



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DE EXTRATO DE *Tithonia diversifolia*

Rodrigo C. de Almeida¹; Claudio M. Jonsson²; Natália Corniani³; Marta C. de Assis⁴; Sonia C. N. Queiroz⁵

Nº 15408

RESUMO - Recentemente a disseminação da lagarta *Helicoverpa armigera* trouxe grande preocupação à cadeia produtiva de soja devido aos danos produtivos e econômicos causados. Assim, há necessidade urgente de se obter o controle desta praga, de preferência usando processos sustentáveis. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial inseticida do extrato aquoso de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) com intuito de se obter um biopesticida eficiente e com baixo risco ambiental e à saúde humana. Para isso foi realizado o bioensaio com microcrustáceos *Daphnia magna*, onde foi avaliada a imobilidade dos organismos em três concentrações do extrato aquoso. Este bioensaio foi selecionado por ser mais rápido, mais simples e usar menos quantidade de extrato, quando comparado ao ensaio com o organismo-alvo, a lagarta *H. armigera*. Além disso, a criação da lagarta mostrou ser bastante difícil de ser mantida em condições laboratoriais. Como resultado, houve toxicidade para o microcrustáceo avaliado nas concentrações de 100 e 1.000 mg.L⁻¹, mostrando o potencial deste extrato para uso como inseticida natural. A confirmação com o organismo-alvo será avaliada futuramente, bem como o isolamento e identificação dos compostos bioativos.

Palavras-chaves: *Daphnia magna*, inseticida, *Helicoverpa armigera*, extratos de plantas.

1 Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Engenharia de Controle e Automação, FAJ, Jaguariúna-SP; rcalmeida13@gmail.com

2 Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP, Dr. em Biologia Funcional e Molecular.

3 Dra. em Agronomia.

4 Pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP, Dra em Botânica.

5 Orientadora: Pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP, Dra em Química Analítica, sonia.queiroz@embrapa.br.



ABSTRACT- Recently, the spread of *Helicoverpa armigera* caterpillar caused great concern to the productive soy chain due to the productive and economic damages. Thus, there is an urgent need to get control of this pest, preferably using sustainable processes. The objective of this study was to evaluate the insecticide potential of the aqueous extract of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) in order to obtain an efficient biopesticide with low environmental risk and low risk against to human health. For this, it was held the bioassay with the microcrustacean *Daphnia magna* that was exposed to three concentrations of the aqueous extract. In this exposure was evaluated the immobility of the organisms. This bioassay was selected because it is quicker, simpler and use less amount of test extract compared to the test against the target organism, the caterpillar *H. armigera*. Furthermore, the caterpillar growth in laboratory conditions proved to be quite difficult to be maintained. The results showed that there was toxicity to the microcrustacean at 100 and 1,000 mg.L⁻¹, showing the potential of this extract for use as a natural insecticide. A confirmation with the target organism will be assessed in the future as well as the isolation and identification of bioactive compounds.

Key-words: *Daphnia magna*, insecticidal, *Helicoverpa armigera*, botanicals.

1. INTRODUÇÃO

Recentemente a disseminação da lagarta *Helicoverpa armigera* causou grande preocupação à cadeia produtiva de soja (dentre outras), ocasionando danos produtivos e econômicos. Assim, há uma necessidade urgente de se obter o controle desta praga, de preferência usando processos sustentáveis, de baixo risco ao ambiente e à saúde humana. Assim, a fim de reduzir infestações de lagartas em cultivos agrícolas, estudos vêm sendo realizados utilizando recursos naturais à procura de compostos químicos bioativos presentes em plantas e/ou microrganismos que possam ser utilizados como inseticidas naturais (biopesticida). A planta a ser estudada é a *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, planta herbácea, pertencente à família Asteraceae, tribo Heliantheae, conhecida popularmente como margaridão, girassol mexicano, entre outros. Originária da América Central, é encontrada em diversos países da Ásia, África e América do Sul (SCHUSTER et al., 1992). No Brasil é amplamente distribuída, colonizando ambientes abertos como matas ciliares, beiras de estrada, capoeirões e terrenos baldios, facilitando dessa forma a sua coleta e estudo.



9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015
10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo

Dentre os usos desta planta, destacam-se o medicinal, pois possui comprovada atividade antimalárica e antifúngica; o forrageiro, pela presença de xantofilas, entre outros; o ornamental; o melífero; o adubo verde, devido às altas concentrações de fósforo e potássio em sua biomassa e inseticida, relacionados principalmente à presença de metabólitos secundários como lactonas sesquiterpênicas e flavonóides encontrados nas folhas e hastes (SCHUSTER et al., 1992; OYEWOLE et al., 2008).

De fato, a família desta planta apresenta diversos constituintes químicos como poliacetilenos, lactonas sesquiterpênicas, óleos essenciais voláteis, terpenóides, monoterpenos, alcalóides, látex com triterpenos, saponinas, triterpenóides (EVANS, 2002) e flavonóides (MARKHAM, 1982). Isso faz com que as espécies apresentem grande potencial químico e biológico, responsável pela importância econômica da família tanto na medicina tradicional, como em produtos alimentícios, produção de cosméticos e biopesticidas.

Para a avaliação de atividade inseticida é necessário testar o extrato, idealmente com o organismo-alvo, neste caso a lagarta *H. armigera*. Entretanto, a criação da mesma tem apresentado uma série de problemas e, por isso, houve a necessidade de realizar o teste em outro organismo. Para isso foi selecionado o microcrustáceo *Daphnia sp*, que é um organismo bioindicador que consta no “Manual de testes para a avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos” (IBAMA, 1988). Ele é utilizado em estudos para o registro de agroquímicos junto às agências reguladoras do Brasil. A alta sensibilidade destes organismos a inseticidas químicos tem sido relatada amplamente na literatura, com valores de concentração efetiva média (CE50) na ordem de algumas $\mu\text{g.L}^{-1}$, sendo considerados assim como “extremamente tóxicos” para cladóceros (USEPA, 1985). Assim por exemplo, inseticidas pertencentes a diferentes grupos químicos como o organoclorado lindano, o piretróide fenvalerato e os organofosforados, clorpirifos e parathion apresentaram valores de CE50-48h equivalentes a 0,06 (CALLEJA et al., 1994); 0,83 (DAY; KAUSHIK, 1987), 0,37 e 6,35 $\mu\text{g L}^{-1}$ (AYDIN et al., 2011), respectivamente. Isto deve-se ao fato dos microcrustáceos serem artrópodes assim como os insetos, sendo que ambos divergiram de um ancestral comum, e portanto, as características genômicas foram conservadas (COLBOURNE et al., 2011; BOORE et al., 1998). Assim, testes de toxicidade aguda em *Daphnia sp* têm sido incluídos por órgãos regulatórios internacionais como requerimento básico na avaliação de risco de inseticidas químicos e outros materiais com atividade inseticida (BROCK; VAN WIJNGAARDEN, 2012).



9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015 10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial inseticida do extrato aquoso de *T. diversifolia*. Para isso foi realizado o bioensaio com o microcrustáceo *Daphnia magna*, onde foi avaliada a imobilidade dos organismos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Flores e folhas de *T. diversifolia* foram coletadas na Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP. O material foi seco em estufa de secagem com circulação de ar forçado a 30 °C por 7 dias. Após a secagem o material foi moído em moinho de facas no Laboratório de Resíduos e Contaminantes da mesma Unidade.

2.2 Extração

Uma massa de 20 g de amostra foi submetida à extração sequencial com os seguintes solventes: n-hexano, diclorometano, metanol e água. O volume de cada solvente foi de 120 ml. Cada etapa da extração durou cerca de 24 h, sob agitação constante. Transcorrido o período de extração com cada solvente foi realizada a filtração a vácuo com funil de Büchner e papel filtro. Os solventes foram evaporados sob pressão reduzida com o auxílio de um rotaevaporador. O extrato aquoso foi liofilizado durante 7 dias até a remoção completa da água.

2.3 Material-teste

Extrato aquoso, obtido após a extração sequencial.

2.4 Preparo para teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna*

Foram pesados 33,5 mg do extrato aquoso liofilizado de *T. diversifolia* em um eppendorff e foram adicionados 0,6 ml de uma solução de dimetilsulfoxido (DMSO) ($5 \mu\text{L mL}^{-1}$) como adjuvante de solubilidade. A solução contendo o extrato foi preparada pela transferência para um recipiente contendo um volume total de 20 mL de água reconstituída para o cultivo de *Daphnia sp* (JONSSON ; MAIA, 1999). Esta solução estoque foi utilizada para a preparação das soluções-teste.

2.4.1 Organismos-teste e exposição

D. magna: Utilizaram-se organismos com idade inferior a 24 horas. O invertebrado foi previamente cultivado em aquários de dimensões iguais a 40 x 25 x 15 cm, com água reconstituída com as seguintes características físico-químicas: pH 7,6, dureza total 111,2 mg de $\text{CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ e



9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015 10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo

condutividade $0,37 \text{ mS.cm}^{-1}$. Os organismos foram mantidos em sala climatizada sob temperatura controlada a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, luminosidade de $\sim 1.000 \text{ lux}$ e alimentados com algas das espécies *Pseudokirchneriella subcapitata*.

Delineamento experimental:

Neonatos de *D. magna* foram expostos a soluções-teste contendo o extrato nas concentrações de 10, 100 e 1.000 mg.L^{-1} . A concentração de DMSO em cada concentração-teste foi equivalente $0,1 \text{ g L}^{-1}$, o que corresponde à concentração máxima a ser utilizada conforme protocolo da OECD (1984). Paralelamente, os organismos foram expostos a soluções isentas do material-teste e contendo a mesma concentração de DMSO (controle).

Os microcrustáceos foram alocados em placas de poliestireno tipo “multiwell plate”, contendo 12 poços em um volume total de 5 mL de solução-teste. O ensaio foi realizado em réplicas de 12 poços para cada concentração avaliada, sendo que cada um destes continha 2 organismos-teste, perfazendo, assim, um total de 24 organismos por concentração-teste. Os organismos foram expostos nas mesmas condições de luminosidade e temperatura descritas anteriormente e não foram alimentados durante esta fase de exposição aos extratos.

Após os períodos de 24 e 48 h foi avaliada a mobilidade dos organismos-teste em cada unidade experimental para a comparação frente ao controle.

Para análise estatística utilizou-se o módulo “One Way Anova” do programa Statgraphics Centurion Version 17.1.04 onde aplicou-se o teste Kruskal-Wallis para a comparação de medianas através do procedimento de Bonferroni.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados dos bioensaios realizados com o extrato aquoso de *T. diversifolia* contra *D. magna*. Este bioensaio foi selecionado por ser sensível, mais rápido, mais simples e usar menos quantidade de extrato quando comparado ao ensaio contra o organismo-alvo, a lagarta *H. armigera*. Além disso, a criação e manutenção da lagarta mostrou ser bastante difícil de ser mantido.

Para as 24 h de exposição, detectou-se diferença significativa ($p < 0,05$) quanto à mobilidade somente na exposição a 1.000 mg.L^{-1} , em relação ao controle. A mobilidade na concentração de 10 mg.L^{-1} foi idêntica ao controle, não se constatando organismo com imobilidade. Já na concentração



9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015
10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo

de 100 mg.L⁻¹ registrou-se 25% de organismos com imobilidade, sendo não significativa em relação ao controle. Porém, nesta concentração, foi significativa para as 48 h de exposição. Assim como a concentração de 1.000 mg L⁻¹, onde também 100% dos organismos-teste foram imobilizados.

Portanto, para ambos os tempos de exposição, na maior concentração avaliada, os resultados demonstraram 100% de imobilidade em relação ao controle. Esta total imobilidade também foi registrada na concentração de 100 mg L⁻¹, mas somente para o maior tempo de exposição, o que sugere a importância do fator tempo para a manifestação do efeito adverso.

Tabela 1. Número de organismos móveis de *D. magna* expostos a diferentes concentrações do extrato aquoso de *Tithonia diversifolia*. O número inicial (0h) foi de 2 organismos por réplica.

Réplica	Controle		10 mg.L ⁻¹		100 mg.L ⁻¹		1.000 mg.L ⁻¹	
	24 h	48h	24 h	48h	24 h	48h *	24 h *	48h *
1	2	2	2	1	2	0	0	0
2	2	2	2	2	2	0	0	0
3	2	2	2	2	2	0	0	0
4	2	2	2	2	2	0	0	0
5	2	2	2	2	1	0	0	0
6	2	2	2	1	2	0	0	0
7	2	2	2	2	2	0	0	0
8	2	1	2	2	1	0	0	0
9	2	2	2	2	1	0	0	0
10	2	2	2	2	1	0	0	0
11	2	2	2	2	1	0	0	0
12	2	2	2	2	1	0	0	0

* diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

Assim, a imobilidade total dos organismos-teste após a exposição a concentrações de 100 e 1.000 mg L⁻¹, demonstram a existência de uma forte evidência da presença de compostos bioativos no extrato aquoso de *T. diversifolia* que podem ter ação inseticida.

Segundo os trabalhos de Lacerda et al. (2011), que estudaram os efeitos do extrato bruto etanólico de folhas e galhos de *T. diversifolia*, também foram demonstrados nesta planta a



**9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015
10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo**

presença de compostos bioativos em microcrustáceos. Assim, a CL₅₀-24h deste material foi de aproximadamente 27 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). Entretanto, a literatura relata que é menos susceptível que *Daphnia sp* à ação de agentes tóxicos (CALLEJA et al., 1994).

4 CONCLUSÃO

Houve toxicidade para o microcrustáceo avaliado, mostrando o potencial deste extrato para uso como inseticida natural, embora a confirmação da atividade com o organismo-alvo, o isolamento e a identificação dos compostos bioativos não tenham sido avaliados.



9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015
10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pela bolsa concedida.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AYDIN, M. E.; BEDUK, F.; OZCAN, S. Acute toxicity of organophosphorus pesticides and their degradation by-products to *Daphnia magna*, *Lepidium sativum* and *Vibrio fischeri*. **INTECH Open Access Publisher**, p. 261-276, 2011.

BOORE, J.L.; LAVROV, D.V.; BROWN, W.M. Gene translocation links insects and crustaceans. **Nature**, v. 392, p. 667-668, 1998.

BROCK, C. M.; VAN WIJNGAARDEN, R. P. A. Acute toxicity tests with *Daphnia magna*, *Americamysis bahia*, *Chironomus riparius* and *Gammarus pulex* and implications of new EU requirements for the aquatic effect assessment of insecticides. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, p. 3610–3618, 2012.

CALLEJA, M. C.; PERSSONE, G.; GELADI, P. Comparative acute toxicity of the first 50 multicentre evaluation of in vitro cytotoxicity chemicals to aquatic non-vertebrates. **Archives of Environmental Contamination Toxicology**, v. 26, p. 69-78, 1994.

COLBOURNE, J. K.; PFRENDER, M. E.; GILBERT, D.; THOMAS, W. K.; TUCKER, A.; OAKLEY, T. H. The ecoresponsive genome of *Daphnia pulex*. **Science**, v. 331, n. 6017, p. 555-561, 2011.

DAY, K.; KAUSHIK, N. K. Short-term exposure of zooplankton to the synthetic pyrethroid, fenvalerate, and its effects on rates of filtration and assimilation of the alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 16, n. 4, p. 423-432, 1987.

EVANS, W.C. **Trease and Evans' pharmacognosy**. Toronto: W. B. Saunders, p.297, 2002.

IBAMA. **Manual de testes para a avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos**. Secretaria do Meio Ambiente. Brasília, 1988, 351p.

JONSSON, C. M.; MAIA, A. H. N. **Protocolo de avaliação de agentes microbianos de controle de pragas para registro como biopesticidas: uma proposta para os órgãos federais registrantes: toxicopatológicos em organismos não alvo do ambiente aquático: organismos zooplanctônicos, fitoplanctônicos e vertebrados**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1999. 33 p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 11).

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.

MARKHAM, K. P. **Techniques of flavonoid identification**. London: Academic Press, 1982, 144p.

OECD. **Guidelines for testing of chemicals. *Daphnia sp.*, acute immobilization test and reproduction test, n. 202**. Organization for Economic Co-operation and Development, Paris, 1984.

OYEWOLE I.O.; IBIDAPO, C. A.; MORONKOLA, D.O.; ODUOLA, A.O.; ADEOYE, G.O.; ANYASOR, G.N.; OBANSA, J.A. Anti-malarial and repellent activities of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) leaf extracts. **Journal of Medicinal Plants Research** v. 2, n. 8, p. 171-175, 2008.



9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015
10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo

SCHUSTER, A; STOKES, S.; PAPASTERGIOU, F.; CATRO, V.; POVEDA, L.; JAKUPORIC, J. Sesquiterpene lactones from *Tithonia* species. **Phytochemistry** v.31, p. 3139-3141, 1992.

USEPA. United States Environmental Protection Agency.. Hazard Evaluation Division. **Standard evaluation procedure:** acute toxicity test for freshwater invertebrates. Washington, D.C., 1985. 12 p.

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.