjo de iodo (DAD) modelo G7115A e injetor automático. As corridas cromatográficas com volume de injeção de 10 µL foram realizadas utilizando uma coluna Ascentis® C18 SUPELCO de 250 mm x 46 mm x 5 µm em forno equilibrado a 35 °C.

O método foi constituído de um sistema de eluição em gradiente de Acetonitrila grau HPLC J.T.Baker (A) e ácido acético VETEC 1% (v/v) (B), na proporção 40:60 (0-5 min); 70:30 (5-15min), 40:60 (15-20 min), com fluxo de 1,0 mL/min. Os cromatogramas foram analisados no comprimento de onda de 254 nm, segundo metodologia proposta no trabalho de Almeida *et al.* (2018). As amostras e padrões foram filtrados em membrana PTFE 0,45 µm para vial âmbar.

Tagitinina C foi utilizada como padrão externo para a confecção da curva de calibração, nas concentrações de 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000 µg/mL, preparadas em acetonitrila grau HPLC, em triplicata. Para tanto, a tagitinina C foi cedida pela Universidade Federal de Alfenas (UFA) onde foi isolada de folhas de *Tithonia diversifolia* de acordo com Abe *et al.* (2015) e sua estrutura química foi elucidada pelos dados espectrais obtidos por Ressonância Magnética Nuclear de H^1 e C^{13} e comparados com a literatura (BARUAH *et al.*, 1979; SCOTT; ZDERO; BOHLMANN, 1987).

Para o preparo das amostras do EG e ES realizadas em triplicata, foi pesado 0,1 g de cada amostra e dissolvido em 10mL de metanol grau HPLC, em seguida assistidos em ultrassom (Ultronique mod. Q5. 9/40 A, frequência 40 kHz e potência 200W) por 2 minutos. As amostras foram filtradas em papel de filtro e centrifugadas (mini centrífuga G IKA). O sobrenadante foi filtrado em PTFE 0,45 µm para vial âmbar. Ambas as amostras foram mantidas a -18 °C em freezer, protegidas da luz até o momento das injeções no CLAE. Para quantificar as concentrações de tagitinina C presentes em cada amostra, utilizou-se a equação da reta obtida por meio da análise de regressão linear, Método dos Mínimos Quadrados Ponderados (MMQP). Para calcular o teor (%) de tagitinina C em cada extrato (EG e ES) foi utilizada a Equação 7.

$$TT (\%) = concT \times FD \times 100 \quad (\text{Eq. 7})$$

Em que:

TT (%) = teor de tagitinina C no extrato, expresso em percentual;

concT = concentração de tagitinina C na amostra do extrato, calculada pela equação da reta e expressa em g/mL;

FD = Fator de diluição da amostra calculado pela razão entre o volume da diluição (mL)/massa de extrato (g).

Foram anotadas e calculadas as médias das áreas das concentrações preparadas no programa Microsoft Excel. A curva analítica e demais análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Action Stat (2014) versão 3.0.

4.6.5 Determinação de lipídeos

Foi enviada ao laboratório do Instituto SENAI de Tecnologia em Alimentos e Bebida, de Goiânia, 100mL do ES para realização da análise de lipídeos/gordura. Não foi possível o encaminhamento do EG, por ser de difícil manuseio e quantidade de produto insuficiente.

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA

4.7.1 Cultivo de insetos-praga

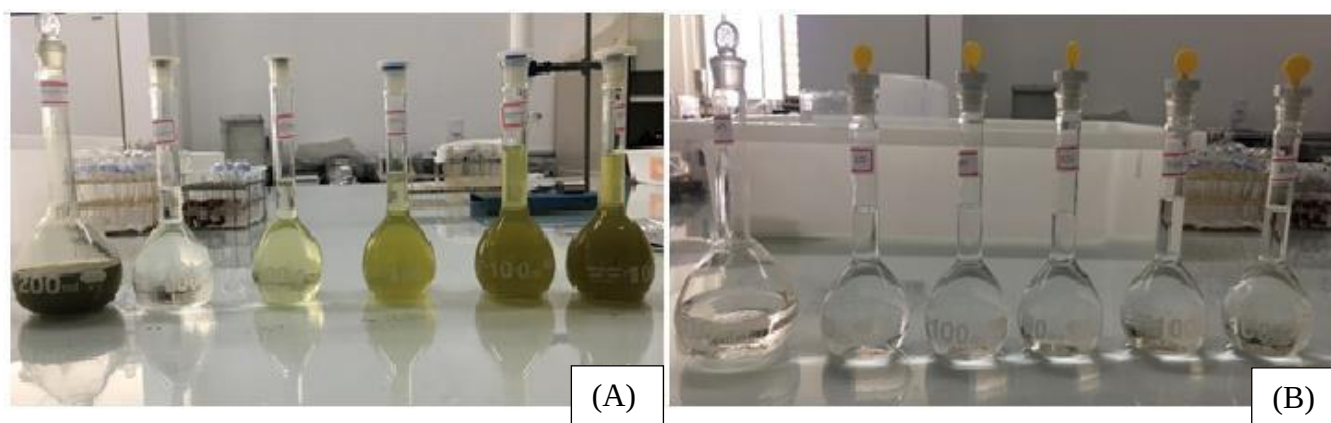
Acanthoscelides obtectus e *Sitophilus* spp. foram obtidos de grãos de feijão e milho respectivamente, naturalmente infestados e adquiridas de experimentos anteriores no Laboratório de Secagem e Armazenamento de Produtos Vegetais, da Universidade Estadual de Goiás. Os insetos foram transportados para um recipiente de vidro transparente, contendo aproximadamente 200 g de grãos íntegros e não infestados, e tapados com tecido de organza, e mantidos em temperatura ambiente. O tecido de organza permite a ventilação, porém impede a entrada ou saída de outros insetos. A partir deste estoque, novas gerações de insetos-praga foram criadas e as culturas mantidas substituindo continuamente os grãos infestados e consumidos, por grãos sadios e não infestados (ALMEIDA *et al.*, 2013).

4.7.2 Dosagens utilizadas

Para a determinação da DL_{50} , foram testadas as seguintes dosagens para *Acanthoscelides obtectus*; 0,0; 10,0; 100,0; 350,0; 700,0 e 1000,0 $mg\ L^{-1}$, já para os ensaios realizados com *Sitophilus spp*, as concentrações utilizadas foram; 0,0; 300,0; 650,0; 1000,0; 1350,0, e 1700,0 $mg\ L^{-1}$. As diferentes concentrações foram obtidas a partir de uma solução mãe preparada na concentração de 1000,0 e 1700,0 respectivamente do extrato, em água e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) P.A. da marca Synth. Como controle do veículo foi utilizada água +DMSO, tanto para *Acanthoscelides obtectus*, como para *Sitophilus spp*, em quantidades proporcionais à maior concentração testada, a fim de avaliar se houve ou não influência do solvente (veículo) na mortalidade dos insetos, conforme a Figura 7(A) e (B).

As diferentes dosagens foram utilizadas com auxílio de papel germiteste com gramatura de $65g/m^2$ da marca GERMILAB.

Figura 7 – (A) Concentrações da solução do Extrato Graxoso de *Tithonia diversifolia*. (B) Concentrações da solução do Extrato Sobrenadante.



Fonte: Autor (2022)

4.7.3 Determinação do índice de mortalidade de *Acanthoscelides obtectus* e de *Sitophilus spp*.

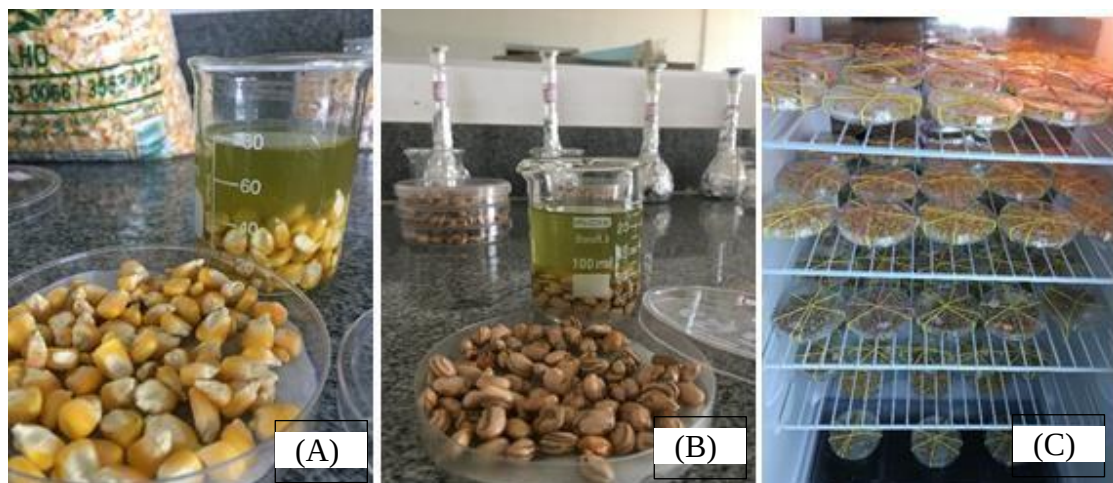
Vinte gramas de grãos não infestados de feijão e milho adquiridos em mercado local de Anápolis-GO, foram imersos em 100 mL de extrato e posto sobre

papel germiteste, em placa de Petri. As diluições foram obtidas por meio de uma solução mãe a 1000 mg L^{-1} , sendo as seguintes diluições, 10, 100; 350; 700 mg L^{-1} para *Acanthoscelides obtectus*, e solução mãe de 1700 mg L^{-1} , sendo as seguintes diluições 300; 650; 1000; e 1350 mg L^{-1} para *Sitophilus* spp, sendo a dose controle para ambos, contendo apenas água e DMSO, foram feitas em triplicata contendo 10 insetos cada, por concentração. Após a completa evaporação do solvente os insetos foram acondicionados na placa contendo aproximadamente 20g de grãos tratados e posteriormente cobertos com a tampa da placa de Petri, conforme Figura 8.

Acanthoscelides obtectus e *Sitophilus* spp em avaliação permaneceram por 7 dias em Câmara de Germinação TECNAL® TE-402, a 25°C . O número total de insetos mortos foi contado e registrado na Tabela 10. O inseto foi considerado morto quando não respondeu a estímulos quando tocado com auxílio de uma espátula (JUNIOR, 2011). Os dados foram submetidos a análise de ProBit, utilizando o programa Statistic® para a obtenção da dose letal DL_{50} .

Para avaliar a toxicidade do extrato sobre os insetos, os mesmos foram expostos por um período determinado a várias concentrações aqui descritas, assim foram avaliados ao decorrer dos dias com auxílio de uma lupa, os efeitos causados nos insetos. Os efeitos tóxicos vão desde a mortalidade até efeitos chamados subletais, bem como mudanças de comportamento, além de alterações fisiológicas logo após a aplicação dos extratos, sendo algumas dessas alterações: hipersensibilidade, hipoatividade, e morte dos mesmos (ABRAHÃO; SILVA, 2002).

Figura 8 - (A) Aplicação de diferentes dosagens de extrato, em sementes de milho; (B) Aplicação de diferentes dosagens de extrato, em sementes de feijão; (C) Sementes tratadas e com os insetos em estudo.



Fonte: Autor (2022).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise química dos extratos, os dados foram submetidos à regressão linear pelo Método dos Mínimos Quadrados ponderados. Sendo que, foram ajustadas equações de regressão aos dados experimentais de dosagem aplicada. O coeficiente de determinação (R^2) também foi estimado, utilizando o programa Excel (2014).

Para encontrar a DL_{50} , para determinação do índice de mortalidade de *Acanthoscelides obtectus* e *Sitophilus* spp, foi feita a análise de regressão ProBit, utilizando o programa Statistica 12.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO MATERIAL VEGETAL

Tabela 1 - Análises físico-química do material vegetal de *Tithonia diversifolia*

Parâmetros	Média
Diâmetro médio (µm)	355
Perda por dessecação (%)	6,89
Cinzas totais (%)	12,67
Cinzas insolúveis em ácido (%)	0,0031
Óleos essenciais (g)	0,21

Fonte: Autor (2022)

Os resultados obtidos com a determinação da granulometria do pó de *Tithonia diversifolia* (Tabela 1), demonstraram que a característica do pó é semifino, assim o pó cujas partículas passaram em sua totalidade pelo tamis de abertura nominal de malha de 355 µm e, no máximo, 40% pelo tamis com abertura nominal de malha de 180 µm, representando 64,16% de todo o material.

Segundo a Farmacopeia Brasileira (2016), o teor de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido consiste no resíduo não volátil obtido por incineração, na presença e ausência de ácido sulfúrico. A avaliação visa determinar o teor de impurezas inorgânicas e constituintes presentes em substâncias orgânicas. Esse tratamento prévio da droga vegetal com ácido sulfúrico é recomendado para promover uma maior reprodutibilidade do método.

O material vegetal de *Tithonia diversifolia* apresentou teor de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido dentro dos valores encontrados na literatura. Sarria *et al.* (1999), analisando somente às folhas de *Tithonia diversifolia*, encontrou 17%, enquanto, Premarante *et al.* (1998) encontraram 12,38%, e Sesbania (6,17%). Já Rosales (1992), encontrou 21,4%. De acordo com o último autor, este valor encontrado para a *Tithonia diversifolia* é alto e que provavelmente é um indicativo de alta concentração de minerais como relata Kwabiah *et al.* (2003).

O resultado da análise de perda por dessecação, está de acordo com o estabelecido pela SBFgnosia (2009), cujo limite é na faixa de 8-14% para droga vegetal.

Este parâmetro de controle de qualidade é geralmente utilizado pois permite um melhor monitoramento e conservação do material vegetal (BRASIL, 2019).

5.2 RENDIMENTO DE ÓLEOS ESSENCIAIS

Com a extração do óleo essencial do material vegetal de *Tithonia diversifolia* foi obtido 0,21g de óleo, o que conferiu um rendimento de 0,15%.

O rendimento encontra-se superior quando se comparado com os citados na literatura sobre rendimentos de óleos essenciais de *Tithonia diversifolia*. No trabalho realizado por Silva (2003), com 521,3 g de material vegetal, obteve 0,3mL de óleo essencial (0,06%).

5.3 ANÁLISE DE ÓLEOS ESSENCIAIS

O óleo extraído e analisado usando GC-MS, como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição química do óleo essencial das folhas e flores de *Tithonia diversifolia*.

Nº	Compostos	IR	RI Lit.	Referência	Conteúdo relativo (%)
1	NI	900,00	-	-	2,650
2	NI	939,49	-	-	2,420
3	Isoborneol	1159,53	1155	A	1,220
4	E-cariofileno	1411,80	1417	A	5,130
5	E-β-Ionona	1479,82	1487	A	1,650
6	1-Pentadeceno	1488,92	-	N	2,000
7	Kessane	1518,72	1529	A	6,510
8	E-Nerolidol	1559,03	1561	A	3,080
9	Espatulenol	1568,77	1577	A	43,410
10	Oxido de cariofileno	1573,70	1582	A	26,790
11	Pogostol	1645,12	1651	A	5,130
Total de monoterpenos					1,220
Monoterpenos oxigenados					1,220
Total de sesquiterpenos					90,050

Sesquiterpenos hidrocarbonetos	5,130
Sesquiterpenos oxigenados	84,920
Fenilpropanoides	1,650
Outros	7,070
Total %	99,990

Fonte: Autor (2022)

Ao comparar a razão da área do pico do composto detectado com a área total de todos os compostos detectados, os conteúdos relativos dos componentes do óleo foram determinados e os compostos foram identificados comparando o índice de retenção (IR) com a literatura (ADAMS, 2017) e o banco de dados do *National Institute of Standards and Technology* (NIST). Os componentes majoritários do óleo essencial do material vegetal de *Tithonia diversifolia* são os sesquiterpenos oxigenados espatulenol (43,410%) e óxido de cariofileno (26,79%).

5.3 TRIAGEM FITOQUÍMICA

Dentre os diversos métodos para identificação de metabólitos secundários em extratos, a avaliação qualitativa se destaca, como por exemplo a triagem fitoquímica na qual foi realizada nesse trabalho. As reações colorimétricas indicam a presença ou não de compostos fenólicos, taninos, flavonoides, cumarinas, quinonas, saponinas e alcaloides (ROCHA, 2017). Os resultados encontrados para a *Tithonia diversifolia* podem ser observados na Tabela 3.

Nota-se, que o material vegetal de *Thitonia diversifolia* apresentou-se positivo para Flavonoides, sendo identificados flavonóis por meio da reação de Shinoda (fluorescência verde-amarelada) e reação Oxalo-Borica (fluorescência amarela-esverdeada). A reação com ácido sulfúrico concentrado foi positiva (fluorescência), assim como a reação com Hidróxidos alcalinos (amarelo escuro). As flavononas foram identificadas pela reação com Cloreto férrico (verde-castanha), e a reação com Cloreto de alumínio se mostrou negativa. Para as cumarinas, a reação foi positiva, dando origem a fluorescência verde.

Para os Taninos, todas as reações foram positivas sendo que, os teores se mostraram elevados de acordo com a intensidade das cores. A partir dos resultados obtidos pelas Heterosídeos Cardioativos, foi possível identificar a presença de esteroides na reação de Liebermann-Burchard (coloração castanha da solução); e reações de Compostos Terpenicos pela reação de Pesez (fluorescência verde amarelada), sendo que a reação de Keller-Kiliani e reação de Kedde não foram identificadas, sendo negativas.

Foram encontrados alcaloides, de acordo com as reações de identificação dos Compostos nitrogenados em todos os reativos. Para as saponinas, o índice de espuma foi positivo. Entretanto para os Heterosídeos cianogênicos foi negativo para o reativo de Guibgard quanto para a reação de azul de Prússia.

Em síntese, a *Tithonia diversifolia* apresenta compostos com ação inseticida, visto que a possível presença de alcaloides e taninos, são metabólitos secundários que possuem ação inseticida. Os Taninos por exemplo, são classificados como substâncias quantitativas, por serem redutores digestivos, com efeito proporcional à concentração, além de reduzirem significativamente o crescimento e a sobrevivência de insetos, inativando enzimas digestivas e criando um complexo de taninos, uma proteína de difícil digestão (CAVALCANTE; MOREIRA; VASCONCELOS, 2006).

Tabela 3-Characterização fitoquímica do material vegetal *Thitonia diversifolia*

CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA		
Metabólito Secundário	Reativo	Reação
Flavonoides	Ácido Clorídrico concentrado	+
	Ácido bórico 3%	+
	Cloreto de alumínio 5%	+
	Ácido sulfúrico concentrado	+
	Cloreto férrico 4,5%	-
	Hidróxido de sódio 20%	+
Cumarinas	Hidróxido de sódio 1N	+
Taninos	Gelatina 2,5% em cloreto de sódio 5%	+
	Sulfato de quinino 1% em ácido sulfúrico 5%	+

	Solução de brucina em ácido sulfúrico 5%	+
	Acetato de Cobre 4%	+
	Cloreto férrico 2%	+
	Solução de Hidróxido de sódio 20%	+
Alcalóides	Reativo de Mayer	-
	Reativo de Dragendorff	+
	Reativo de Bouchardar	+
	Reativo de Bertrand	-
	Reativo de Hager	+
	Ácido Tanico	+
Terpenos	Reação de Liebermann-Burchard	+
	Reação de Pesez	+
	Reação de Keller-Kiliani	-
	Reação de Kedde	-
Saponinas	Teste de espuma	+
Heterosídeos Cianogênicos	Papel reativo de Guignard	-
	Hidróxido de sódio 5%+ Sulfato ferroso 10%+ Cloreto férrico 9%	-

(+) Presente; (-) Ausente

Fonte: Autor (2022).

5.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS EXTRATOS EG E ES

5.4.1 RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO

O rendimento da extração do material vegetal de *Tithonia diversifolia* previamente secas e trituradas foi estimado de acordo com a Equação 1, com massa de 248,88g devEG, e massa de 179,82g de ES, sendo obtido o valor de 2,04% de Rendimento Extrativo total.

5.4.2 DETERMINAÇÃO DA VISCOSIDADE

O ES apresentou valor de viscosidade de 0,80cP.

5.3.4 DETERMINAÇÃO DE LIPÍDEOS

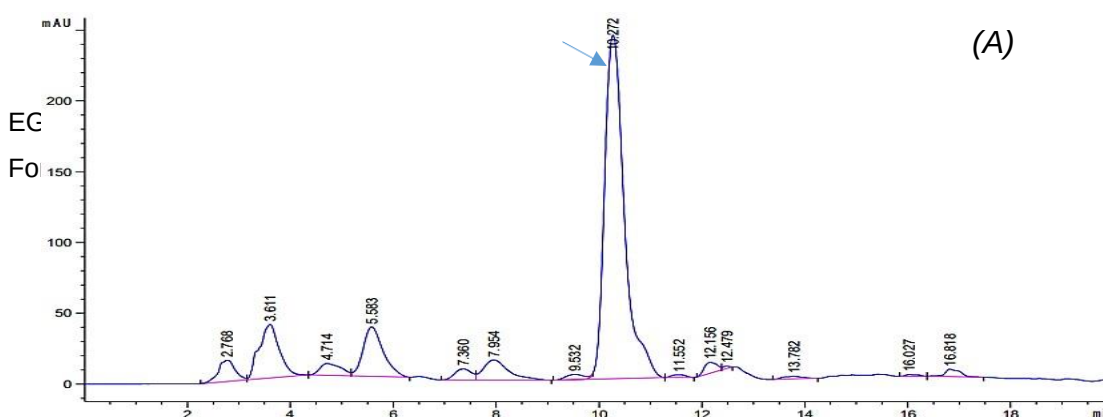
Os resultados mostram ainda que o ES de *Tithonia diversifolia* utilizado neste estudo, apresentou presença de lipídeos, sendo 0,79g/100g de extrato.

5.4 QUANTIFICAÇÃO DA TAGITININA C POR CROMATOGRAPHIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO (HPLC) EM FASE MÓVEL

A análise por HPLC-DAD foi realizada no extrato aquoso de *Tithonia diversifolia*, e para o padrão tagitinina C, sob comprimento de onda de 254nm. Com a análise dos cromatogramas, encontraram-se vários picos coincidentes em todas as amostras de *Tithonia diversifolia*. Na identificação dos compostos foi tido em conta o seu tempo de retenção, que para o EG foi de $\pm 10,272$ minutos, para o ES foi de $\pm 10,222$ e para o padrão tagitinina C foi de $\pm 10,203$ minutos, assim como o seu espectro UV característico.

De acordo com a Figura 9, (A) e (B) quando comparados, o cromatograma e o espectro do Padrão de Tagitinina C (C), se mostraram iguais, afirmando assim a presença do composto, tendo em vista que os picos se encontraram nos mesmos comprimentos de onda.

Figura 9 -Cromatograma do EG (A), ES (B) de *Tithonia diversifolia* e do padrão tagitina C (C) obtido em CLAE-DAD (mAu x min), volume de injeção de 10.000 μ l e UV $\lambda = 254,4$ nm.



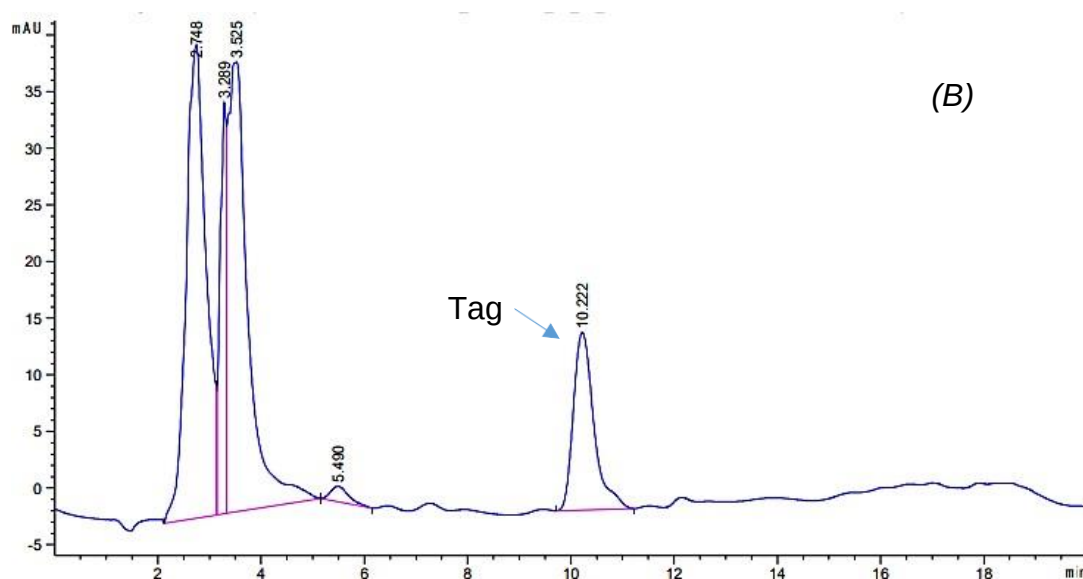
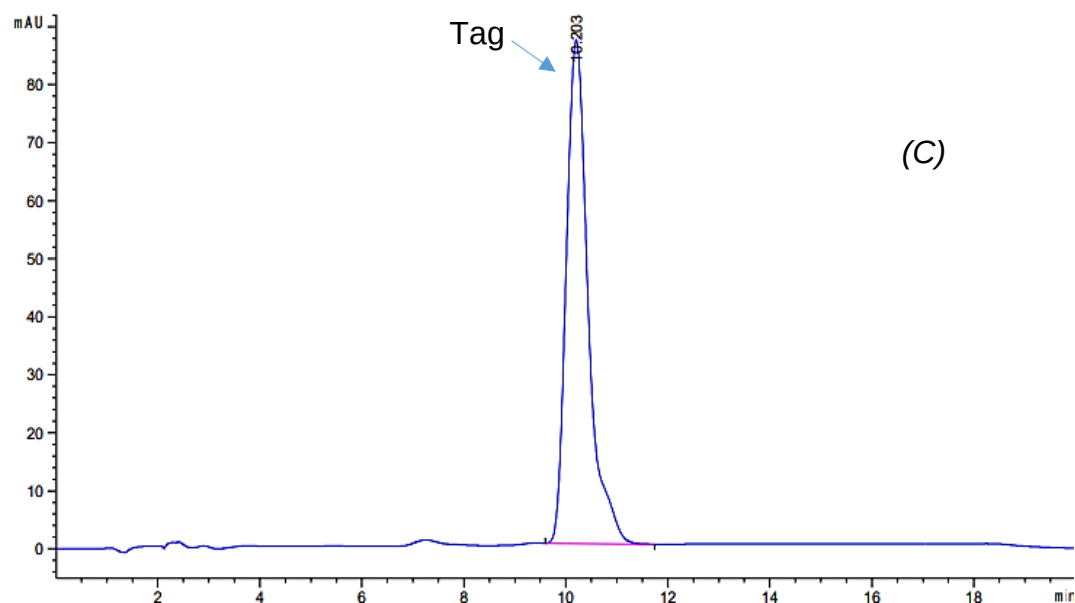


Figura 10-Cromatograma Padrão de *Tithonia diversifolia* obtido em HPLC (mAu x min) 10.000 µl, UV λ = 254,4 nm.



EG: Extrato Graxoso; EG: Extrato sobrenadante

Fonte: Autor (2022).

Podemos verificar de acordo com a Figura 10, que o tempo de retenção da tagitinina C ficou no meio da corrida cromatográfica (10,203 minutos) conforme

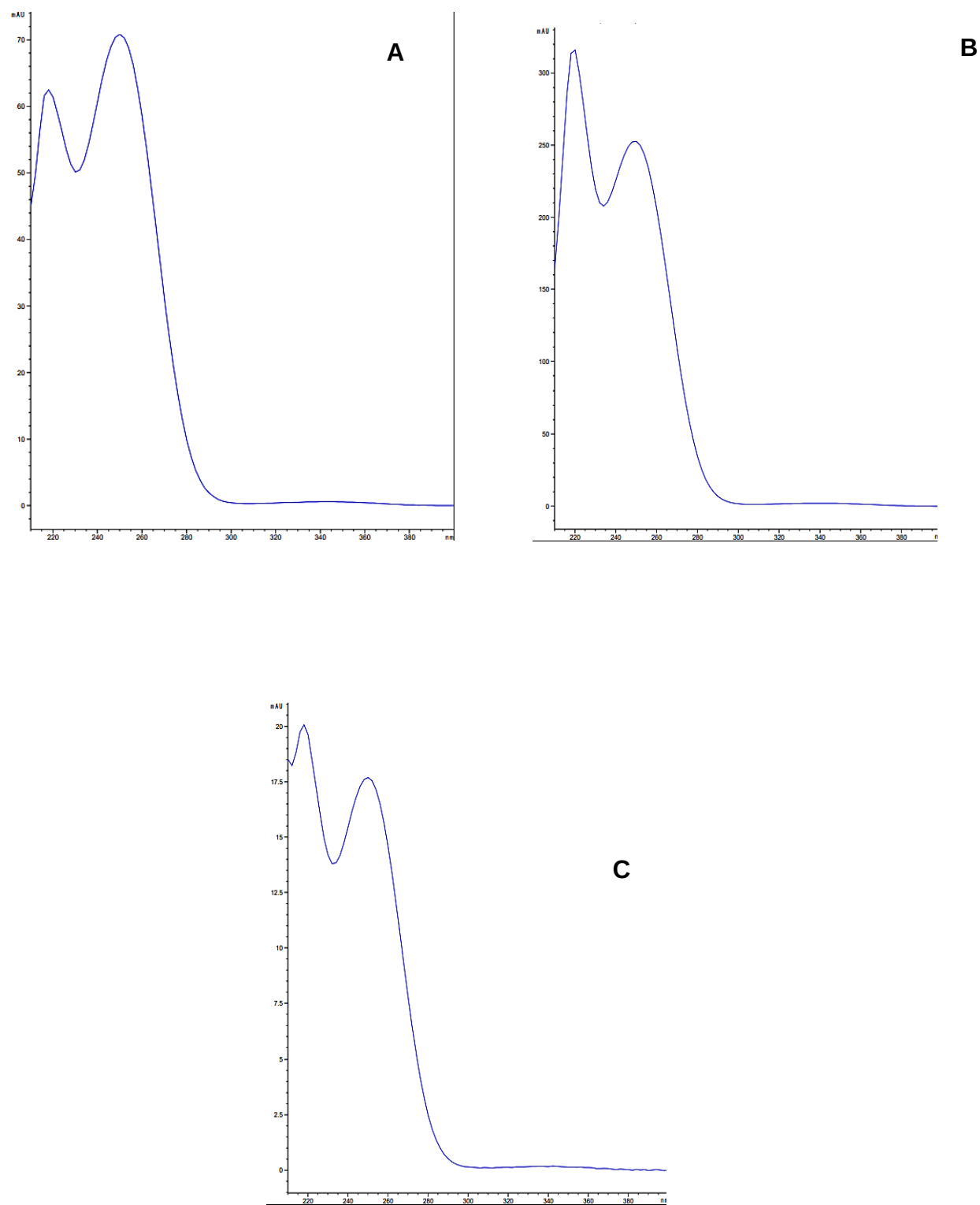
esperado, de acordo com a literatura. Sendo que a separação foi adequada e o composto saiu no meio da corrida.

Como podemos notar na Figura 10, o espectro da tagitinina C quando submetida a regiões de 254nm, geram dois máximos de absorção, onde mostra as regiões da estrutura da tagitinina que mais são cromóforas, onde mais absorve na região do ultravioleta, que são os grupamentos cromóforos que a tagitinina possui. No caso da tagitinina C, ela gerou dois máximos de absorção, em regiões bem

Como podemos notar na Figura 10 (A), o espectro na região do ultravioleta (UV) do padrão tagitinina C possui dois máximos de absorção, um na região de comprimento de onda em torno de 225 nm e outro que se inicia em 250 nm e finaliza

Como podemos notar na Figura 11 A, o espectro na região do ultravioleta (UV) do padrão tagitinina C possui dois máximos de absorção, um na região de comprimento de onda em torno de 225 nm e outro que se inicia em 250 nm e finaliza em 254 nm, mostrando que o comprimento de onda escolhido de 254 nm é a região em que a tagitinina absorve melhor. Ademais, os espectros de absorção na região do UV dos picos da tagitinina C no EG e ES mostram máximos de absorção em regiões idênticas às do padrão tagitinina C, confirmando a identidade desta substância nos extratos, principalmente quando comparados com o espectro padrão clássico de Lactonas Sesquiterpênicas (MADUREIRA, 2009).

Figura 11 - Espectro de absorção na região do Ultravioleta (UV) do padrão tagitinina C (A), e dos picos correspondentes à tagitinina no extrato graxoso (B) e no extrato sobrenadante (C)



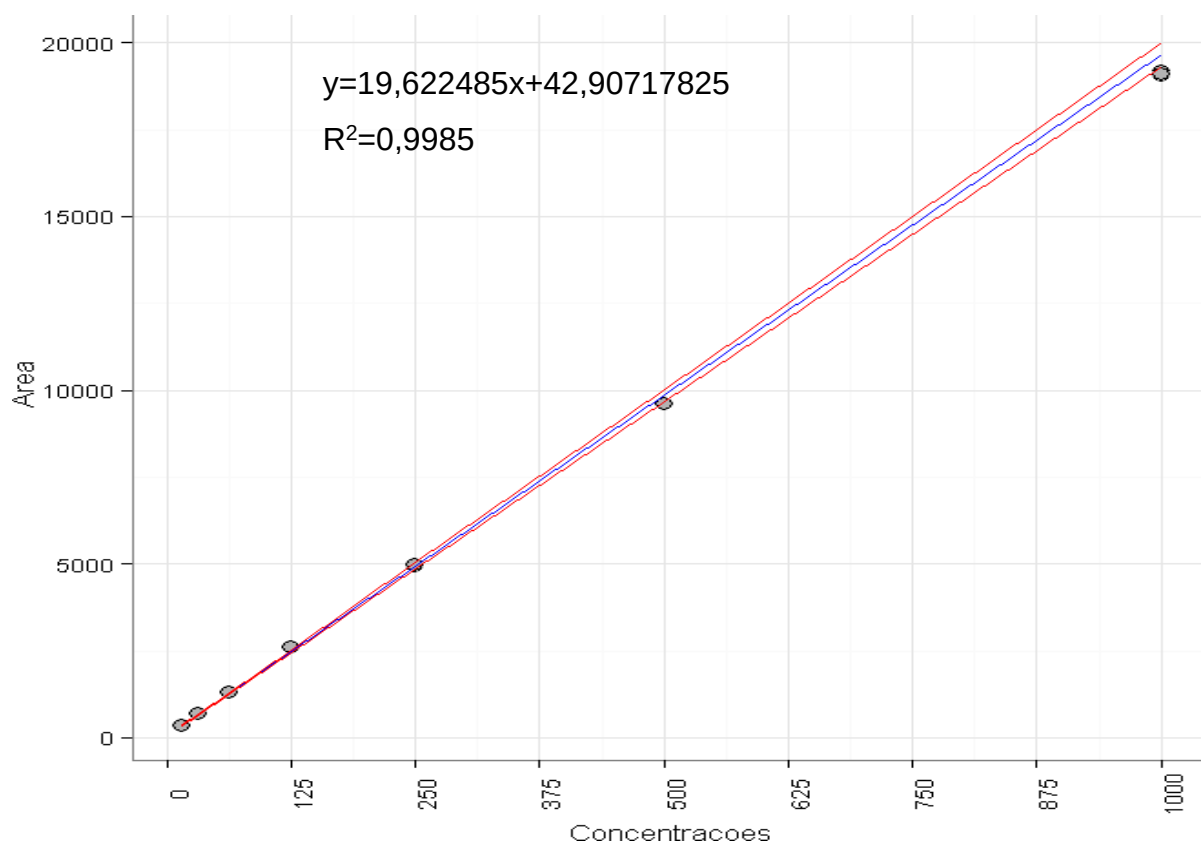
EG: Extrato Graxoso; ES: Extrato Sobrenadante
Fonte: Autor (2022)

Em relação à tagitinina C, encontrada no extrato líquido concentrado em estudo de Goffin et al. (2003), foi observado máximo de absorção no espectro de UV, em torno de 254nm para o padrão. Na substância selecionada no cromatograma da amostra para comparar com o padrão tagitinina, em 5,860 minutos, demonstrando que o pico da amostra se tratava da tagitinina C.

5.4 QUANTIFICAÇÃO DE TAGITININA C NOS EXTRATOS

A representação gráfica da análise de regressão linear das diferentes concentrações preparadas com o padrão tagitinina C, a equação da reta e o valor do coeficiente de determinação (R^2) são apresentados na Figura 12.

Figura 12 - Análise de regressão linear (Area x Concentrações) do padrão tagitinina C



Fonte: Autor (2022)

As concentrações e teores de tagitinina C nos extratos estão demonstrados nas Tabelas 4 e 5. Pode-se verificar que o teor de tagitinina C no EG foi superior ao do ES.

Tabela 4 - Concentrações e teores de tagitinina C nas amostras do Extrato Graxoso (EG)

Tratamentos	Repetições	Área	Concentração µg/mL	Concentração g/mL	Teor Percentual (%)
EG	EG1	6504,7	329,3055	0,0329	3,2930
	EG2	5649,2	285,7076	0,0285	2,8570
	EG3	6391	323,5112	0,0323	3,2351
Média		6181,6333	312,8414	0,0312	3,1284

Fonte: Autor (2022)

Tabela 5 - Concentrações e teores de tagitinina C nas amostras do Extrato Sobrenadante (ES)

Tratamentos	Repetições	Area	Concentração µg/mL	Concentração g/mL	Teor Percentual (%)
ES	ES1	436,2	20,0429	0,0020	0,2004
	ES2	444	20,4404	0,0020	0,2044
	ES3	476,6	22,1018	0,0022	0,2210
Média		452,2667	20,8617	0,0020	0,2086

Fonte: Autor (2022).

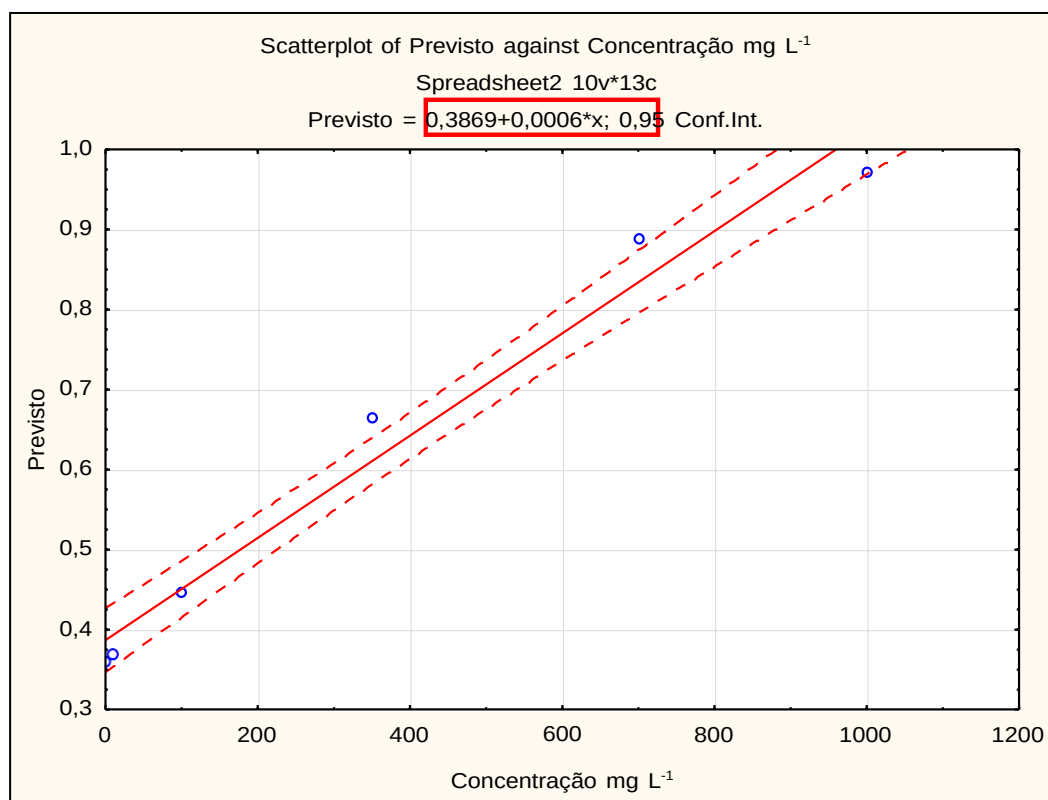
5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA

5.6.1 Determinação do índice de mortalidade de *Acanthoscelides obtectus* e *Sitophilus* spp.

A toxicidade do extrato de *Tithonia diversifolia* foi avaliada por meio da determinação da dose letal 50% (DL₅₀), dose capaz de matar 50% dos insetos testados. Por meio do resultado foi observado que o uso do extrato de *Tithonia diversifolia*, se ajustou ao modelo de ProBit, apresentando potencialidade do extrato sobre *Acanthoscelides obtectus* e *Sitophilus* spp para o tratamento de grãos.

Na Figura 13, encontra-se os dados de mortalidade de *Acanthoscelides obtectus* em função da concentração aplicada, após um período de avaliação de 168 horas de aplicação. Testemunha de *Acanthoscelides obtectus* e *Sitophilus* spp apresentaram eficácia nula dos adultos (0,0% de mortalidade).

Figura 13 - Curva dose-resposta de *Acanthoscelides obtectus* submetidos ao Extrato Graxoso (EG) de *Tithonia Diversifolia*, nas diferentes dosagens estudadas, com nível de confiança 95%, após 168 horas de exposição dos insetos.



Fonte: Autor (2022)

Assim, a imobilidade total dos organismos-teste após a exposição a concentrações superiores a 100 mg L⁻¹, demonstram a existência de uma forte evidência de compostos no extrato de *Tithonia diversifolia*, sendo que a concentração de 1000 mg/L⁻¹ indicou maior poder tóxico no controle eficaz de *Acanthoscelides obtectus*, que podem ter ação inseticida. A Figura 13 mostra que, quanto maior a concentração, maior é a taxa de mortalidade, sendo que, as taxas de mortalidade aumentaram significativamente com o aumento das doses a partir de 100mg L⁻¹ e do período de exposição, a partir do 3º dia.

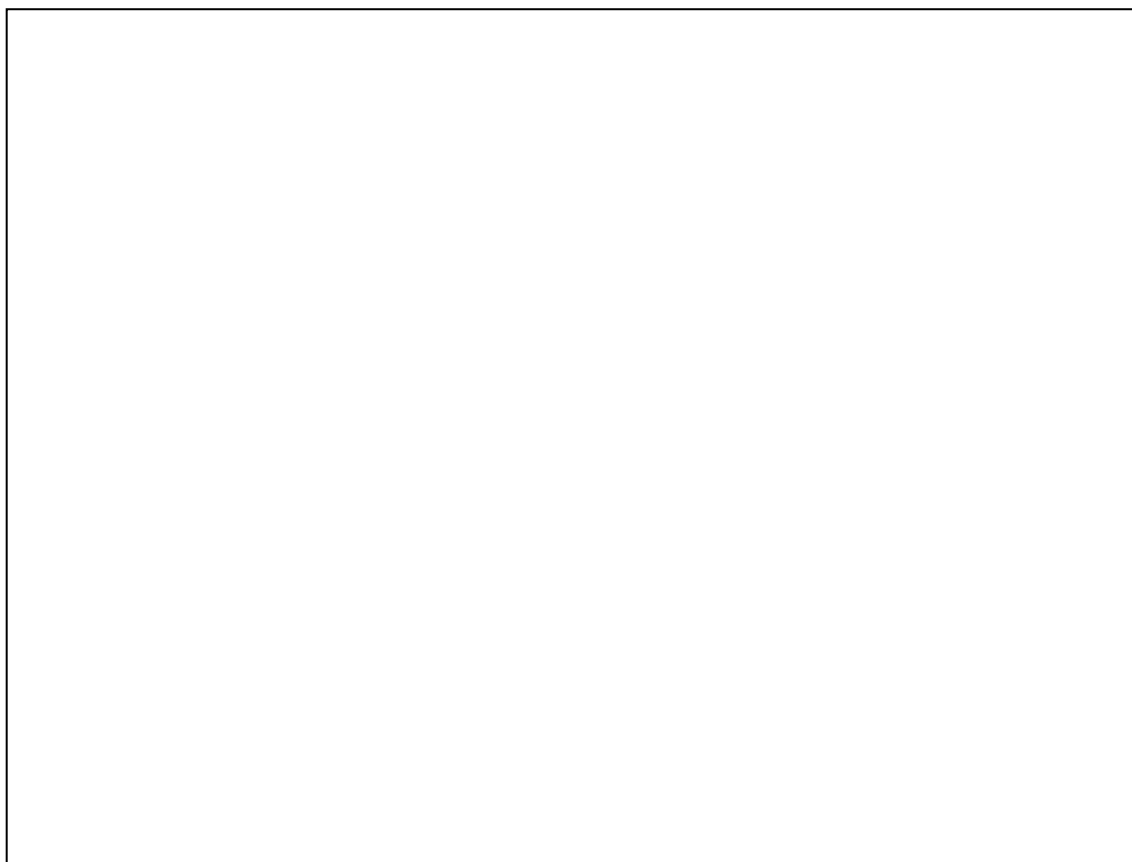
Tabela 6 - Valores previstos de DL₅₀ de *Acanthoscelides obtectus* utilizando EG.

Variável	Valores preditos (Mortalidade EG)		
	Variável: Concentração mg L ⁻¹		
	Peso	Valor	DL ₅₀
Previsto	1520,271	0,5	760,136
Previsto			-577,869
-95%			182,266
95%			132,638

Fonte: Autor (2022)

Pode-se notar na Tabela 7, que a dose letal necessária para atingir 50% de mortalidade de adultos de *Acanthoscelides obtectus* utilizando o EG, é de 182,266 mg/L⁻¹, como observado pela curva dose-resposta, estando entre as concentrações de 350 e 700mg L⁻¹, no qual obteve uma eficiência significativa em relação aos demais tratamentos. As mortes tiveram início já nas primeiras 24 a 48 horas após o tratamento, indicando que o extrato deve ter uma absorção bastante rápida nos tecidos de *Acanthoscelides obtectus*, levando à morte prematuramente dos mesmos (MARIZ *et al.*, 2006). Assim, a utilização do extrato pode alterar a forma como os produtos são utilizados para o controle de insetos-praga agrícolas (FORIM, *et.al*, 2013).

Figura 14- Curva dose-resposta de *Acanthoscelides obtectus* submetidos ao Extrato Sobrenadante (ES) de *Tithonia diversifolia*, nas diferentes dosagens estudadas, com



Fonte: Autor (2022)

O extrato sobrenadante ES nas condições experimentais utilizadas, mostrou eficiência para o controle do *Acanthoscelides obtectus*, no intervalo das doses 700 e 1000 mL L⁻¹ alcançando mortalidade de 50% dos insetos na concentração de 539,804 mg L⁻¹ conforme análise estatística.

Tabela 7 - Valores previstos de DL50 de *Acanthoscelides obtectus*, utilizando o ES

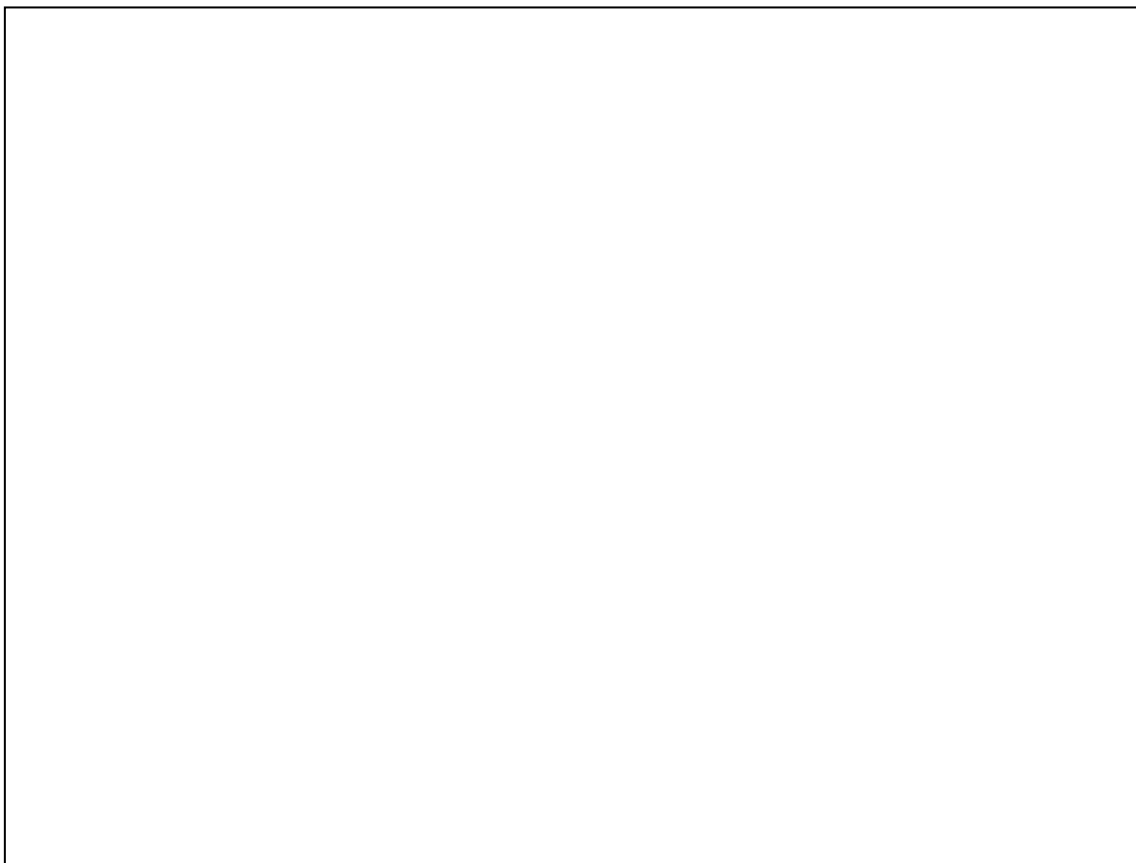
Variável	Valores preditos (Mortalidade ES)		
	Variável: Concentração mg L ⁻¹		
	Peso	Valor	DL ₅₀
Previsto	1868,528	0,5	934,264
Previsto			-394,460
-95%			539,804
95%			532,712

Fonte: Autor (2022).

O início de mortalidade nesse grupo, teve início a partir do terceiro dia de avaliação, houve uma redução dos grupos de animais tratados com o ES, mostrando uma menor concentração de compostos ativos do mesmo. No entanto, os insetos apresentaram alterações fisiológicas nas primeiras 48hs de avaliação, morrendo mais tardiamente dentro do período de 7 dias.

O desempenho obtido nos dois extratos em estudo, correspondeu aos resultados de Addedire e Akinneye (2004), em que realizaram um estudo com o extrato de *Tithonia diversifolia*, aplicado em *Callosobruchus maculatus*, um caruncho do feijão, e relataram que o extrato causou maior taxa de mortalidade nas duas maiores concentrações utilizadas pelos autores, logo em 24 horas após o tratamento. Já em relação as duas menores concentrações, os autores conseguiram taxa de mortalidade somente após 48h de exposição.

Figura 15- Curva dose-resposta de *Sitophilus* spp. submetidos ao Extrato Sobrenadante (EG) de *Tithonia diversifolia*, nas diferentes dosagens estudadas, com nível de confiança 95%.



A forma de aplicação dos extratos foi a mesma para os dois insetos. A diferença na mortalidade pode ser explicada por serem insetos mais resistentes tendo assim comportamentos diferenciados. A partir da realização da análise (Figura 15), para causar entre 70 e 100% de mortalidade de *Sitophilus* spp, seria necessário concentrações superiores a 2531,104 mg L⁻¹, dose que estaria entre a dose limite de aplicação segundo a OECD (2001).

Lacerda *et al.* (2011), estudaram os efeitos do extrato bruto etanoico de folhas e galhos de *Tithonia diversifolia*, também foram demonstrados nesta planta a presença de compostos bioativos no controle de microcrustáceos. Assim, a DL_{50-24h} deste material foi de aproximadamente 270 mg.L⁻¹ em náuplios de *Artemia salina*. Este

organismo-teste tem sido sugerido como organismo modelo na avaliação de extratos vegetais com potencial inseticida (VIDOTTO *et al.* 2013).

Tabela 8 - Valores previstos de DL₅₀ de *Sitophilus* spp, utilizando EG.

Valores preditos para (Mortalidade EG)			
Variável	variável: Concentração mg L ⁻¹		
	Peso	Valor	Peso- Valor
Previsto	3672,285	0,5	1836,142
Intercepto			-223,110
Previsto			1613,033
-95%			1527,245
95%			1698,821

Fonte: Autor (2022).

Figura 16- Curva dose-resposta de *Sitophilus* spp. submetidos ao Extrato Sobrenadante (ES) de *Tithonia diversifolia*, nas diferentes dosagens estudadas.

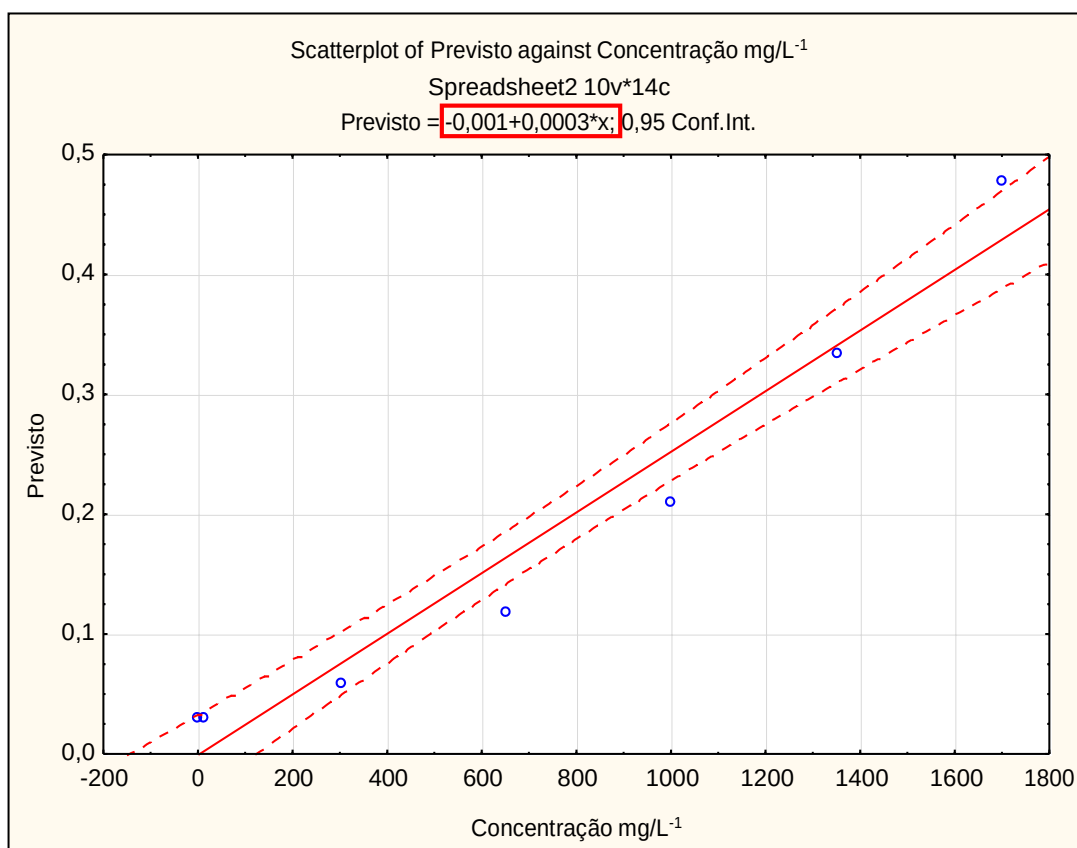


Tabela 9 - Valores previstos de DL₅₀ de *Sitophilus* spp., utilizando ES.

Variável	Valores preditos para (Mortalidade ES)		
	variável: Concentração mg L ⁻¹		
	Peso	Valor	Peso- Valor
Previsto	3765,895	0,5	1882,947
Intercepto			37,537
Previsto			1920,485
-95%			1731,864
95%			2109,106

Fonte: Autor (2022)

Sendo assim, de acordo com o guia 423 da OECD (2001), o extrato *Tithonia Diversifolia*, se enquadra na Classe 4, com toxicidade média (substância com DL₅₀ superior a 300 mg/L⁻¹ e menor que 2000 mg/L⁻¹). Nos ensaios realizados até 7 dias após a aplicação dos extratos, todos os tratamentos apresentaram 50% de mortalidade após 96 horas de exposição.

Cada vez mais, empresas e produtores rurais estão em busca de produtos que causem menos problemas aos seus produtos, por meio da tecnologia sustentável, produtos eficazes a fim de minimizar o ataque de pragas e doenças que podem comprometer a lavoura/armazenamento e também controlar plantas invasoras (EMBRAPA, 2022). Sendo assim, olhando pelo ponto de vista econômico e também ambiental, o uso de bioinsumos podem complementar, ou até mesmo substituir os defensivos químicos.

A utilização dos inseticidas sintéticos na agricultura não causa danos apenas a cultura, mas também para o solo, para o homem e meio ambiente quando aplicados em alta dosagem. O que explica a utilização de extratos vegetais, considerado como um bioinsumo no controle de pragas de grãos buscando minimizar a dependência de inseticidas sintéticos sobre as culturas (SANTOS *et al.*, 2020).

Conforme citado pela EMPRAPA (2022), o mercado de bioinsumos, só no ano de 2020 foi capaz de movimentar 1,2 bilhão de reais somente em defensivos químicos,

segundo dados da Croplife Brasil, associação que representa o setor. Isso, gera por ano, cerca de 13 bilhões de dólares no setor de controle biológico. Portanto, com a utilização de extratos vegetais esses custos podem diminuir por não necessitarem de matérias primas com demanda tão elevada.

Isman *et. al* (1996), definem deterrência alimentar como uma substância que modifica o comportamento que impede a alimentação por ação direta nos órgãos gustativos dos insetos. E isso pode ser comparado com os ensaios aqui realizados, sendo a substância que apresentou toxicidade letal ou subletal ao inseto, Tagitinina C presente nos extratos de *Tithonia Diversifolia*, que agiram em seu organismo, suprimindo a alimentação dos insetos nos grãos tratados.

Em síntese, esse chamado deterrente alimentar, apresenta um gosto não agradável para os insetos, sendo para alguns autores, uma substância que minimiza o consumo do alimento pelo inseto. Assim, a substancia acarreta em um distúrbio associado aos mecanismos sensoriais, e diminuindo a atração pelo alimento, ocasionando assim, deficiência nutricional, levando a mortalidade dos insetos (CORRÊA; VIEIRA, 2007).

Deste modo, a mortalidade de *Acanthoscelides obtectus* e *Sitophilus* spp pode ter sido causada por desnutrição visto que, o desenvolvimento dos mesmos depende quase que totalmente da quantidade de alimentos que são introduzidos diariamente, e essa carência, afeta significativamente na qualidade de vida, inicialmente os deixando debilitados e mais sensíveis, e posteriormente causando a morte.

Um estudo realizado por Dutta, Chaudhuri E Sharma (1993), mostrou que deterrentes alimentares foram identificados em *Tithonia diversifolia* (Hemsl) Gray (tagitinina A e C). Já em um estudo com *Sitophilus* e *Tribolium confusum* realizado por Szafranski, Bloszyk E Drozd (1993) relatam atividade deterrente alimentar da tagitinina C, para adultos de *Sitophilus* spp e *Tribolium confusum*.

6. CONCLUSÕES

Este estudo revelou que o extrato de *Tithonia diversifolia* age como um inseticida natural para insetos, teoricamente pela presença de tagitinina c, podendo efetivamente controlar *Sitophilus* spp em milho, e *Acanthoscelides obtectus* em feijão, proporcionando mortalidade nas concentrações de 182,266 mg L⁻¹ e 539,804 mg L⁻¹ para EG e ES respectivamente, em 7 dias de exposição para *Acanthoscelides obtectus*, já para concentrações de 1613,033 mg L⁻¹ e 1920,245 mg L⁻¹ para EG e ES respectivamente para *Sitophilus* spp, de acordo com a análise de DI₅₀- ProBit. Em relação as concentrações reais de mortalidade, EG, na concentração de 1000 mg L⁻¹, apresentou mortalidade de 90% dos insetos de *Acanthoscelides obtectus*, ES na concentração de 1000 mg L⁻¹, apresentou mortalidade de 70% dos insetos de *Acanthoscelides obtectus*. EG na concentração de 1700 mg L⁻¹, apresentou mortalidade de 50% dos insetos de *Sitophilus* spp e, na concentração de 1700 mg L⁻¹, apresentou mortalidade de 40% dos insetos de *Sitophilus* spp, Visto que o extrato que proporcionou maior mortalidade nos 7 dias de exposição foi o EG, por ter uma maior concentração do princípio ativo.

Com a análise química realizada, foram encontrados alcaloides, taninos, flavonoides, cumarinas, terpenos e saponinas, sendo que são metabólitos secundários que apresentam ação inseticida. Assim, houve toxicidade para os insetos avaliados, mostrando o potencial deste extrato para uso como inseticida natural, confirmando a atividade por meio da identificação dos compostos bioativos no extrato. Por fim, esta pesquisa permitiu descobrir um bioinsumo promissor quanto ao desenvolvimento tecnológico de extratos padronizados de *Tithonia diversifolia*, possuindo padrão compatível com o descrito na literatura, atestando a autenticidade do material vegetal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHÃO, A. J.; SILVA, G. A. Influência de alguns contaminantes na toxicidade aguda de efluentes da indústria têxtil. **Revista Química Têxtil**, v. 67, p. 8-34, 2002

Adams, R.P., 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/ Mass Spectrometry, 4th ed. Allured Publ., IL. Anastas, P.T., Warner, J.C., 1998. **Green Chemistry: Theory and Practice**. Oxford University Press.

ALMEIDA, Enrick. B.D. **Avaliação in vitro e in vivo da atividade antitumoral do extrato bruto obtido por fluido supercrítico da Tithonia diversifolia (Hemsl.) A.Gray**. 2018. 75 p. Sergipe, 2018. Disponível em: <https://openrit.grupotiradentes.com/xmlui/handle/set/3130>. Acesso em: 26 out. 2021.

ANTUNES, L.E.G.; DIONELLO, R.G. **Bioecologia de Sitophilus zeamais Motschulsky 1885 (Coleoptera: Curculionidae)**. 2010. Artigo em Hypertexto. Disponível em: http://www.infobibos.com/Artigos/2010_2/Sitophilus/index.htm. Acesso em: 21/2/2022

AYODELE, O; KOLAWOLE, A; OKONGI, R.E; AJELE, J.O. Tithonia diversifolia, Cyperus rotundus and Hyptis suaveolens ethanol extracts combinatorially and competitively inhibit affinity purified cowpea storage bruchid (Callosobrochus maculatus) glutathione S-transferase. **Arthropod-Plant Interaction**, Akure, Nigéria, p. 178-179, 29 mar. 2011. Disponível em: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.655.7289&rep=rep1&type=pdf>. Acesso em: 10 jan. 2022.

BALDIN, E.L.L. **Efeito do tempo e da temperatura de armazenamento de grãos de feijoeiro Phaseolus vulgaris L. na manifestação da resistência ao caruncho Acanthoscelides obtectus (Say 1831), (Coleoptera: Bruchidae)**. Universidade de São Paulo; 125 p., São Paulo, 2001. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59131/tde-12122001-120739/publico/teseEdsonBaldin.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2022.

BARUAH, N. C.; SARMA, J. C.; BARUA, N. C.; SARMA, S.; SHARMA, R. P.; **Phytochemistry** 1994, 36, 29

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. 6.ed., v.1, Brasília, DF: ANVISA, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira>. Acesso em: 13 de maio, 2019.

BREMER, K. 1994. **ASTERACEAE: CLADISTICS AND CLASSIFICATION**. TIMBER PRESS, PORTLAND, 429P. Disponível em:

<https://ia802806.us.archive.org/8/items/biostor-180995/biostor-180995.pdf>. Acesso em: 26. dez. 2021.

CAVALCANTE, G. M.; MOREIRA, A. F. C.; VASCONCELOS, S. D. Potencialidade inseticida de extratos aquosos de essências florestais sobre mosca-branca. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.41, n.1, p.9-14, jan. 2006.

CORREA, G.A; VIEIRA, C.P. Produtos naturais no controle de insetos. **Série de textos da escola de verão em Química**. 2. Ed. São Carlos. EdUFSCar, 2007.

COTTON, R. T.; WILBUR, D. A. Insects. In: Christensen, C. M. **Storage of cereal grains and their products**. St. Paul, Minnesota, AACC, 1974, p193-231.

DE ALMEIDA, R.C; JONSSON, C. M; CORNIANI, N.; DE ASSIS, M. C; QUEIROZ, S. C. N. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DE EXTRATO DE *Tithonia diversifolia*. **Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica**, São Paulo, p. 6-7, 10 ago. 2015. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1036449/avaliacao-da-atividade-inseticida-de-extrato-de-tithonia-diversifolia>. Acesso em: 13 ago. 2021.

DEQUECH, S. T. B.; SAUSEN, C. D.; LIMA, C.G.; EGEWARTH, R.; Efeito de extratos de plantas com atividade inseticida no controle de *Microtheca ochroloma* Stal (Col.: Chrysomelidae), em laboratório: **Revista Biotemas**, Santa Maria. 2008. p.22-31

DUTTA, P.; CHAUDHURI, R.P.; SHARMA, R.P. Insect feeding deterrents from *Tithonia diversifolia* (Hemsl) Gray. **Journal of Environ Biology** , v14, n 1, p 27-33,1993.

EMBRAPA. **Insumos Biológico: Menos insumos sintéticos, mais economia e maior sustentabilidade**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2022. Disponível em: <https://www.embrapa.br/portfolio/insumos-biologicos>. Acesso em: 30.março.2022.

EVANS, D. E. The biology of stored products Coleoptera. In: **Proc. Aust. Dev. Asst.** Course on Preservation of Stored Cereals, 1981, p.149-185.

FORIM, MR; COSTA, ES; SILVA, MFGF; FERNANDES; JB; MONDEGO, JM; JUNIOR, ALB; Development of a New Method To Prepare Nano-/microparticles Loaded with Extracts of *Azadirachta indica*, Their Characterization and Use in Controlling *Plutella xylostella*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 2013. Disponível em < <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf403187y>>. Acesso em 11.abr.2022.

FREITAS, B.M.; PINJEIRO, J.N. Efeitos sub-letais dos pesticidas agrícolas e seus impactos no manejo de polinizadores dos agroecossistemas Brasileiros. **Oecologia Australis**, v.14, n.1, p. 282-289, 2010.

GALLO, D.; NAKANO, O.; NETO, S.S; CARVALHO, R.P.L; BAPTISTA, G.C; FILHO, E.B; PARRA, J.R.P; ZUCCHI, R.A; ALVES, S.B; VENDRAMIM, J.D; MARCHINI, L.C; LOPES, J.R.S; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Esalq: Fealq, 2002. 919 p.

GALLO, D.; NAKANO, O.; WIENDL, F.M.; SILVEIRA NETO, S. & CARVALHO, R.P.L. (1970). **Manual de Entomologia** —pragas das plantas e seu controle. Ed. Agron. Ceres, São Paulo. 858 pp.

HALSTEAD, D. External sex differences in stored-products Coleoptera.

Bulletin of Entomological Research, v.54, 119-134, 1963.

ISMAN, M.B.; MATSUURA, H.; MacKinnon, S.; DURST, T.; TOWERS, G.H.N.; ARNASON, J.T.; Phytochemistry of the Meliaceae: So many terpenoids, so few insecticides, **Rec. Adv. Phytoch.** 30: 155, 1996.

LIMA, B. M. F. V.; MOREIRA, J. O. T.; ARAGÃO, C. A. Evaluation of plant extracts in the control of whitefly *Bemisia tabaci* biotype B in squash. **Revista Ciência Agronômica, Fortaleza**, v. 44, n.1, p. 622-627. 2013.

KWABIAH, A.B.; PALM, C.A.; STOSKOPF, N.C.; VORONEY, R.P. Response of soil microbial biomass dynamics to quality of plant materials with emphasis on P availability. **Soil Biology & Biochemistry**, v.35, n.2, p.207-216, 2003

LACERDA, A. M.; MODOLO, A. K.; MATIAS, R. C.; PISTORI, H.; YANO, M.; ROEL, A. R.; PORTO, K. R. A. Screening de plantas com potencial fitotóxico. **Revista Brasileira de Farmácia** v. 92, n. 4, p. 352-355, 2011.

Loeck, A. E. **Praga de Produtos Armazenados**. Pelotas, RS, EGUFPEL, 113p., 2002.

MACHADO, L.A; SILVA, V.B.e; OLIVEIRA, M.M. USO DE EXTRATOS VEGETAIS NO CONTROLE DE PRAGAS EM HORTICULTURA. **Instituto Biológico, Centro Experimental Central do Instituto Biológico de Campinas**, Campinas SP, v. 69, ed. 2, p. 103-106, 7 dez. 2021. Disponível em: http://www.biológico.sp.gov.br/uploads/docs/bio/v69_2/p103-106.pdf. Acesso em: 6 dez. 2021.

MADUREIRA, M. INVESTIGAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS ANTIMALÁRICAS USADAS NA MEDICINA TRADICIONAL DE S. TOMÉ E PRÍNCIPE. **Plantas Medicinais e Práticas Fitoterapêuticas nos Trópicos**, Lisboa- Portugal, 13 jan. 2009. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/273959697_INVESTIGACAO_DE_PLANTAS_MEDICINAIS_ANTIMALARICAS_USADAS_NA_MEDICINA_TRADICIONAL_DE_S_TOME_E_PRINCIPE. Acesso em: 1 fev. 2022.

MARIANI, C.F. Ecotoxicologia. **Portal de Ecologia Aquática**, [s. l.], 2006. Disponível em:

http://ecologia.ib.usp.br/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=143&Itemid=419. Acesso em: 14 fev. 2022.

MIRANDA, M.a.F.M. **Atividades Biológicas de duas espécies de Myrsine L.(PRIMULACEAE) e de Thitonia Diversifolia (Helms.)A. Gray (ASTERACEAE).** 2015. Tese (Doutorado) - UFSC São Paulo, 2015. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/1855/6774.pdf?sequence=1>. Acesso em: 13 jan. 2022.

MOHAPATRA, D.; RAO, P. S. A thin layer drying model of parboiled wheat. **Journal of Food Engineering**, Índia v.66, n 4., p.513-18, 2005.

PANDEY, A.; TRIPATHI, S. Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. **Journal of pharmacy phytochemistry**. v. 2, n. 5, p. 115-9, 2014. Disponível em: <http://www.phytojournal.com/vol2Issue5/11.1.html>. Acesso 08.dez 2021

PAVELA, R; ACQUA, S.D; SUT, S.; BALDAN, V.; KAMTE, S.L.N; NYA, P.C.B; CAPPELLACCI, L.; PETRELLI, R.; NICOLETTI, M.; CANAL, A.; MAGGI, F.; BENELLI, G. Oviposition inhibitory activity of the Mexican sunflower *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) polar extracts against the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* (Tetranychidae). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Pisa, Itália, v. 101, p. 85-92, 7 2016. Disponível em: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0885576516301461?token=2E1666AE09A180FBC756F3B59D00139D05A8F3F561C9E0EB3E3EE2D9DCDFDCCF6DAC111416102A6E856A12D6EF95FE6E&originRegion=us-east-1&originCreation=20220203124130>. Acesso em: 2 fev. 2022.

PEREIRA, P.R.V.S. Principais insetos que atacam grãos armazenados. In: SIMPÓSIO DE PROTEÇÃO DE GRÃOS ARMAZENADOS, 1993, Passo Fundo, RS. **Anais**. Passo Fundo: Embrapa-CNPT, 1993. p.104-116

GOFFIN, E; CUNHA, A.P; ZIEMONS, E; TITS, M; ANGENOT, L; FREDERICK, M. PHYTOCHEM. **ANAL**, 2003, Bélgica. Quantification of tagitinin C in *Tithonia diversifolia* by reversed-phase high-performance liquid chromatography [...]. Universidade de Liège: [s. n.], 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14667065/>. Acesso em: 4 maio 2022.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT - OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals, **OECD 423**. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development; 2001. Picman, A. K.; Biochem. Syst. Ecol. 1986, 14, 255.

PREMARATNE, S.; BRUCHEM, J.; CHEN. X.B.; PERERA, H.G.D.; OOSTING, S.J.; VAN-BRUCHEM, J.; PREMARATNE, S. Effects of type and level of forage supplementation on voluntary intake, digestion, rumen microbial protein synthesis and

growth in sheep fed a basal diet of rice straw and cassava. **Asian Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 11, n. 6, p. 692-696, 1998.

RIGORI, Pedro. Afinal, o Brasil é o maior consumidor de agrotóxico do mundo. **Centro de Estudos Estratégicos da Fiocruz Antonio Ivo de Carvalho** (CEE-Fiocruz). Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <https://cee.fiocruz.br/?q=node/1002>. Acesso em: 22 fev. 2022.

ROCHA, B.A. **Transformações microbianas da lactona sesquiterpênica tagitinina**. C. 2009. Dissertação- Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. p. 87

ROCHA, C.V.J. **Extratos vegetais no controle do caruncho do feijão**. Universidade Federal do Rio Grande, 2017.p.33

RODRIGUES, F.A; PIMENTA, V.S.C.; BRAGA, K.M.S.; ARAÚJO, E.G. OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE PLANTAS DO CERRADO: **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer, 2016. 18 p. v. 13. Disponível em: <https://www.conhecer.org.br/enciclop/2016a/agrarias/obtencao%20de%20extratos.pdf>. Acesso em: 6 dez. 2021.

ROEL, A.R.; VENDRAMIM, J.D.; FRIGHETTO, R.T.S. e FRIGHETTO, N. Atividade tóxica de extratos orgânicos de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.29. p.799-808. 2000.

ROSALES, M. **Nutritional value of colombian fooder trees. Internal Report**: Fundación Centro para la Investigación en Sistemas Sostenibles de Producción Agropecuária and Natural Resources Institute. United Kingdon. 50 p. 1992.

SAMPAIO, B.L. **Estudo da influência dos fatores ambientais e da variação sazonal dos metabólitos de *Tithonia diversifolia* (Hemls.) A. Gray e avaliação da atividade antioxidante, fotoprotetora e fotoquimiopreventiva dos extratos in vitro**. Ribeirão Preto; SP, 2015. p. 31. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60138/tde-03052017-165352/publico/Tese_simplificada_original.pdf. Acesso em: 20 jan. 2022.

SANTOS, B.M.S.; SILVA, M.S.R.A.; CHÁVEZ, D.W.H.; RIGOBELLO, E.C. Genetic and nutritional diversity of *Bacillus subtilis* isolates demonstrating different aspects related to plant growth promotion. **Australian Journal of Crop Science**, UNESP,UFRJ, p. 880-888, 2020. Disponível em: https://www.cropj.com/santos_14_5_2020_880_888.pdf. Acesso em: 30 mar. 2022

SARRIA, P.; ROSERO, P.M.; MURGUEITIO, E.R. Desarrollo de Sistemas sostenibles de Producción de cerdos usando recursos tropicales disponibles al nivel de finca. **CIPAV y SINTAP PRONATTA**, Cali, 1999. 100p.

SBFGNOSIA- Sociedade Brasileira de Farmacognosia. Controle de Qualidade Farmacognóstico de Matéria-prima Vegetal. *In: Controle de Qualidade Farmacognóstico de Matéria-prima Vegetal*. Londrina, 2009. Disponível em: http://www.sbfgnosia.org.br/Ensino/cq_materia_prima_vegetal.html. Acesso em: 17 maio 2022.

SILVA, Paula. C.D.S.C. **Efeito da variação sazonal na produção de compostos ativos em *Tithonia diversifolia* (HEMSL) GRAY , utilizando ensaios com microrganismos**. Dissertação (Mestrado), 46 p. USP, São Paulo 2004. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11144/tde-09112004-165625/publico/paula.pdf>. Acesso em: 26 out. 2021.

SILVA, P. B. **Análise fitoquímica de *tithonia diversifolia* cultivada no herbário de plantas medicinais do hospital universitário (hu)**. 2003. 56 p. UFSC, 2003. Disponível em: <https://core.ac.uk/download/pdf/30385336.pdf>. Acesso em: 7 mar. 2022.

SILVA A.M, FERREIRA N.L, OLIVEIRA A.E, BORGES L.L, CONCEIÇÃO E.C. Comparison of ultrasound-assisted extraction and dynamic maceration over content of tagitinin C obtained from *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. gray leaves using factorial design. **Pharmacognosy Magazine**, V.13, Ed. 50, 2017. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11144/tde-09112004-165625/publico/paula.pdf>. Acesso em: 26 out. 2021.

SZAFRANSKI, F; BLOSZYK, E; DROZDZ, B. Deterrent activity of African plant extracts against selected stored. Product inset pests. **Acta Horticulturae** , n.331, p.319-322, 1993.

VIDOTTO, C., SILVA, D.B.; PATUSSI, R.; BRANDÃO, L.F.G.; TIBURCIO, J.D.; ALVES, S.N.; SIQUEIRA, J.M.. . Brine shrimp lethality test as a biological model for preliminary selection of pediculicidal components from natural source. **Bioscience Journal** , v. 29, n. 1, p. 255-263. 2013

ANEXOS

Tabela 10 - Mortalidade de *Acanthoscelides obtectus*, submetidos à extrato líquido, EG de *Tithonia diversifolia*

Extrato Graxoso (EG)							
Doses (mg/L-1) —	Mortalidade em DAA						
	1	2	3	4	5	6	7
10	0	0	0	1	1	1	1
	0	0	1	1	1	0	2
	0	0	0	1	1	1	0
100	0	0	0	1	2	1	2
	1	0	1	2	1	1	0
	0	1	1	1	2	2	0
350	0	0	0	2	2	2	3
	0	0	0	1	4	2	1
	0	1	0	3	2	1	2
700	1	0	0	2	4	1	1
	1	1	0	2	1	1	1
	0	1	2	1	1	1	2
1000	2	0	0	1	4	1	1
	0	0	1	1	3	2	2
	1	2	1	0	2	1	2

EG: Extrato Graxoso; DAA: Dias Após Aplicação

Fonte: Autor (2022).

Tabela 11-Mortalidade de *Acanthoscelides obtectus*, submetidos à ES de *Tithonia diversifolia*.

Doses (mg/L)	—	Extrato Sobrenadante (ES)						
		Mortalidade em DAA						
		1	2	3	4	5	6	7
10		1	1	1	1	1	1	1
		0	0	0	1	1	1	1
		0	0	1	0	1	0	1
100		1	2	0	1	1	2	0
		0	1	1	1	1	2	1
		0	1	0	1	1	1	1
350		0	1	0	1	3	1	1
		1	1	1	1	0	2	1
		0	0	0	1	4	1	1
700		0	1	1	1	2	2	1
		1	1	0	1	2	1	1
		1	0	1	1	2	2	0
1000		1	1	2	2	1	1	0
		1	0	1	1	2	2	1
		0	0	2	1	2	1	2

ES: Extrato Sobrenadante; DAA: Dias Após Aplicação

Fonte: Autor (2022).

Tabela 12- Mortalidade de *Sitophilus spp.*, submetidos à extrato EG de *Tithonia*

Doses (mg/L)	—	Extrato Graxoso (EG)						
		Mortalidade em DAA						
		1	2	3	4	5	6	7
300		0	1	1	1	0	1	0
		0	0	0	0	1	0	1
		0	1	0	0	0	1	1
650		0	0	0	0	0	0	1
		1	1	0	1	1	0	1
		0	0	1	0	0	1	0
1000		1	1	0	1	0	1	1
		0	0	0	2	1	0	0
		0	0	0	0	1	0	1
1350		1	1	1	2	1	1	1
		0	0	0	1	0	0	1
		0	0	1	1	1	1	1
1700		1	1	2	1	1	1	1
		0	1	1	2	0	1	2
		0	0	0	0	2	1	0

diversifolia

EG: Extrato Graxoso; DAA: Dias Após Aplicação

Fonte: Autor (2022).

Tabela 13- Mortalidade de *Sitophilus spp*, submetidos à ES de *Tithonia diversifolia*

Doses (mg/L)	—	Extrato Sobrenadante (ES)					
		<u>Mortalidade em DAA</u>					
		1	2	4	5	6	7
300		0	0	0	0	0	1
		0	0	0	0	0	0
		0	1	0	0	1	0
650		0	0	0	0	1	0
		0	1	0	0	0	1
		0	0	0	0	0	0
1000		0	1	0	0	1	1
		0	0	0	1	1	0
		0	0	1	1	0	0
1350		0	1	1	0	0	1
		0	0	0	0	2	1
		0	0	0	1	1	0
1700		0	0	0	1	1	1
		1	0	0	0	1	1
		0	0	1	1	0	1

ES: Extrato Sobrenadante; DAA: Dias Após Aplicação

Fonte: Autor (2022).