

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS
QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS

DENISE WERMUTH

DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
MICROBIOLÓGICA EM EXTRATOS DE *Conyza bonariensis* E TESTE DE
TOXICIDADE FRENTE *Plutella xylostella*

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PATO BRANCO

2023

DENISE WERMUTH

DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E MICROBIOLÓGICA EM EXTRATOS DE *Conyza bonariensis* E TESTE DE TOXICIDADE FRENTE *Plutella xylostella*

DETERMINATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS, ANTIOXIDANT AND MICROBIOLOGICAL ACTIVITY IN EXTRACTS OF *Conyza bonariensis* AND TOXICITY TEST FOR *Plutella xylostella*

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do Título de Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientadora: Prof. Dra. Raquel Dalla Costa da Rocha

Coorientadora: Prof. Dra. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni

**PATO BRANCO
2023**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

Atribuição – Uso Não Comercial (CC BY-NC) - Permite que outros remixem, adaptem e criem obras derivadas sobre a obra licenciada, sendo vedado o uso com fins comerciais. As novas obras devem conter menção ao autor nos créditos e também não podem ser usadas com fins comerciais. Porém as obras derivadas não precisam ser licenciadas sob os mesmos termos desta licença.



**Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Pato Branco**



DENISE WERMUTH

**DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E MICROBIOLÓGICA
EM EXTRATOS DE CONYZA BONARIENSIS E TESTE DE TOXICIDADE FRENTE PLUTELLA
XYLOSTELLA**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Tecnologia De Processos Químicos E Bioquímicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).
Área de concentração: Tecnologia De Processos Químicos E Bioquímicos.

Data de aprovação: 30 de Novembro de 2023

Dra. Raquel Dalla Costa Da Rocha, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Sirlei Dias Teixeira, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Vidianny Aparecida Queiroz Santos, Doutorado - Faculdade de Pato Branco (Fadep)

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 30/11/2023.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a minha família, meu pai Pedro Jacó Wermuth por sempre me apoiar incondicionalmente, a minha mãe Dejanir Wermuth, uma pessoa extraordinária que além de me apoiar se faz presente quantas vezes forem preciso para me auxiliar em todos os quesitos. Ao meu esposo Leonel Inocêncio, companheiro de longa data sempre me apoiando e auxiliando nessa caminhada. Aos meus amados filhos, Marcela Wermuth Inocencio, Gabriela Wermuth Inocencio e meu pequeno Alexandre Wermuth Inocencio. Vocês são meu combustível diário, amor incondicional.

À minha orientadora Prof. Dra. Raquel Dalla Costa por acreditar e confiar nesse projeto, me orientando e apoiando nessa jornada desafiadora. À minha coorientadora Prof. Dra. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni por compartilhar seu tempo e conhecimentos no desenvolvimento desse projeto. Ao Prof. Dr. Gilberto Santos Andrade do Laboratório de Entomologia do setor de agronomia pelo apoio ao projeto na condução dos ensaios toxicológicos. À Prof. Dra. Sirlei Dias Teixeira pela ajuda excepcional nas análises de cromatografia gasosa, sempre me atendeu com imensa simpatia e acolhimento. Ao Prof. Dr. Mário Antônio Alves da Cunha pela colaboração nas análises microbiológicas. À Prof. Dra. Giovana Faneco Pereira do Departamento Acadêmico de Ciências Agrárias da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) pela identificação da *Conyza Bonariensis*.

A todos os professores, alunos e estagiários que me auxiliaram na realização desse projeto. À Anna Paulla Simon e Fernanda pelo auxílio nas análises em cromatografia líquida e antioxidantes; Ao Vítor Librelato do curso de Agronomia pela parceria na criação de manutenção das *Plutellas xylostellas*; As estagiária e alunas Isabelly Mayumi Odahara, Doane Galarça Viçosa, Daiane Meneguzzi, Isabella Garcia, Ingrid e quem mais possa ter de alguma forma colaborado nessa caminhada. Muito Obrigada!

Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, por que o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante.

(Augusto Branco)

RESUMO

Plantas do gênero *Conyza*, da família Asteraceae, são uma das principais plantas daninhas encontradas em todo o mundo. Conhecida popularmente como “buva”, no Brasil estão presentes em diferentes regiões, sendo a espécie *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist a principal planta daninha de preocupação agrícola devido a sua capacidade de resistência aos herbicidas. Alguns estudos de investigação dessas espécies demonstraram grande potencial de compostos bioativos em extratos e óleos essenciais, bem como, capacidade repelente ou tóxica frente diferentes pragas em culturas do setor agrônomo. Dessa forma, levando em consideração o potencial de espécies do gênero *Conyza* e de componentes bioativos já identificados, o presente trabalho teve como objetivo determinar Compostos Fenólicos Totais pelo método Folin-Ciocalteu, Atividade Antioxidante por FRAP, ABTS e DPPH, atividade antimicrobiana, perfil químico de Compostos Fenólicos por CLAE-DAD, análise do perfil químico dos óleos essenciais por CG-EM, assim como avaliar a toxicidade do extrato e óleo essencial de *Conyza bonariensis* em larvas de terceiro instar de *Plutella xylostella*, uma praga no cultivo das brassicáceas que causa danos expressivos em todo o mundo, principalmente nas culturas de brócolis, couve-flor e repolho. Foram encontrados 182,55 mg EAG g⁻¹ de compostos fenólicos totais; antioxidantes por ABTS 1489,90 μmol Trolox g⁻¹, DPPH 786,10 μmol Trolox g⁻¹ e FRAP 3386,36 μmol FeSO₄ g⁻¹. O extrato hidroetanólico de *C. bonariensis* apresentou concentração inibitória mínima em 10 mg mL⁻¹ para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*; 5 mg mL⁻¹ para *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica typhimurium*; e atividade bactericida na concentração de 20 mg mL⁻¹ para *E. coli*. Por cromatografia líquida foram identificados o Ácido Gálico, Ácido Clorogênico, Ácido Cafeico e Ácido Isoclorogênico. A. foram identificados os seguintes compostos nos óleos essenciais por cromatografia gasosa: α-pineno, Sabineno, β-pineno, Limoneno, Espatulenol e Óxido de Cariofileno, sendo o Limoneno o composto majoritário. Na avaliação de toxicidade dos extratos hidroetanólicos e óleos essenciais frente *P. xylostella*, foi observado diferença significativa no tratamento com 0,5% de óleo essencial em relação ao branco, com 25% de mortalidade num período de 92 horas de observação.

Palavras-chave: Metabólitos secundários; Fenólicos; Antioxidantes; Antimicrobiano.

ABSTRACT

Plants of the genus *Conyza*, of the Asteraceae family, are one of the main weeds found worldwide. Popularly known as “buva”, in Brazil they are present in different regions, with the species *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist being the main weed of agricultural concern due to its resistance to herbicides. Some research studies of these species have shown great potential for bioactive compounds in extracts and essential oils, as well as repellent or toxic capacity against different pests in crops in the agronomic sector. Thus, taking into account the potential of species of the genus *Conyza* and bioactive components already identified, the present work aimed to determine Total Phenolic Compounds by the Folin-Ciocalteu method, Antioxidant Activity by FRAP, ABTS and DPPH, antimicrobial activity, chemical profile of Phenolic Compounds by HPLC-DAD, analysis of the chemical profile of essential oils by GC-MS, as well as evaluating the toxicity of the extract and essential oil of *Conyza bonariensis* in third instar larvae of *Plutella xylostella*, a pest in the cultivation of brassicaceae that causes expressive damages all over the world, mainly in broccoli, cauliflower and cabbage crops. 182,55 mg EAG g⁻¹ of total phenolic compounds were found; antioxidants by ABTS 1489,90 μmol Trolox g⁻¹, DPPH 786,10 μmol Trolox g⁻¹ and FRAP 3386,36 μmol FeSO₄ g⁻¹. The hydroethanolic extract of *C. bonariensis* showed a minimum inhibitory concentration of 10 mg mL⁻¹ for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*; 5 mg mL⁻¹ for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica typhimurium*; and bactericidal activity at a concentration of 20 mg mL⁻¹ for *E. coli*. Gallic Acid, Chlorogenic Acid, Caffeic Acid and Isochlorogenic Acid A were identified by liquid chromatography. The following compounds were identified in essential oils by gas chromatography: α-pinene, Sabinene, β-pinene, Limonene, Spathulenol and Caryophyllene Oxide, being Limonene is the major compound. In assessing the toxicity of hydroethanolic extracts and essential oils against PX, a significant difference was observed in the treatment with 0.5% essential oil compared to the blank, with 25% mortality in a period of 92 hours of observation.

Keywords: Secondary metabolites; Phenolics; Antioxidants; Antimicrobial.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1 - <i>Conyza bonariensis</i> | 18 |
| Figura 2 - Metabólitos secundários na interface entre metabólitos primários e interações com o ambiente externo | 22 |
| Figura 3 - Unidade fenólica | 23 |
| Figura 4 - Estrutura básica dos flavonoides | 23 |
| Figura 5 - Estruturas moleculares básicas de algumas subclasses de flavonoides .. | 24 |
| Figura 6 - Estrutura química dos principais ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos..... | 25 |
| Figura 7 - <i>Plutella xylostella</i> fase adulto | 28 |
| Figura 8 - Ciclo de vida da <i>P. xylostella</i> : adulto; ovos; lagarta; pupa | 29 |
| Figura 9 - Estrutura molecular da azadiractina A | 30 |
| Figura 10 - Fluxograma de atividades | 33 |
| Figura 11 - Etapas de criação e aumento da população de <i>Plutella xylostella</i> | 40 |
| Figura 12 - Preparação das folhas de couve com os respectivos tratamentos | 42 |
| Figura 13 - Deposição das lagartas de terceiro instar nas folhas de couve tratadas | 42 |
| Figura 14 - Extratos obtidos por extração exaustiva | 45 |
| Figura 15 - Concentração Inibitória Mínima | 48 |
| Figura 16 - Concentração Bactericida Mínima | 49 |
| Figura 17 - Cromatograma dos padrões utilizados na identificação e quantificação dos compostos fenólicos. (1) Ácido gálico; (2) Catequina; (3) Ácido clorogênico; (4) Ácido vanílico; (5) Ácido cafeico; (6) Epicatequina; (7) Ácido fumárico; (8) Ácido ferrúlico; (9) Rutina; (10) Isoquercetina; (11) Ácido Isoclorogênico A; (12) Astragalina; (13) Ácido salicílico; (14) Miricetina; (15) Quercetina; (16) Ácido cinâmico e (17) canferol | 50 |
| Figura 18 - Cromatograma do extrato de <i>C. bonariensis</i> . (1) Ácido gálico; (2) Ácido clorogênico; (3) Ácido cafeico e (4) Ácido isoclorogênico A..... | 51 |
| Figura 19 - Sobreposição do cromatograma do extrato de <i>C. bonariensis</i> e dos padrões | 52 |
| Figura 20 - Cromatograma dos compostos identificados | 53 |
| Figura 21 - Comparação do padrão Ácido cafeico da amostra com a biblioteca do software..... | 54 |
| Figura 22 - Ácidos fenólicos identificados em extratos hidroetanólicos <i>C. bonariensis</i> | 55 |
| Figura 23 - Metabólitos secundários identificados em óleos essenciais de <i>C. bonariensis</i> | 56 |
| Figura 24 - Sobreposição dos cromatogramas da triplicata. 1) α -pineno; 2) sabineno, 3) β -pineno; 4) limoneno; 5) espatulenol e 6) óxido de cariofileno | 57 |
| Figura 25 - Espectro de massas do α -pineno..... | 58 |
| Figura 26 - Espectro de massas do α -pineno literatura..... | 58 |
| Figura 27 - Espectro de massas do sabineno | 58 |
| Figura 28 - Espectro de massas do sabineno literatura | 58 |
| Figura 29 - Espectro de massas do β -pineno..... | 59 |

| | |
|---|----|
| Figura 30 - Espectro de massas do β -pineno literatura | 59 |
| Figura 31 - Espectro de massas do limoneno | 59 |
| Figura 32 - Espectro de massas do limoneno literatura | 59 |
| Figura 33 - Espectro de massas do espatulenol | 60 |
| Figura 34 - Espectro de massas do espatulenol literatura | 60 |
| Figura 35 - Espectro de massas do óxido de cariofileno | 61 |
| Figura 36 - Espectro de massas do óxido de cariofileno literatura | 61 |
| Figura 37 - Gráfico de efeitos entre os tratamentos | 64 |
| Figura 38 - Média de morte acumulada dos tratamentos | 65 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Resultados da análise de Compostos Fenólicos Totais (CFT) e atividade antioxidante por ABTS, DPPH e FRAP do extrato liofilizado de <i>Cb</i> | 46 |
| Tabela 2 - Concentração inibitória mínima e Concentração bactericida mínima | 48 |
| Tabela 3 - Padrões de Compostos Fenólicos..... | 51 |
| Tabela 4 - Concentração de compostos fenólicos identificados por CLAE | 54 |
| Tabela 5 - Metabólitos voláteis obtidos por hidrodestilação de amostras de <i>C. bonariensis</i> | 56 |
| Tabela 6 - Média de mortalidade de <i>P. xylostella</i> | 63 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------|---|
| ABTS | (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) |
| B | Branco – testemunha |
| Cb | <i>Conyza bonariensis</i> |
| CBM | Concentração Bactericida Mínima |
| CFT | Compostos Fenólicos Totais |
| CLAE-DAD | Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência com detector de arranjos diodos |
| CG-EM | Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massa |
| CIM | Concentração Inibitória Mínima |
| CLSI | Clinical and Laboratory Standards Institute |
| DMSO | Dimetilssulfóxido |
| DPPH | 2,2-difenil-1-picrilidrazil |
| EAA | Equivalente Ácido Ascórbico |
| EAG | Equivalente Ácido Gálico |
| E1 | Extrato hidroetanólico na concentração 0,5 % |
| E2 | Extrato hidroetanólico na concentração 1 % |
| FRAP | Poder Antioxidante de Redução do Ferro |
| IA | Índice Aritmético |
| IAC | Índice Aritmético Calculado |
| IAL | Índice Aritmético na Literatura |
| O1 | Óleo Essencial na concentração 0,5 % |
| O2 | Óleo Essencial na concentração 1 % |
| TR | Tempo de retenção |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 OBJETIVOS | 16 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 16 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 16 |
| 3 REFERENCIAL TEÓRICO | 17 |
| 3.1 PRODUTOS NATURAIS..... | 17 |
| 3.2 CONYZA SPP. | 18 |
| 3.3 METABOLISMO VEGETAL..... | 20 |
| 3.4 COMPOSTOS FENÓLICOS | 22 |
| 3.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE..... | 25 |
| 3.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA..... | 26 |
| 3.7 COMPOSTOS BIOATIVOS EM <i>CONYZA BONARIENSIS</i> | 26 |
| 3.8 <i>PLUTELLA XYLOSTELLA</i> | 28 |
| 3.9 CAPACIDADE LARVICIDA E INSETICIDA DE PLANTAS..... | 31 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 33 |
| 4.1 FLUXOGRAMA DAS ATIVIDADES..... | 33 |
| 4.2 COLETA DAS FOLHAS | 33 |
| 4.3 PREPARO DOS EXTRATOS..... | 33 |
| 4.4 ANTIOXIDANTES | 34 |
| 4.4.1 Compostos Fenólicos Totais | 34 |
| 4.4.2 Atividade antioxidante por captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazina) | 35 |
| 4.4.3 Atividade antioxidante pela captura do radical cátion ABTS (2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico))..... | 35 |
| 4.4.4 Atividade antioxidante pelo método de redução do íon férrico – FRAP | 36 |
| 4.5 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS EM CLAE-DAD..... | 37 |
| 4.6 COMATOGRAFIA GASOSA – ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM).... | 37 |
| 4.6.1 Análise cromatográfica acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e Identificação dos compostos | 38 |
| 4.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA..... | 38 |
| 4.7.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)..... | 39 |
| 4.7.2 Concentração Bactericida Mínima (CBM) | 39 |
| 4.8 AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DE EXTRATOS DE CONYZA BONARIENSIS FRENTE <i>PLUTELLA XILOSTELLA</i> | 39 |
| 4.8.1 Criação e manutenção da população de <i>P. xylostella</i> | 40 |
| 4.8.2 Avaliação da toxicidade do extrato e óleo essencial de <i>C. bonariensis</i> frente a <i>P. xylostella</i> | 41 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 44 |
| 5.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E ÓLEOS ESSENCIAIS | 44 |

| | |
|--|-----------|
| 5.2 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO | 46 |
| 5.3 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA | 47 |
| 5.4 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM CLAE-DAD | 50 |
| 5.5 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS POR CG-EM | 55 |
| 5.6 TOXICIDADE DO EXTRATO E ÓLEO ESSENCIAL DE <i>C. BONARIENSIS</i> FRENTE <i>P. XYLOSTELLA</i> | 62 |
| 6 CONCLUSÕES | 70 |
| REFERÊNCIAS..... | 71 |

1 INTRODUÇÃO

A busca por novos compostos químicos ativos de interesse para diversas áreas tecnológicas vem gerando crescente e importante desenvolvimento do setor de pesquisa e desenvolvimento. Pesquisas voltadas para extração de compostos bioativos de produtos naturais são muito promissoras. Para Almeida e Santos (2018), o estudo dos compostos produzidos pelo metabolismo secundário das plantas em busca de efeitos benéficos é constante e vai além do uso na medicina popular, sendo de grande importância na identificação de componentes multifuncionais.

Vários compostos orgânicos fundamentais para sobrevivência das plantas são sintetizados no metabolismo secundário, e esses compostos podem fornecer substâncias valiosas para diversos setores. Sabe-se que essas substâncias podem ter diferentes funções para sobrevivência da planta e com isso podem trazer diferentes usos em potencial. Algumas espécies são capazes de produzir substâncias com capacidade foto protetora (MEDEIROS et al., 2021), autodefesa pela produção de aleloquímicos (ARAUJO; SILVA; LIMA, 2018) antioxidantes, anti-inflamatórios, antidiabéticos, antimicrobianos e anticancerígenos (BEZERRA, 2021).

Algumas plantas com elevada capacidade de resistência e adaptabilidade despertam interesse na investigação de compostos bioativos de potencial tecnológico, como é o caso das plantas do gênero *Conyza*, da família Asteraceae, uma das principais plantas daninhas encontrada em todo o mundo (ALBRECHT et al., 2020). Conhecida popularmente como “buva”, no Brasil várias espécies estão presentes em diferentes regiões, Sul, Sudeste e Centro-Oeste, sendo a espécie *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist, a principal planta daninha de interesse/preocupação agrícola devido a sua capacidade de resistência ao principal herbicida utilizado no controle, o glifosato (AMARAL et al., 2020).

Estudos de investigação de *Conyza* spp. demonstraram grande potencial de compostos bioativos em extratos e óleos essenciais. Descobriu-se que diferentes espécies são ricas em flavonoides, possuem boa atividade antioxidante, atividade ansiolítica e antidepressiva (EL-AKHAL et al., 2021), atividade antimicrobiana contra fungos patogênicos causadores de infecções superficiais (GIRMA; JIRU, 2021), elevado teor de compostos fenólicos totais, efeitos citotóxicos/antiproliferativos

contra adenocarcinoma ileocecal humano (SCHECHTEL et al., 2019) e notável atividade larvicida frente ao *Aedes aegypti* (HOI et al., 2020), entre outros.

Diante da capacidade de as plantas metabolizarem compostos bioativos com efeito de proteção, alguns pesquisadores testaram o efeito de óleos essenciais e extratos de plantas no controle de pragas em culturas do setor agrônomo. A *Plutella xylostella* é uma traça presente no cultivo das brassíceas, principalmente nas culturas de brócolis, couve-flor e repolho (SILVA et al., 2020), que causa danos expressivos em todo o mundo (MAGALHÃES, 2016). O controle é feito com pesticidas sintéticos e devido ao uso excessivo no controle dessa praga ocorrem efeitos tóxicos ao meio ambiente. O uso de extratos vegetais como estratégia de manejo, torna-se alternativa com menor toxicidade e maior sustentabilidade (AFIUNIZADEH et al., 2022).

Dessa forma, levando em consideração o potencial das plantas do gênero *Conyza*, que apresentam componentes bioativos já identificados/quantificados em diferentes espécies, e a necessidade de obtenção de produtos naturais de menor impacto na natureza, frente pragas como a *P. xylostella*, o presente trabalho vem na perspectiva de colaborar na investigação desses componentes, ampliando possibilidades, com método de extração exaustiva para quantificação de compostos fenólicos totais, determinação de atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e identificação de ácidos fenólicos por CLAE-DAD, de extratos de partes aéreas, bem como realizar testes de toxicidade do óleo essencial e do extrato vegetal de *C. bonariensis* em larvas de terceiro instar de *P. xylostella*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter e caracterizar extratos e óleo essencial de *Conyza bonariensis* e realizar testes de atividade biológica e de toxicidade do extrato e óleo essencial frente a *Plutella xylostella*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar extração exaustiva com solvente hidroetanólico de partes aéreas de *Conyza bonariensis*.
- Quantificar Compostos Fenólicos Totais pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu.
- Determinar a capacidade antioxidante dos extratos pelos métodos de sequestro dos radicais DPPH e ABTS e redução do Ferro (FRAP).
- Avaliar a capacidade antimicrobiana dos extratos frente ao *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Salmonella entérica Typhimurium*.
- Identificar a composição fenólica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD).
- Obter óleo essencial por hidrodestilação em aparato de Clevenger.
- Identificar componentes do óleo essencial por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM).
- Realizar teste de toxicidade do extrato e óleo essencial frente a lagartas de terceiro instar de *Plutella xylostella*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 PRODUTOS NATURAIS

Estima-se que o uso de plantas medicinais seja tão antigo quanto a própria existência da raça humana (OLIVEIRA; MAIOR; DRESCH, 2018, p. 16). Plantas com finalidades terapêuticas foram relatadas na China 3.000 anos a. C., considerado esses, os primeiros relatos do uso de plantas medicinais. Esses recursos ainda podem ser observados em muitas comunidades e grupos étnicos, mesmo com o avanço tecnológico na sintetização de diferentes medicamentos (FERNANDES; SCAPIN, 2020).

O Brasil apresenta uma grande diversidade, sendo detentor dos biomas mais complexos e diversos que se tem conhecimento, chegando a 20% de todas as espécies vegetais do planeta, onde, já foram contabilizadas aproximadamente 34 mil espécies, das quais, 55% são exclusivas do país. Destacam-se o Cerrado, Pantanal, Caatinga e a Amazônia como os principais biomas com essa diversidade de espécies. Apesar desse grupo de plantas serem muito estudados, somente 5% foi investigado do ponto de vista científico (OLIVEIRA; MAIOR; DRESCH, 2018, p. 83).

É crescente o estudo de compostos produzidos por plantas no metabolismo secundário, devido à diversidade de benefícios relatados na medicina popular. Apesar dessa prática ser muito antiga, nos dias atuais plantas medicinais ainda são bastante comercializadas e cultivadas nas residências, em especial no interior e em regiões mais carentes do Brasil (ALMEIDA; SANTOS, 2018).

Aliando o conhecimento popular do uso de plantas medicinais e a busca por novas substâncias biologicamente ativas, vem se descobrindo uma variedade de atividades biológicas no organismo humano, como capacidade hipoglicemiante, antioxidante, anti-inflamatório, despertando ainda mais a investigação fitoquímica de variadas plantas (ALMEIDA; SANTOS, 2018).

É vasta a possibilidade de aplicações dos compostos bioativos produzidos pelas plantas. Além da aplicação comercial como medicamentos, o uso como aromatizantes, inseticidas, entre outros, abrem um leque de possibilidades, pois metabólitos secundários estão envolvidos na proteção das plantas contra bactérias, fungos, herbívoros, atrativos para polinizadores, dispersores de sementes, fazendo

com que desperte interesse de aplicação comercial em ramos distintos (YANG et. al., 2018).

Vale ressaltar que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária alerta para o uso indiscriminado de plantas medicinais devido ao mito de “se é natural não faz mal”, contrariando a crença popular e alertando quanto ao uso indiscriminado, podendo levar a intoxicações, irritações, edemas, enjoos e até a morte (ANVISA, 2020).

3.2 CONYZA SPP.

Pertencente à família Asteraceae, o gênero *Conyza* se distribui em quase todo o mundo e apresenta aproximadamente, 50 espécies, sendo a *C. bonariensis* (Figura 1), *C. canadensis* e *C. sumatrensis* as que mais se destacam devido ao seu caráter negativo e de grande preocupação na agricultura. Conhecidas popularmente como “buva”, essas espécies podem ser facilmente encontradas, desde áreas abandonadas até em áreas de diferentes culturas (SCHNEIDER, 2018).

Figura 1 - Conyza bonariensis



Fonte: Autoria própria (2022).

São nativas da América do Sul e América do Norte e atualmente estão difundidas em todo o mundo, causando grande preocupação e impactos econômicos nos sistemas agrônômicos de diferentes culturas, devido a adaptabilidade, criação de mecanismos de resistência a diferentes herbicidas e a fácil dispersão de suas sementes, que são pequenas, apresentando fácil mobilidade pelo vento causando

vasta proliferação (AMARAL et al., 2020). Uma única planta é capaz de produzir aproximadamente 200 mil sementes que germinam durante o outono/inverno, desenvolvem-se na primavera/verão e têm o ciclo encerrado no outono (VARGAS et al., 2016, p. 235).

Apesar de estarem presentes em diferentes culturas, essa espécie é a principal planta daninha presente nas culturas de soja no Brasil (KASPARY, 2014), com perda média de rendimento de 25% para diferentes cultivares de soja, devido à competição com a buva (TREZZI et al., 2013) e nos casos mais graves de infestação, a redução do rendimento de grãos varia de 1174 Kg ha⁻¹ a 1469 Kg ha⁻¹, correspondendo a 48% de perdas, se comparado com uma área sem a presença de *C. bonariensis* e/ou *C. canadenses* (GAZZIERO et al., 2010). Em 2017, essas espécies foram responsáveis por infestação de 23% da área plantada com soja no Brasil e aproximadamente 10% da área total plantada no país (AMARAL et al., 2020).

Vários são os fatores que levam a resistência de plantas daninhas frente a diferentes herbicidas. Os primeiros casos de resistência da *C. bonariensis* e *C. canadensis* frente ao glifosato e inibidores da EPSPs (5-enol-piruvil-chiquimato-fosfato-3-fosfato sintetase) foram identificados em 2005 (ADEGAS et al., 2017).

Um dos fenômenos que causam aparecimento de diferentes biótipos resistentes é o uso repetido de herbicidas, que faz com que a planta desenvolva mecanismos de resistência e adaptabilidade. Glifosato e paraquat são os produtos amplamente utilizados no controle das espécies *Conyza* (MORETTI et al., 2017) e com o surgimento de biótipos da planta resistentes ao glifosato e paraquat, associou-os ao 2,4-D ou ao clorimurrom, bem como, aplicações sucessivas com outras combinações em escalas definidas (VARGAS et al., 2016, p. 235).

O mecanismo de ação do principal herbicida, o glifosato, é, conforme já mencionado, pela inibição da enzima EPSPs. Essa enzima atua na rota de síntese de aminoácidos aromáticos tirosina, fenilalanina e triptofano, e ao inibi-la com o herbicida, ocorre um acúmulo de ácido chiquímico e a interrupção na síntese desses aminoácidos. Após a planta sofrer sucessivas ações de agentes agressores tanto bióticos como abióticos, ela tendeu a desenvolver mecanismos de resistência. Esses mecanismos ocorrem no metabolismo secundário, desenvolvendo compostos bioativos de defesa com capacidade resistiva (SILVA et al., 2018).

Diante da grande disponibilidade, adaptabilidade, artifícios peculiares que tendem à resistência, essa planta vem trazendo interesse de investigação de compostos bioativos de interesse farmacêutico e agrônômico.

3.3 METABOLISMO VEGETAL

Os vegetais são capazes de produzir diversos compostos orgânicos, que podem ser divididos em dois grupos. O primeiro é denominado de grupo de macromoléculas ou metabólitos primários, que são essenciais a todos os seres vivos. Esse conjunto de processos metabólicos desempenha funções essenciais no vegetal, como a respiração, fotossíntese e o transporte de solutos. Esses compostos possuem distribuição universal nas plantas, é o caso dos nucleotídeos, aminoácidos, carboidratos, lipídios, e da clorofila (OLIVEIRA; MAIOR; DRESCH, 2018, p. 84).

O segundo grupo, o de micromoléculas ou também denominados metabólitos secundários/especializados são, ao contrário dos metabólitos primários, encontrados de forma específica por grupo de plantas. Eles sintetizam compostos orgânicos fundamentais para sobrevivência da planta e essas substâncias podem ser valiosas para a saúde humana (MEDEIROS et al., 2021).

De acordo com a origem biossintética, a classificação dos principais grupos de metabólitos secundários consiste em terpenos, compostos fenólicos e alcaloides. Os terpenos têm sua origem via ácido mevalônico (no citoplasma), piruvato e 3 fosfoglicerato (ambos no cloroplasto). Os compostos fenólicos são oriundos do ácido chiquímico e ácido mevalônico e os alcaloides via aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina) que derivam do ácido chiquímico e aminoácidos alifáticos (ornitina e lisina) (OLIVEIRA; MAIOR; DRESCH, 2018, p. 93; MONTEIRO; BRANDELLI, 2017, p. 46).

Esses metabólitos despertam grande interesse não apenas na área farmacêutica, mas também nas áreas de perfumaria, agrônômica, alimentar e outras. Essas atividades biológicas são exercidas pelas plantas em resposta a estímulos do meio ambiente, de adaptação e sobrevivência frente a outros organismos que possam trazer malefícios, como fungos, bactérias, vírus, assim como apresentar atividade antigerminativas ou tóxicas de outras plantas (COELHO, 2018), inferindo no comportamento fisiológico, morfológico e etológico de outros organismos

(ARAUJO; SILVA; LIMA, 2018), ação contra os raios ultravioletas, entre outros (MEDEIROS et al., 2021).

Estudos revelam que quando as plantas são expostas a determinadas condições, elas tendem a desenvolver compostos bioativos para àquelas necessidades. Fatores como condições ambientais, do solo, época de colheita, são capazes de modificar a qualidade e a quantidade de compostos produzidos pelo metabolismo secundário, como por exemplo, os fenólicos, alcaloides e terpenoides (JESUS, 2016).

Fatores como, condições ambientais, climáticas, falta ou excesso de nutrientes, os mecanismos de defesa da planta contra insetos-praga, podem consistir em barreiras mecânicas em sua estrutura, sendo essas, a primeira linha de defesa contra diferentes patógenos e predadores. As barreiras mecânicas mais comuns são de superfície, movimentos foliares tigmotáticos e cristais minerais (TAIZ et al., 2017, p. 699).

As principais estruturas de superfícies podem ser divididas em: espinhos, gloquídios, acúleos e tricomas. Os espinhos podem ser encontrados em citros, gloquídios em alguns cactos e acúleos em roseiras. Destacam-se os tricomas de algumas espécies, que apresentam uma defesa mais eficaz contra insetos-praga, em especial os tricomas glandulares, que são capazes de armazenar metabólitos secundários como terpenos e fenóis, em bolsas formadas entre a parede celular e a cutícula. Mediante ataque de insetos herbívoros, essas bolsas rompem liberando esses compostos e conseqüentemente repelindo-os (TAIZ et al., 2017, p. 699).

Os compostos do metabolismo secundário desempenham um importante papel de resposta de defesa da planta contra fatores bióticos e abióticos, além de regular interações benéficas, como por exemplo, a polinização. Esses compostos ficam localizados na interface entre o metabolismo primário e as interações com o meio externo (Figura 2) (TAIZ et al., 2017, p. 700).

Figura 2 - Metabólitos secundários na interface entre metabólitos primários e interações com o ambiente externo



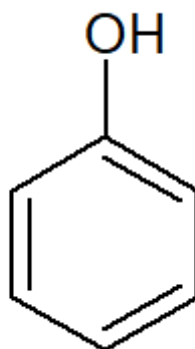
Fonte: Taiz et al., (2017).

3.4 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são produtos do metabolismo secundário das plantas, sintetizados a partir de duas rotas metabólicas principais, a via do ácido chiquímico e a do ácido mevalônico. Podem ser classificados em quatro grupos: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos e taninos (OLIVEIRA; MAIOR; DRESCH, 2018, p. 94).

Em geral a estrutura química dos compostos fenólicos é formada por hidroxilas e anéis aromáticos que conferem capacidade antioxidante e contribuem para coloração, sabor e odor de alimentos (ZANZINI et al., 2020). Uma unidade fenólica é formada por uma hidroxila e um anel aromático (Figura 3) (MONTEIRO; BRANDELLI, 2017, p. 60). Algumas substâncias podem apresentar atividades funcionais em humanos, como atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, diminuição da agregação plaquetária, doenças relacionadas ao envelhecimento, entre outros (ZANZINI et al., 2020).

Figura 3 - Unidade fenólica

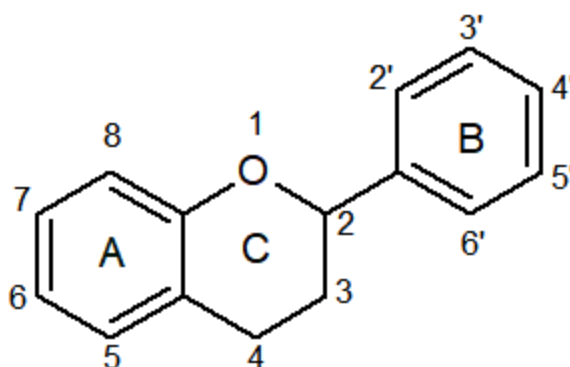


Fonte: Autoria própria (2023).

Na classe de compostos fenólicos destacam-se os flavonoides e os ácidos fenólicos (SCHAFRANSKI et al., 2019). Também conhecidos como polifenóis, caracterizados pela presença de duas ou mais unidades de fenol em sua estrutura, esses compostos podem ser divididos de acordo com a estrutura química, como flavonoides (antocianinas, flavonóis, isoflavonas, entre outros) ou não-flavonoides (ácidos fenólicos) tendo como principal atividade a de antioxidante, entre outras atividades biológicas. Podem ser de estruturas simples e complexas, derivadas dos aminoácidos fenilalanina e da tirosina (NASCIMENTO et al., 2021; FERRERA et al., 2016).

Os flavonoides são compostos de baixa massa molecular, constituídos de quinze átomos de carbono e sua estrutura consiste essencialmente de dois anéis aromáticos ligados (A e B) por uma cadeia contendo três carbonos (C) entre eles na forma C6-C3-C6 (Figura 4) (ZIELINSKI, 2015).

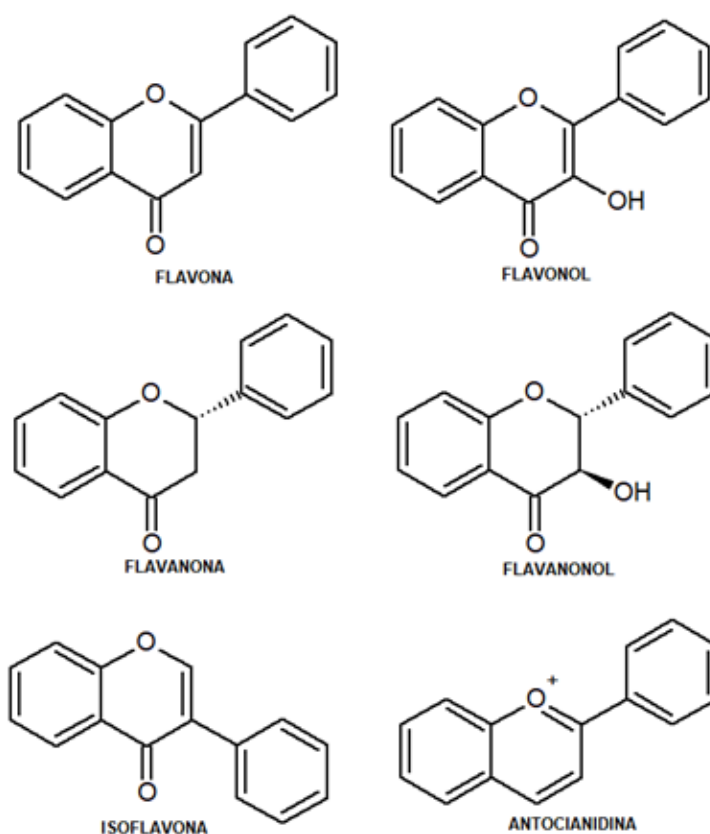
Figura 4 - Estrutura básica dos flavonoides



Fonte: Autoria própria (2023).

As variações estruturais subdividem os flavonoides em diferentes classes: antocianidinas, flavonas, flavonóis, isoflavonas, flavanonas e flavanonóis (Figura 5). Esse grupo é considerado uma das maiores classes de substâncias orgânicas distribuídas na natureza, demonstra diversas funções biológicas com elevada capacidade antioxidante. Nas plantas, essas substâncias atuam na defesa, no processo de crescimento e desenvolvimento (ZIELINSKI, 2015; CECHINEL; ZANCHETT, 2020, p. 54).

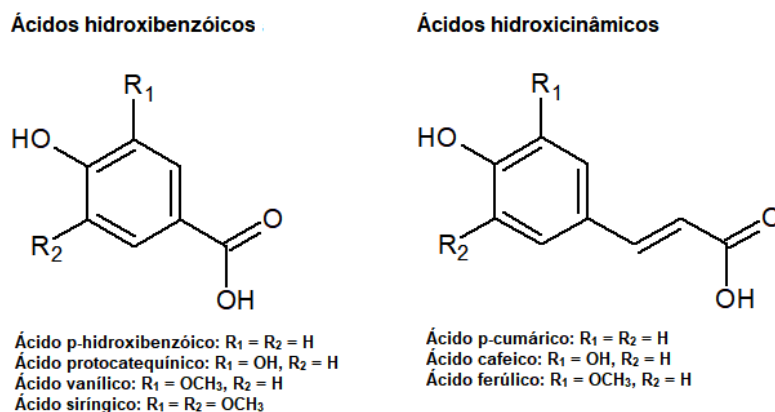
Figura 5 - Estruturas moleculares básicas de algumas subclasses de flavonoides



Fonte: Adaptado de CECHINEL E ZANCHETT (2020).

Os ácidos fenólicos podem ser divididos em dois grupos principais, os ácidos hidroxibenzoico, possuem 7 átomos de carbonos que tem estrutura comum C6-C1, são ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza (ácido gálico, *p*-hidroxibenzóico, protocatequínico, vanílico, siríngico, gentísico e salicílico) e ácidos hidroxicinâmicos com 9 átomos de carbono (C6-C3) (*p*-cumárico, ferúlico, cafeico e sinápico) que são os mais comuns na natureza (Figura 6) (SAMPAIO, 2015; ZIELINSKI, 2015; ANGELO; JORGE, 2007).

Figura 6 - Estrutura química dos principais ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos



Fonte: Autoria própria (2023).

3.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Substâncias antioxidantes são moléculas capazes de inibir ou reduzir processos oxidativos causados por radicais livres em sistemas biológicos, na oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares. Entre os principais antioxidantes consumidos através de alimentos estão os compostos fenólicos, os carotenoides, vitaminas E e C e os minerais Mg, Sn, Zn, Fe e Cu. Tem sido associada, uma menor incidência de doenças relacionadas ao estresse oxidativo e o consumo de antioxidantes naturais, como os compostos fenólicos presentes em plantas, pela inibição de radicais livres (VERRUCK; PRUDENCIO; SILVEIRA, 2018).

Carotenoides, polifenóis como flavonoides e taninos estão entre os compostos que podem estar presentes em plantas e possuem atividade antioxidante capazes de inibir radicais livres, prevenir diversos tipos de doenças e retardar significativamente processos oxidativos no organismo. Esses compostos apresentam grande interesse e demanda no mercado, por possuírem em sua maioria, baixa toxicidade e são encontrados em diversas partes da planta (JUNIOR, 2016).

Por estarem em lugar de destaque em diferentes áreas da indústria, as substâncias antioxidantes estão sendo alvo de pesquisas sistematizadas desses compostos, capazes de neutralizar agentes nocivos, como os radicais livres. Dentre as principais substâncias com atividade antioxidante derivadas de plantas, destacam-se o ácido ascórbico (Vitamina C) e a quercetina que são amplamente

utilizados como antioxidante, cosmeceútico e nutracêutico (SEVALHO; ROCHA, 2017).

3.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Nos últimos anos, o uso impróprio de antimicrobianos fez com que muitos microrganismos causadores de doenças infecciosas, desenvolvessem resistência aos medicamentos disponíveis. Diante disso, é crescente o desenvolvimento de pesquisas, para obtenção de novos fármacos com atividade antimicrobiana, a partir de extratos vegetais (REIS; FORTUNA, 2016).

Os compostos do metabolismo secundário das plantas, podem apresentar diversas atividades biológicas, entre elas a capacidade de matar ou inibir o crescimento de patógenos, ou, apresentar toxicidade mínima para células hospedeiras (MIRANDA et al., 2015).

Já foi relatado a eficácia de extratos vegetais, óleos essenciais e compostos isolados, como flavonoides, lactonas, alcaloides e terpenos, frente a diferentes microrganismos patogênicos. Na literatura, é possível encontrar diversos métodos para testes de atividade antimicrobiana com produtos naturais. Esses testes podem incluir avaliações tanto qualitativas como quantitativas, com determinação da menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano (Concentração Inibitória Mínima – CIM). Os métodos de avaliação de susceptibilidade de antibióticos mais adotados são padronizados por normas estabelecidas por órgãos como o CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (AMPARO et al., 2017).

3.7 COMPOSTOS BIOATIVOS EM *CONYZA BONARIENSIS*

Schechtel et al. (2019), analisaram em diferentes concentrações de extração com água e etanol das folhas de *C. bonariensis*. Para compostos fenólicos totais e orto-difenólicos, a concentração ótima foi obtida com extração em etanol/água (50/50) e flavonoides totais em água/etanol (25/75). Na identificação de compostos fenólicos individuais, encontraram ácido cafeico, ácido elágico, ácido rosmarínico, ácido gálico, ácido 2,5 dihidroxibenzoico, ácido siríngico, procianidina A2, (-)-

epicatequina, (+)-catequina e quercetina. Encontraram elevada capacidade antioxidante por FRAP e DPPH com etanol/água (50/50). No estudo mencionado, também foi observado a capacidade anti-hemolítica e atividade antiprofelítica contra células de adenocarcinoma colorretal humano (HCT8). Na análise de atividade antimicrobiana o extrato inibiu o crescimento de *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus*, *Salmonella Enteritidis* e *S. Typhimurium*. Não houve atividade contra *S. cerevisiae*.

Thabit et al. (2015), analisaram extratos etanol/água (90/10) de *C. bonariensis* na região de Taiz no Iêmen. Quantificaram flavonoides totais e flavonoides individuais: taninos, quercetina e antocianina. Também foi observada elevada capacidade antioxidante por DPPH. Na avaliação da atividade antimicrobiana, o extrato de *C. Bonariensis* se mostrou mais suscetível contra as bactérias gram-positivas *Staphylococcus* e *Streptococcus*. *S. Aureus* foi o organismo mais sensível aos extratos de *C. bonariensis* a 20 mg mL⁻¹ e também foi capaz de inibir *S. typhimurium*, *S. dysenteriae* e *E. coli*.

Paula et al. (2018), encontraram em extratos metanólicos das raízes de *C. bonariensis* coletadas em Campo Verde no Mato Grosso, a presença de flavonoides, taninos e cumarinas, nas folhas encontraram cumarinas. Constataram também, atividade moderada a fracas de ambos os extratos frente aos seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Candida albicans* (resistente ao fluconazol), *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*. *Candida grablata* (somente em extratos de raízes) e *Candida kruzei* (somente em extratos das folhas).

Outros estudos investigativos com diferentes formas de extração e obtenção de óleos essenciais de espécies do gênero *Conyza*, apresentaram diversos compostos e atividades biológicas. Foram identificados e quantificados flavonoides, atividade antidepressiva, ansiolítica, atividade antimicrobiana contra fungos, elevado teor de compostos fenólicos totais, efeitos citotóxicos/antiproliferativo contra células cancerígenas, atividade larvicida, entre outros, comprovando o grande potencial ainda a ser descoberto dessa planta tão promissora (EL-AKHAL et al., 2021; GIRMA; JIRU, 2021; SCHECHTEL et al., 2019; HOI et al., 2020).

Estudos encontraram em extratos etanólicos de *C. bonariensis* elevada quantidade de ácidos orgânicos e fenóis. Nos extratos aquosos de folhas identificaram moderada quantidade de antocianina e grande incidência de ácidos orgânicos e saponinas, uma importante classe de triterpenos. As saponinas apresentam efeitos biológicos no organismo humano, em especial pela capacidade antioxidante além de atuarem contra células tumorais, sendo as avaliadas consideradas não-hemolíticas. Além dos efeitos biológicos no organismo humano, as saponinas apresentam propriedades surfactantes e detergentes que podem desempenhar um papel importante na defesa contra microrganismos e insetos em plantas (SILVA et al., 2018).

3.8 *PLUTELLA XYLOSTELLA*

Plutella xylostella (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) (Figura 7), também conhecida como traça-das-crucíferas, ou mariposa diamante, é uma espécie de inseto lepidóptero, mais especificamente de traças, considerada uma praga no cultivo de brassiáceas no mundo, causando danos tanto qualitativos quanto quantitativos nos campos de produção (MAGALHÃES, 2016).

Figura 7 - *Plutella xylostella* fase adulto



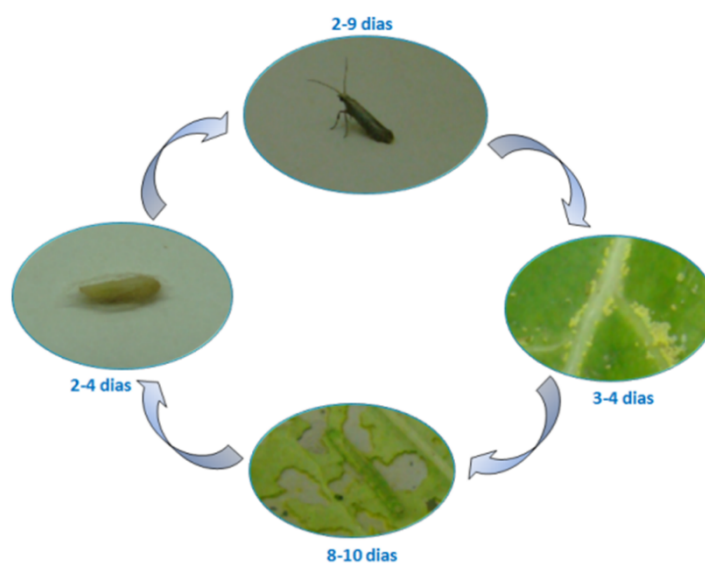
Fonte: Adaptado de TROCZKA et al. (2017).

As principais hortaliças afetadas pela *P. xylostella* são repolho, couve-flor e brócolis e o controle é feito com pesticidas sintéticos para minimizar os danos

nessas culturas, porém, devido a larga utilização dos mesmos, acarreta desequilíbrios ecológicos e resistência desses artrópodes aos ingredientes ativos desses produtos (SILVA et al., 2020).

De coloração parda, ciclo de vida em média de 12 dias (Figura 8), elevado potencial de dispersão, rápida reprodução e cosmopolita, sua origem ainda é incerta, acredita-se que possa ser originária do Leste da Ásia, África do Sul ou da Europa e, os custos para o controle são altos (MAGALHÃES, 2016).

Figura 8 - Ciclo de vida da *P. xylostella*: adulto; ovos; lagarta; pupa



Fonte: Adaptado de MAGALHÃES (2016).

Uma forma de controle da *P. xylostella* mais utilizada na década de 70, era com o uso de uma toxina específica de *Bacillus thuringiensis* (Bt) da família Bacillaceae. Essa bactéria foi isolada pela primeira vez cerca de um século atrás, a partir de bichos-da-seda doentes. Pesquisadores descobriram que a toxina, com ação inseticida, era uma proteína presente apenas em culturas esporuladas. Assim, muitos dos isolados de Bt foram largamente comercializados no controle de diferentes insetos. Um mecanismo de ação da Bt contra os Lepidópteros, que consistia em maior mortalidade dos insetos, ocorria por paralisia das peças bucais, do intestino e do corpo, de modo que a alimentação era inibida (GULLAN; CRANSTON, 2023, p. 332).

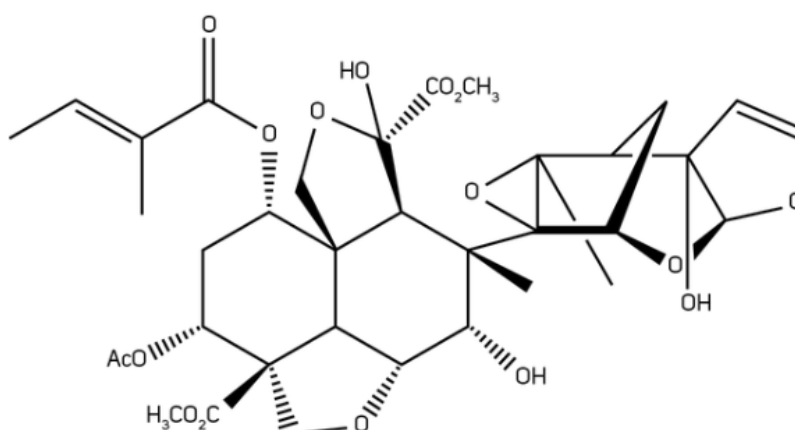
Em meados de 1988, produtores do Japão e Havaí relataram nível extremamente alto de resistência da *P. xylostella* frente Bt. A resistência também foi

relatada em algumas partes da Ásia, América Central e Estados Unidos continental. Pesquisadores descobriram que a resistência a quatro toxinas diferentes de Bt pela *P. xylostella* se devia a um único gene, causada por uma mutação nos receptores ou proteases dessas toxinas e essa resistência pode ser transmitida matematicamente para a prole, através dos ovos (GULLAN; CRANSTON, 2023, p. 333).

Além do controle biológico com o uso de isolados de Bt, os inseticidas químicos seletivos são uma opção de controle da *P. xylostella*. O Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento (MAPA) concedeu registro do produto conhecido comercialmente como AZAMAX, considerado seguro e eficaz para frutas, café e hortaliças. Esse produto é extraído da planta *Azadirachta indica* A. Juss., da família Meliaceae e conhecida popularmente como amargosa e neem (ou nim).

O princípio ativo azadiractina A (limonoide ou tetranortriterpenoide) (Figura 9) obtido do óleo de neem é considerado ainda, um inseticida de alta efetividade, largamente utilizado no Brasil como defensivo de plantas e seu mecanismo de ação nos insetos ocorre de quatro formas: efeito regulador do crescimento, efeito antialimentar, efeito repelência de postura e efeito inibidor da reprodução (CECHINEL FILHO; ZANCHETT, 2020, p. 64).

Figura 9 - Estrutura molecular da azadiractina A



Fonte: Adaptado de CECHINEL; ZANCHETT (2020).

Com impactos ao ecossistema devido ao uso excessivo desses pesticidas, há necessidade urgente de pesquisas no campo de manejo sustentável e a busca de novos produtos ecologicamente seguros. Diante disso, nas últimas décadas vem crescendo as pesquisas frente ao possível uso de extratos vegetais como alternativa aos inseticidas sintéticos, com a vantagem de apresentarem menor toxicidade para o

meio ambiente, menor custo de produção e curto tempo de persistência no ambiente (AFIUNIZADEH et al., 2022).

3.9 CAPACIDADE LARVICIDA E INSETICIDA DE PLANTAS

Para Silva et al., (2020), os óleos essenciais são promissores no controle de diversos artrópodes devido às suas propriedades biológicas específicas e podem ser usados como alternativa em relação aos produtos sintéticos. Os compostos bioativos que mostram a maior atividade inseticida estão presentes em três grupos: alcaloides, terpenos e fenólicos e podem variar conforme a espécie da planta (AFIUNIZADEH et al., 2022).

Hoi et al., (2020), realizaram testes de atividade larvicida contra *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* e *Culex quinquefasciatus* com óleo essencial de três espécies de *Conyza*, a *C. bonariensis*, *C. canadensis* e *C. sumatrensis* coletadas no Vietnã. Os óleos essenciais foram obtidos por hidrodestilação em aparelho clewenger e os testes mostraram que a espécie *C. Canadensis* apresentou melhor atividade larvicida contra *A. aegypti* (24h – $LC_{50} = 9,8 \mu\text{g mL}^{-1}$) e *A. albopictus* (24h – $LC_{50} = 18,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e boa atividade contra *C. quinquefasciatus* (24h – $LC_{50} = 39,4 \mu\text{g mL}^{-1}$). *C. sumatrensis* também apresentou boa atividade larvicida contra as três espécies de mosquitos (24h – $LC_{50} = 21,7, 19,1, \text{ e } 26,7 \mu\text{g mL}^{-1}$) respectivamente, para *A. aegypti*, *A. albopictus*, e *C. quinquefasciatus*. Óleo essencial de *C. bonariensis* foi menos ativo (24h – $LC_{50} = 69,7, 81,1, \text{ e } 130,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) contra *A. aegypti*, *A. albopictus* e *C. quinquefasciatus*, respectivamente. Por cromatografia gasosa-espectrometria de massas, foi observado que a atividade larvicida das espécies de *Conyza* coincide com a concentração de limoneno nas amostras, 41,5%, 25,5% e 0,2%, respectivamente, para *C. canadensis*, *C. sumatrensis*, e *C. bonariensis*.

Silva et al., (2020), testaram a capacidade larvicida e ovicida de óleo essencial de *Melaleuca leucadendra* no estado de Pernambuco - Brasil, frente a *P. xylostella*. Óleos essenciais de flores e frutas dessa planta foram promissores frente a *P. xylostella* e análises químicas por CG-EM foi identificado um sesquiterpeno, o (*E*)-nerolidol (> 80%) como principal constituinte. Com isso, o estudo conclui que

óleos essenciais e (*E*)-nerolidol são promissores agentes acaricidas/inseticidas naturais.

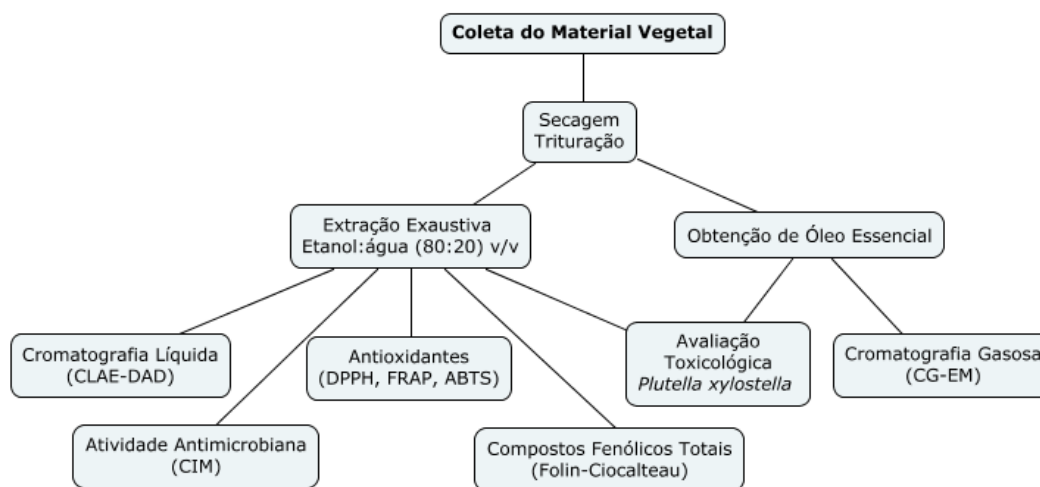
Além de óleos essenciais, muitos pesquisadores estão testando a capacidade repelente, inseticida, ovicida e larvicida de diferentes pragas frente a extratos hidroalcoólicos e metanólicos de diferentes plantas. Radhakrishnan e Prabhakaran (2014) testaram a atividade biocida de extratos aquosos de plantas contra o Ácaro-Vermelho (*Oligonychus coffeae*). *C. bonariensis* apresentou 80,0% de mortalidade em adultos, na concentração de 5% após 96 h de observação, porém, baixa capacidade ovicida.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 FLUXOGRAMA DAS ATIVIDADES

O procedimento para desenvolvimento de pesquisa do presente trabalho segue conforme o fluxograma a seguir (Figura 10).

Figura 10 - Fluxograma de atividades



Fonte: Autoria própria (2022).

4.2 COLETA DAS FOLHAS

As amostras foram coletadas no interior do município de Mangueirinha, Paraná, posição -26.013780, -52.293237 <https://goo.gl/maps/vAqSH2eMtKSJCDCf9>. Essas amostras consistem de folhas e pequenos galhos. A coleta foi realizada no dia 16 de janeiro de 2022, secas em temperatura ambiente, sem incidência solar por 7 dias, trituradas e armazenadas a temperatura ambiente, protegidas da luz e umidade.

Um exemplar da planta foi encaminhado para identificação pela Prof^a. Dr^a. Giovana Faneco Pereira, junto ao departamento de agronomia da UTFPR.

4.3 PREPARO DOS EXTRATOS

Foi realizada uma extração exaustiva com 300 g de material seco e triturado e 1,5 L de etanol:água 80:20 v/v distribuídos em erlenmeyers sob agitação em Incubadora Shaker, modelo SL 222 em 150 rpm, 25 °C por 13 dias seguidos.

O processo consistiu em a cada 24 h realizar a filtração em papel filtro qualitativo com auxílio de bomba de vácuo, adicionar mais 1,5 L de solvente (etanol 80%) no material sólido e levado para Incubadora Shaker nas mesmas condições e realizado o processo até que a amostra apresentou uma coloração menos intensa, indicativo que os compostos tinham sido extraídos.

Posteriormente, foi realizado o processo de concentração da amostra em Evaporador Rotativo, marca Tecnal, modelo TE-211 em 60 rpm, 40 °C, acoplado a uma Bomba de Vácuo marca Lucadema, ajustado em 620 mmHg até a total recuperação do etanol. O material concentrado foi congelado e colocado em liofilizador marca Liotop, modelo L108 em 137 µHg, - 58 °C por 8 dias. Após liofilizado o material foi pesado, identificado e armazenado em refrigerador a - 4 °C.

OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

4.4 ANTIOXIDANTES

4.4.1 Compostos Fenólicos Totais

A determinação de compostos fenólicos totais foi realizada pelo método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA, 1999). O método consiste na formação de complexo de coloração azul pela oxidação dos fenóis presentes na amostra pelo reagente Folin-Ciocalteu.

As análises foram realizadas nos Laboratórios de Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná *campus* Pato Branco. Para quantificar compostos fenólicos totais, foi construída uma curva padrão utilizando-se ácido gálico como padrão de referência nas concentrações de 5, 10, 25, 75 e 100 µg mL⁻¹. Para cada concentração, o procedimento consistiu em adicionar 0,5 mL de ácido gálico em tubo de ensaio, 2,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu diluído em água 1:10 v/v, e após 5 minutos, adicionou-se 2 mL de carbonato de sódio (Na₂CO₃) a 4%. Após 2 horas em repouso e protegido da luz, fez-se a leitura em espectrofotômetro a 740 nm. O mesmo procedimento de reação foi realizado para os extratos diluídos para concentração de 0,5 mg mL⁻¹ e um branco com 0,5 mL de etanol:água 80:20 v/v e os

demais reagentes descritos acima. Todos os procedimentos foram feitos em triplicata.

Ao término das análises, fez-se a correlação da absorção da amostra com a curva padrão do ácido gálico e o resultado expresso massa/massa, ou seja, mg equivalente de ácido gálico por g de amostra/extrato mg EAG g⁻¹.

4.4.2 Atividade antioxidante por captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazina)

Para determinação da atividade antioxidante foi conforme a metodologia descrita por Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995), pelo método do sequestro do radical livre DPPH.

Primeiramente, foi construída uma curva padrão de 5 pontos com o antioxidante sintético trolox, nas concentrações de 15, 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O procedimento consistiu em reagir 0,5 mL de trolox de cada diluição, com 3 mL de etanol PA e 0,3 mL de DPPH 0,5 mmol L^{-1} em etanol. Fez-se um branco, com 0,5 mL de trolox com 3,3 mL de etanol PA e um controle com 3,5 mL etanol PA e 0,3 mL de DPPH 0,5 mmol L^{-1} . Essas misturas permaneceram em temperatura ambiente e protegida da luz por 45 minutos, e então, realizada a leitura em espectrofotômetro a 517 nm.

Feito a curva padrão, fez-se a reação do DPPH com a amostra devidamente diluída. O procedimento consistiu em adicionar em tubo de ensaio 0,5 mL da amostra na concentração 0,1 mg mL^{-1} com 3 mL de etanol PA e 0,3 mL de DPPH 0,5 mmol L^{-1} . Após 45 minutos nas mesmas condições descritas acima, realizou-se leitura em 517 nm. Todo o procedimento foi realizado em triplicata e o resultado obtido expresso em μmol de Trolox por grama de amostra.

4.4.3 Atividade antioxidante pela captura do radical cátion ABTS (2,2-azinobis-(3-etil-benzotiazolína-6-ácido sulfônico))

A determinação de atividade antioxidante foi realizada conforme metodologia descrita por Re et al. (1999).

Inicialmente obteve-se a formação do ABTS* a partir da mistura de 5 mL de ABTS 7 mmol L⁻¹ com 88 µL de persulfato de potássio 140 mmol L⁻¹. Essa mistura foi deixada em repouso por 16 horas protegido de luz e em temperatura ambiente.

Passado o tempo de formação do ABTS*, foi diluído 1 mL dessa solução em etanol até obtenção de uma solução com absorvância de 0,7 em 734 nm. Feito isso, adicionou-se em um tubo de ensaio 3 mL de ABTS* diluído em etanol, com absorvância de 0,7 em 734 nm com 30 µL da amostra, na concentração de 0,5 mg mL⁻¹. Fez-se um branco com etanol PA. Foi deixado por 6 minutos protegido de luz e em temperatura ambiente e após o tempo decorrido, foi realizada a leitura em 734 nm. A curva padrão foi feita como referência, nas mesmas condições da amostra, substituindo-as por solução padrão do antioxidante sintético Trolox. Fez-se as seguintes concentrações de Trolox para a curva padrão: 100, 500, 1000, 1500 e 2000 µmol L⁻¹ em etanol e o resultado expresso em µmol de equivalente trolox por g de amostra. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.4.4 Atividade antioxidante pelo método de redução do íon férrico – FRAP

A determinação da atividade antioxidante pelo método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) foi realizada conforme metodologia descrita por Benzie e Strain (1996), com algumas modificações. Primeiramente foi preparada a solução tampão de acetato 300 mmol L⁻¹, solução de TPTZ 10 mmol L⁻¹ com solução de HCl 40 mmol L⁻¹ e solução de cloreto férrico 20 mmol L⁻¹. Em seguida, preparou-se o reagente FRAP a partir da combinação de 25 mL de tampão acetato 300 mmol L⁻¹, 2,5 mL de uma solução TPTZ 10 mmol L⁻¹ e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mmol L⁻¹, sendo usado imediatamente após sua preparação. Posteriormente, em ambiente escuro adicionou em tubo de ensaio 100 µL da amostra na concentração de 0,5 mg mL⁻¹ e 3,0 mL do reagente FRAP. Homogeneizou-se em agitador de tubos e deixou em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. Fez-se a leitura em espectrofotômetro a 595 nm. Utilizou-se o reagente FRAP para calibrar o espectrofotômetro. Em seguida, foi construída uma curva padrão de sulfato ferroso nas seguintes concentrações: 200, 500, 1000, 1500 e 2000 µmol L⁻¹. O procedimento seguiu conforme o descrito acima, substituindo-se a amostra por cada concentração de sulfato ferroso correspondente.

A partir das absorvâncias obtidas e da equação da reta da curva-padrão, fez-se os cálculos. Levou-se em consideração a concentração inicial da amostra e a diluição. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol FeSO}_4$ por g de amostra e as análises foram realizadas em triplicata.

4.5 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS EM CLAE-DAD

A separação dos constituintes químicos foi realizada em um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE), modelo Varian 920-LC, com coluna de fase reversa Agilent Microsorb-MV 100-5 C18 (250 x 4,6 mm, tamanho de partícula 5 μm) com detector de arranjo de diodos.

A metodologia para determinação de compostos fenólicos foi realizada conforme descrito por Da Silva (2016), que validou o método capaz de separar completamente 12 compostos fenólicos com elevada seletividade e resolução. Para o ensaio, foram utilizados a mistura de 17 padrões: Ác. gálico, Catequina, Ác. clorogênico, Ác. Vanílico, Ác. Cafeico, Epicatequina, Ác. Cumárico, Ác. Ferúlico, Rutina, Isoquercetina, Ác. Isoclorogênico A, Astragalina, Ác. Salicílico, Miricetina, Quercetina, Ác. Cinâmico e Canferol.

A fase móvel (A) foi constituída de água:ácido acético (98:2 v/v) e (B) água:acetonitrila:ácido acético (58:40:2 v/v) em modo gradiente. Foram injetados 10 μL da amostra em triplicata com vazão da fase móvel 1 mL min^{-1} e temperatura do forno 30 °C. O gradiente foi feito da seguinte forma: Iniciou em 5% de fase B, 20 min 25% de B, 40 min 85% B, 45 min 85% B, 48 min 95% B, 51 min 95% e a partir de 54 min 5% de B até 64 min.

A diluição da amostra liofilizada de *C. bonariensis*, para as análises cromatográficas foi realizada com 50% metanol e 50% de acetonitrila:ácido acético:água (40:2:58 v/v). A caracterização dos extratos de *C. bonariensis* foi realizada comparando-se a absorção característica no ultravioleta e os respectivos tempos de retenção em comparação com os padrões injetados.

4.6 CROMATOGRAFIA GASOSA – ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)

O óleo essencial obtido em triplicada, em aparelho tipo clewenger, foi acondicionado em vidro tipo *vial*, com solvente *n*-hexano e armazenado sob refrigeração, até o momento da análise. As amostras foram enviadas para o Laboratório de Produtos Naturais e Ecologia Química – LAPNEQ (UFPR) para análise cromatográfica.

4.6.1 Análise cromatográfica acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e Identificação dos compostos

O equipamento utilizado para essa análise consiste num cromatógrafo gasoso modelo Shimadzu GC-2010 Plus acoplado a detector de massas do tipo triplo quadrupolo modelo TQ8040 e injetor automático modelo AOC-5000 Plus para análises de amostras líquidas, gasosas (*headspace*) e microextração em fase sólida (SPME). Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (5% difenil + 95% dimetil polissiloxano) com 30 m x 0,25 mm x 0,25 m.

As amostras de óleo essencial foram diluídas em *n*-hexano 99,5% e volume de injeção no equipamento foi de 1 µL de cada amostra. A temperatura de injeção iniciou a 60 °C com aumento de 3 °C min⁻¹ até 250 °C. O fluxo de gás hélio foi de 1,02 mL min⁻¹ em modo Split 1:90, com sistema de ionização do espectrômetro de massas 70 eV e tempo de análises em torno de 70 min.

A identificação dos compostos foi realizada com base no índice aritmético por meio da utilização de uma série homóloga de hidrocarbonetos lineares saturados contendo C8-C25 átomos de carbono injetados nas mesmas condições cromatográficas. Com os respectivos tempos de retenção, calculou-se o índice aritmético (IAC) e comparou-os com o índice aritmético da literatura (IAL) para os respectivos espectros de massas, para confirmação da presença de cada componente (ADAMS, 2017).

4.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para determinação da atividade antimicrobiana foram utilizadas 4 cepas bacterianas (2 gram-positivas e 2 gram-negativas): *S. aureus* ATCC 25923, *L.*

monocytogenes ATCC 19111, *E. coli* ATCC 25922 e *S. entérica Typhimurium* ATCC 0028, respectivamente.

4.7.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato de *C. bonariensis* em cepas bacterianas de referência ATCC foi realizada por meio do teste de diluição em caldo conforme protocolo CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2015).

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram conduzidos em placas com 96 poços, no qual em cada cavidade foram adicionados 100 µL do extrato nas diferentes concentrações (1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 mg mL⁻¹) juntamente com 100 µL de caldo Mueller Hinton e 5 µL da suspensão microbiana previamente padronizada em escala de McFarland 0,5 (1,5x10⁸ UFC mL⁻¹). As placas foram incubadas por 24 horas à 37 °C.

Após o tempo de incubação, foi adicionado em cada cavidade, 20 µL de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) na concentração de 0,5 mg mL⁻¹ para verificação da presença de células viáveis. Células viáveis são indicadas pelo aparecimento de coloração rósea e a ausência indica inibição celular.

4.7.2 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

O material dos poços que apresentaram resultados positivos, ou seja, inibição dos microrganismos (permanência da coloração azul do meio) foram repicadas para placas de Petri contendo ágar BHI e incubadas em estufa bacteriológica à 37 °C por 24 horas, para verificação da atividade bactericida da amostra. Como controles positivos foram utilizados o antimicrobiano tetraciclina. Para controle negativo, foi utilizada água peptonada 0,1% esterilizada.

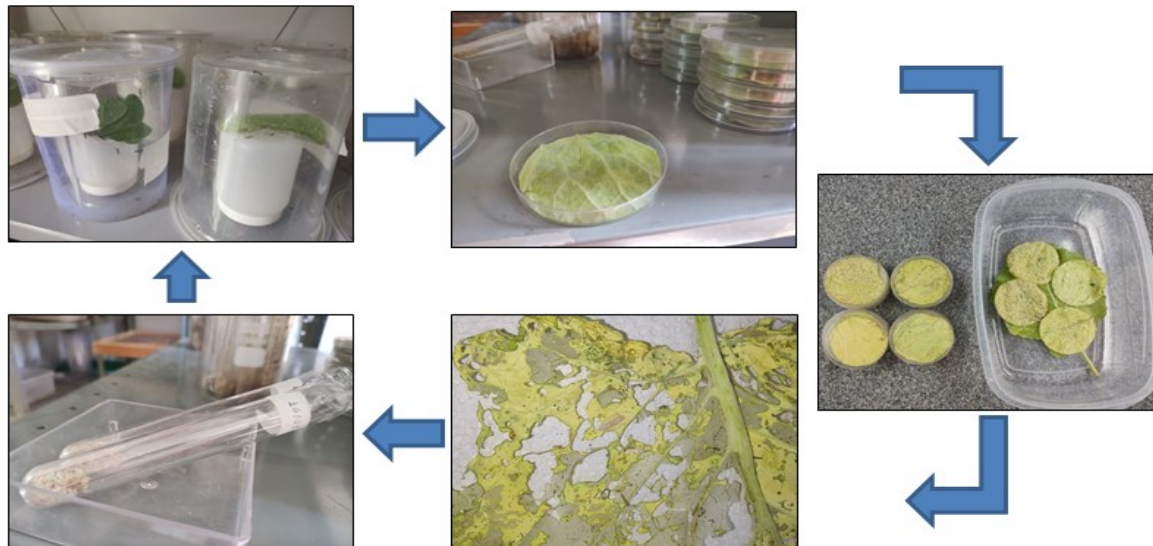
4.8 AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DE EXTRATOS DE CONYZA BONARIENSIS FRENTE *PLUTELLA XILOSTELLA*

A avaliação da toxicidade dos extratos e óleos essenciais de *C. bonariensis* frente à *P. xylostella* foram realizados baseados na metodologia utilizada por Afiunizadeh et al., (2022) com adaptações. Os ensaios e criação dos insetos foram realizados sob supervisão e orientação do Professor Dr. Gilberto Santos Andrade do Departamento de Ciências Agrárias da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), *Campus Pato Branco*.

4.8.1 Criação e manutenção da população de *P. xylostella*

A criação, manutenção e aumento da população de *P. xylostella* teve início no dia 26 de agosto de 2022, no laboratório de Entomologia no setor de Agronomia sob supervisão do Professor Dr Gilberto dos Santos Andrade. O procedimento de manutenção foi realizado três vezes por semana e separado em várias etapas (Figura 11).

Figura 11 - Etapas de criação e aumento da população de *Plutella xylostella*



Fonte: Autoria própria (2022).

Inicialmente, retiravam-se os discos de couve com ovos depositados, das gaiolas dos adultos e transferia-se para placas Petri de plástico para incubação. Após retirar o disco com ovos, substituíam-se por outro disco de couve fresca.

Os discos com ovos, eram alocados em gaiolas retangulares com folhas de couve frescas, até a eclosão e transferência natural das lagartas dos discos para as folhas inteiras. As gaiolas retangulares eram separadas e datadas conforme a idade das lagartas e a tampa adaptada com voil para aeração.

A próxima etapa consistia em retirar as pupas formadas nas folhas das gaiolas retangulares e transferi-las para tubos de ensaio fechados com plástico e pequeno furo, para disponibilidade de oxigênio até a fase adulta. Após a pupa se transformar em inseto adulto, esses eram transferidos para as gaiolas de adultos. Após a retirada das pupas das gaiolas retangulares, substituíam-se as folhas de couve para as lagartas restantes. E assim sucessivamente até aumento necessário da população.

4.8.2 Avaliação da toxicidade do extrato e óleo essencial de *C. bonariensis* frente a *P. xylostella*

Para avaliação da toxicidade do extrato liofilizado de *C. bonariensis* frente lagartas de terceiro instar de *P. xylostella*, foi realizado com base na metodologia descrita por Afiunizadeh (2022), com modificações.

Primeiramente o extrato liofilizado de *Cb* foi ressolubilizado em água destilada e Tween 80 (0,05%) como emulsificante. Foram preparadas soluções para o teste em 2% (20 mg mL⁻¹) e 0,5% (5 mg mL⁻¹). O ensaio foi realizado em quadruplicata. Foram recortadas folhas de couve saudáveis com 8 cm de diâmetro, higienizadas em água destilada, secas com papel toalha e posteriormente imersas nas soluções de 2 e 0,5% por 30 segundos e colocados em papel toalha por 2 horas em temperatura ambiente com a superfície da folha adaxial para cima (Figura 12).

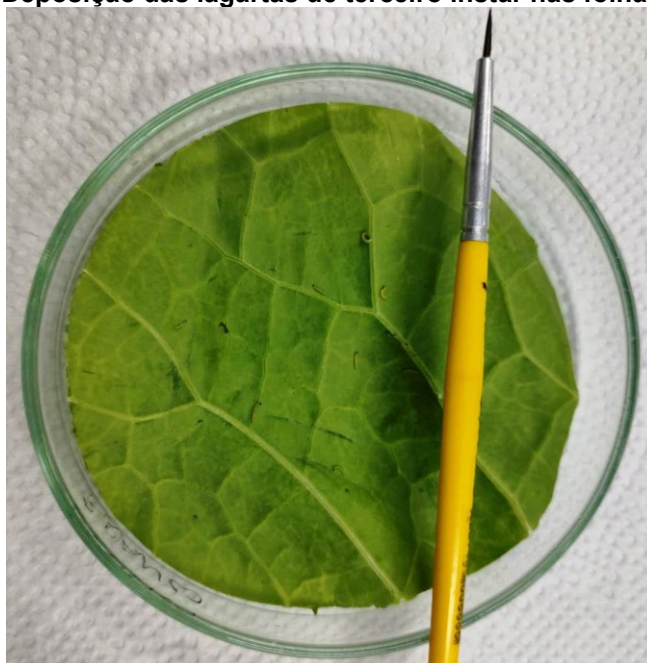
Figura 12 - Preparação das folhas de couve com os respectivos tratamentos



Fonte: Autoria própria (2022).

Passados 2 horas, os discos foram colocados em placas de Petri e com o auxílio de um pequeno pincel, 10 lagartas de terceiro instar foram transferidas para cada disco (Figura 13).

Figura 13 - Deposição das lagartas de terceiro instar nas folhas de couve tratadas



Fonte: Autoria própria (2022).

As placas foram fechadas com plástico filme com pequenos orifícios para disponibilizar oxigênio para as lagartas, posteriormente alocadas em incubadora tipo DBO com temperatura de 25 °C, 60% umidade, 12 horas de luz artificial e 12 horas no escuro. Foi feito em quadruplicata um branco, com 10 lagartas e os discos imersos somente em água destilada com Tween 80 (0,05%) para verificar se o solvente de ressolubilização não traria efeito tóxico para as lagartas.

Para avaliar a toxicidade do óleo essencial de *C. bonariensis* frente a *Plutella xylostella*, obtido a partir de 100 g de amostra vegetal seca e triturada, por hidrodestilação em aparelho tipo cleveger, por quatro horas. As amostras de óleo essencial obtidas, foram armazenadas em recipientes hermeticamente fechados e em baixa temperatura (-5 °C) até o momento das análises.

O procedimento para avaliação da toxicidade do óleo essencial de *C. bonariensis* frente *P. xylostella* foi realizado conforme descrito anteriormente para o teste dos extratos. Óleos essenciais foram testados nas concentrações de 2 e 0,5%.

A avaliação dos parâmetros biológicos das larvas de terceiro instar frente ao extrato e óleo essencial foram observados no período larval até a formação de pupa. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 5 tratamentos distintos e 4 repetições, constituídos por 10 larvas cada. Os resultados obtidos de mortalidade foram submetidos a análises estatísticas pelo programa *Statistica* de variância e teste Tukey com 95 % de significância ($P < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E ÓLEOS ESSENCIAIS

Sabe-se que a escolha do processo de extração para identificação e quantificação de compostos bioativos de plantas é de grande importância, tendo em vista diversos fatores que podem influenciar tanto qualitativamente como quantitativamente. Esses fatores podem ser: temperatura, tempo de extração, tipo de solventes ou combinação de um ou mais solventes, sazonalidade na coleta das amostras, características do solo, posição geográfica, entre outros (MALECK et al., 2021; JESUS, 2016).

As partes aéreas da *C. bonariensis* foram coletadas de ambiente cercado, sem nenhuma aplicação de agrotóxico ou adubação no seu período de desenvolvimento. Eram provenientes de crescimento natural, e a coleta foi realizada antes da floração. As partes aéreas consistiam em folhas e pequenos galhos, sendo descartados galhos com maior espessura. Foram secas em temperatura ambiente, protegidas da luz solar e com ventilação natural por 7 dias. A escolha de secagem em temperatura ambiente foi com base em trabalhos que avaliaram a influência da temperatura no processo de secagem de plantas para análises de conteúdo fenólicos totais e atividade antioxidante pela possível degradação desses compostos pela ação do calor. Santos e Tonin (2019) avaliaram essa influência na secagem de folhas *Plantago major* (Tansagem), e observaram que o aumento da temperatura diminuiu o potencial antioxidante por DPPH e compostos fenólicos, sendo a temperatura de 40 °C a menor avaliada e com maior eficiência.

Outro fator que pode influenciar na extração dos compostos bioativos é o solvente. Optou-se pela extração exaustiva etanol:água 80:20 v/v, visto que além de ser um solvente economicamente viável, suas características permitem extrair compostos de diferentes polaridades, e conforme Fernandes (2013), extrações hidroetanólicas apresentaram em seu trabalho, melhores rendimentos quando se deseja investigar conteúdo de fenólicos totais de *Psidium guajava* L. Prasniewski (2019) em seu estudo de isolamento, identificação e quantificação de compostos bioativos em Jambuí Vermelho, observou que extração hidroetanólica, etanólica e com acetona apresentaram melhores resultados para quantificação de fenólicos

totais e atividade antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP, dados esses que corroboram com alguns objetivos deste estudo.

O processo de obtenção dos extratos hidroetanólicos foi realizado por 13 dias, em que, quando observada coloração constante da solução (Figura 14) o processo foi encerrado. Foram utilizados no total 18 litros de solvente nesse processo. Após a extração sequencial exaustiva, o solvente foi recuperado em rotaevaporador e o extrato liofilizado, obtendo-se um rendimento de 72,41 g, correspondendo a 24,13% da massa inicial de partes aéreas de *Cb*.

Figura 14 - Extratos obtidos por extração exaustiva



Fonte: Autoria própria (2022).

Para obtenção de óleos essenciais, foi utilizado o material triturado obtido por secagem em temperatura ambiente. Foram obtidos após 4 horas de hidrodestilação em aparato de Clevenger um total de 0,6 mL, apresentando coloração amarelada e odor agradável, com rendimento de 0,2%. Óleos essenciais foram obtidos para avaliar a capacidade de toxicidade frente a *Plutella xylostella* e identificação de compostos por cromatografia gasosa acoplado a um espectrômetro de massas (CG-EM).

Também chamados de óleos voláteis, os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias lipofílicas, voláteis, geralmente apresentam características líquidas e odoríferas obtidas de plantas por meio destilação por arraste de vapor d'água. Os óleos essenciais são geralmente incolores ou amarelados e sua principal característica é a volatilidade (SIMÕES et al., 2017, p. 167). O teor e a composição química podem variar conforme a variedade da planta, localização geográfica, época de coleta, condições de solo, clima e agressões por agentes externos como vento, chuva, ataque de insetos, herbívoros (OLIVEIRA; MAIOR; DRESCH, 2018, p. 207), parte da planta do qual é extraído (ARAÚJO, 2015), etc. Vale ressaltar que o estresse causado pelos agentes externos também pode aumentar a produção de óleos essenciais como forma de defesa da planta

(OLIVEIRA; MAIOR; DRESCH, 2018, p. 207). Diante dessas informações, pode-se sugerir que a quantidade e composição do óleo essencial obtido da *C. bonariensis* pode variar de uma coleta de material que não foi exposta a agrotóxicos, como é o caso do presente estudo, com as que estão diretamente na linha de produção de grãos, sofrendo agressões sucessivas de agrotóxicos, criando assim mecanismos de defesa e possivelmente alterando e aumentando a produção desses óleos essenciais para defesa e regeneração da mesma.

5.2 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO

As plantas possuem artifícios de defesa e a principal característica da *C. bonariensis* é sua capacidade resistiva a diferentes herbicidas mundialmente comercializados, bem como, não é uma planta de interesse de herbívoros, não havendo um controle natural, e sim uma capacidade vasta de propagação. Esses artifícios e características de resistência podem estimular a produção de compostos bioativos produzidos pelo seu metabolismo especializado, que trazem grande interesse para pesquisa.

Os compostos fenólicos possuem alto poder antioxidante e a identificação e quantificação desses compostos é de grande valia. No presente trabalho foram quantificados Compostos Fenólicos Totais (CFT) obtendo-se 182,55 mg EAG g⁻¹ de extrato liofilizado de *C. bonariensis* (Tabela 1).

Tabela 1 - Resultados da análise de Compostos Fenólicos Totais (CFT) e atividade antioxidante por ABTS, DPPH e FRAP do extrato liofilizado de *Cb*

| Ensaio antioxidante | Extrato hidroetanólico |
|--|------------------------|
| ABTS (μmol Trolox g ⁻¹) | 1489,90 ± 162,99 |
| CFT (mg EAG g ⁻¹) | 182,55 ± 10,23 |
| DPPH (μmol Trolox g ⁻¹) | 786,10 ± 24,15 |
| FRAP (μmol FeSO ₄ g ⁻¹) | 3386,36 ± 99,77 |

Nota: EAG = Equivalente ácido gálico; n = 9.

Fonte: Autoria própria (2022).

Schechtel et al. (2019) obtiveram 35,49 mg EAG g⁻¹ de extrato de CFT para extratos de *C. bonariensis* obtidos com 50:50 etanol/água; Thabit et al. (2015) 144,1 mg EAG g⁻¹ de extrato de *C. bonariensis* para extratos 90:10 etanol/água, mostrando assim, a variabilidade conforme a porcentagem de etanol, assim como, outros

fatores podem variar qualitativamente e quantitativamente CFT. Espinoza et al. (2020) encontraram elevado conteúdo de CFT (340,84 mg EAG g⁻¹ de extrato de *C. bonariensis*) obtidos com acetato de etila, um valor superior ao obtido no presente trabalho, mostrando assim a influência do solvente na quantificação de CFT. Daur (2013) obteve 78 mg EAG g⁻¹ de extrato metanólico de amostras coletadas na Arábia Saudita.

Para avaliar atividade antioxidantes, foram utilizadas três metodologias distintas: ABTS, DPPH e FRAP, no qual foram encontrados 1489,90 µmol Trolox g⁻¹, 786,10 µmol Trolox g⁻¹ e 52,41 ± 1,32% de inibição do radical DPPH e 3386,36 µmol FeSO₄ g⁻¹ de extrato de *C. bonariensis*, respectivamente (Tabela 1). Daur (2013), obteve por FRAP em extratos metanólicos de *C. bonariensis* 1820,0 µmol FeSO₄ g⁻¹, valor inferior quando comparado ao presente trabalho e inibição de 58% do radical DPPH.

Schechtel et al. (2019) obtiveram por DPPH 1510,0 µg de EAA (Equivalente Ácido Ascórbico) g⁻¹ de extrato de *C. bonariensis* e FRAP 44350,0 µg de EAA 100 g⁻¹ de extrato de *C. bonariensis*.

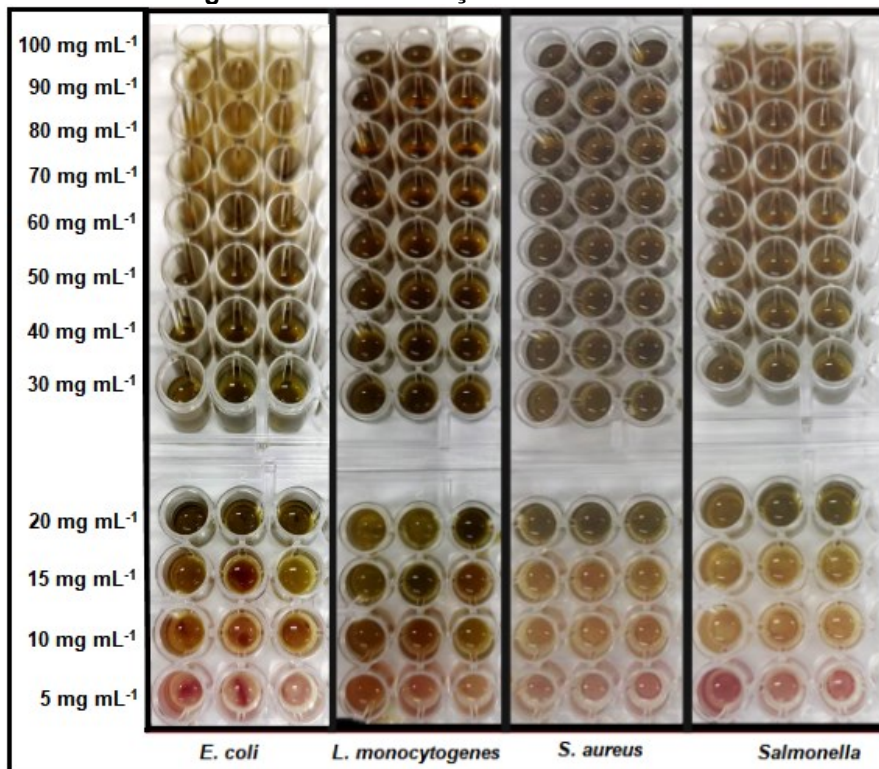
Potbhare et al. (2019) avaliaram antioxidantes por DPPH em diferentes extratos de *C. bonariensis* e observaram um aumento da eliminação do DPPH para extrato etanólico 49,40% e metanólico 75,66%, demonstrando assim, o alto potencial do metanol para avaliação de atividade antioxidante.

5.3 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA

Foi observado a concentração inibitória mínima em 10 mg mL⁻¹ para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e 5 mg mL⁻¹ para *L. monocytogenes* e *Salmonella* (Figura 15) (Tabela 2).

Os poços com concentrações de 5, 10 e 20 mg mL⁻¹ de extrato para *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *Salmonella entérica typhimurium* e 20 mg mL⁻¹ para *E. coli* foram repicadas em placas de Petri contendo ágar BHI e incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas. Um controle foi utilizado sendo feito repique no poço de concentração de 100 mg mL⁻¹ de extrato para *E. coli*.

Figura 15 - Concentração Inibitória Mínima



Fonte: Autoria própria (2022).

Tabela 2 - Concentração inibitória mínima e Concentração bactericida mínima

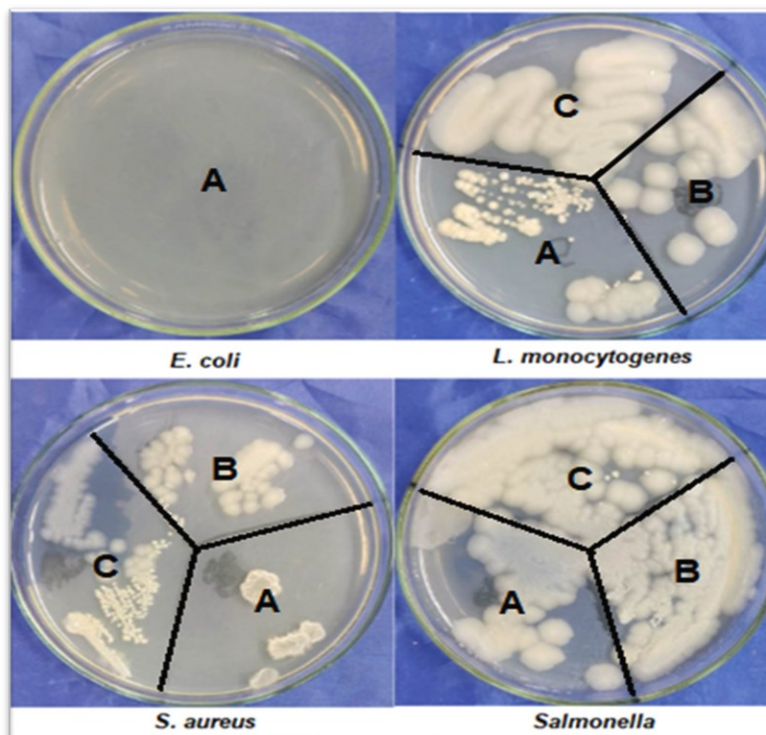
| Microrganismos | CIM (mg mL ⁻¹) | CBM (mg mL ⁻¹) |
|--|----------------------------|----------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | 10 | 20 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | 10 | >20 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111 | 5 | >20 |
| <i>S. entérica typhimurium</i> ATCC 0028 | 5 | >20 |

CIM: Concentração inibitória mínima; CBM: Concentração bactericida mínima.

Fonte: Autoria própria (2023).

Foi possível verificar atividade bactericida na concentração de 20 mg mL⁻¹ para *E. coli* (Figura 16). Nas demais placas não apresentaram atividade bactericida nas concentrações testadas.

Figura 16 - Concentração Bactericida Mínima



Nota: A = 20 mg mL⁻¹; B = 10 mg mL⁻¹; C = 5 mg mL⁻¹.
 Fonte: Autoria própria (2022).

Thabit et al. (2015) em análises bacteriológicas verificaram que extratos etanólicos de *C. bonariensis* inibiram o crescimento de *E. coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium*, assim como, *Streptococcus pyogenes* e *Shigella dysenteriae*. Observaram também, que as Gram (+) eram mais susceptíveis ao extrato, e o *S. aureus* o mais sensível em concentração de extrato a 20 mg mL⁻¹.

Schechtel et al. (2019) avaliaram a atividade antimicrobiana e encontraram inibição do crescimento de *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* Enteritidis frente a extratos etanólicos, corroborando assim com o presente trabalho.

Potbhare et al. (2019) testaram a atividade antibacteriana com concentrações entre 0,5 e 1 mg mL⁻¹ de extratos aquosos de *C. bonariensis* e não observaram inibição contra *E. coli* e *Staphylococcus aureus*, porém, na confecção de nanopartículas contendo extrato de *C. bonariensis*, obtiveram resultados satisfatórios contra *E. coli*, *S. aureus* e *K. pneumoniae*.

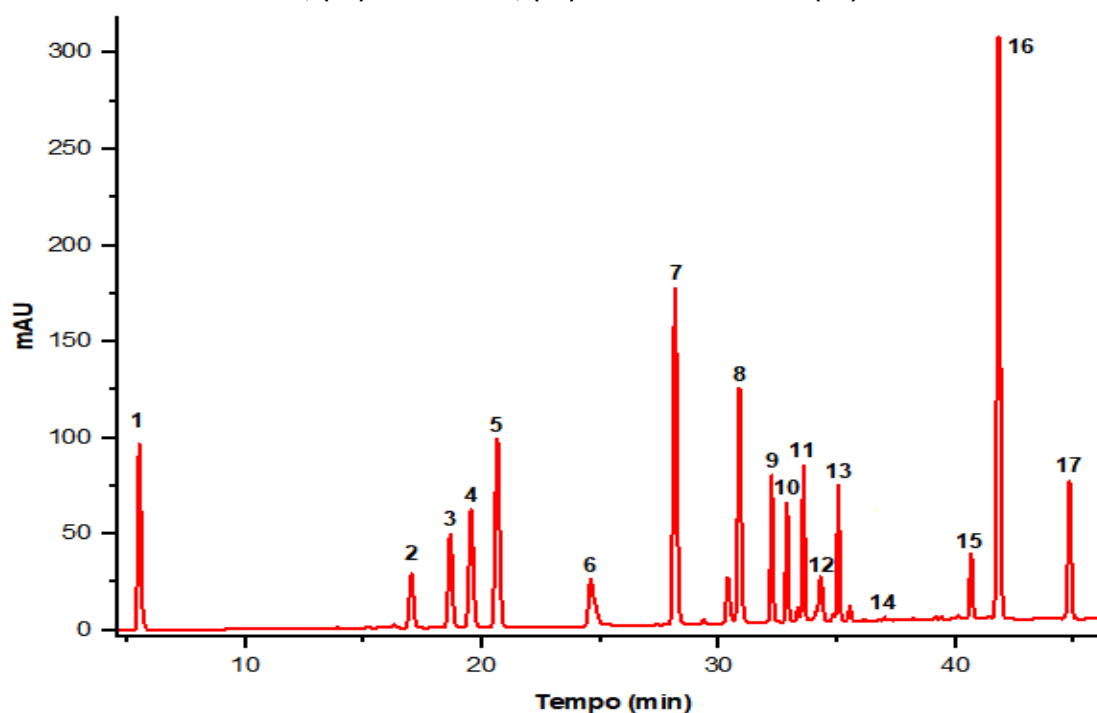
Paula et al. (2018) obtiveram em extratos metanólicos de folhas e raízes uma concentração inibitória mínima com 1 mg mL⁻¹ contra *S. aureus* e *E. coli*, uma

concentração bem menor se comparado com o presente estudo. Deve-se levar em consideração o solvente extrator utilizado pelos pesquisadores.

5.4 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM CLAE-DAD

Para avaliar o perfil químico da *C. bonariensis* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com arranjo de detector de diodos, inicialmente foram injetados 17 padrões de compostos fenólicos (Figura 17) (Tabela 3).

Figura 17 - Cromatograma dos padrões utilizados na identificação e quantificação dos compostos fenólicos. (1) Ácido gálico; (2) Catequina; (3) Ácido clorogênico; (4) Ácido vanílico; (5) Ácido cafeico; (6) Epicatequina; (7) Ácido fumárico; (8) Ácido ferrúlico; (9) Rutina; (10) Isoquercetina; (11) Ácido Isoclorogênico A; (12) Astragalina; (13) Ácido salicílico; (14) Miricetina; (15) Quercetina; (16) Ácido cinâmico e (17) canferol



Fonte: Autoria própria (2023).

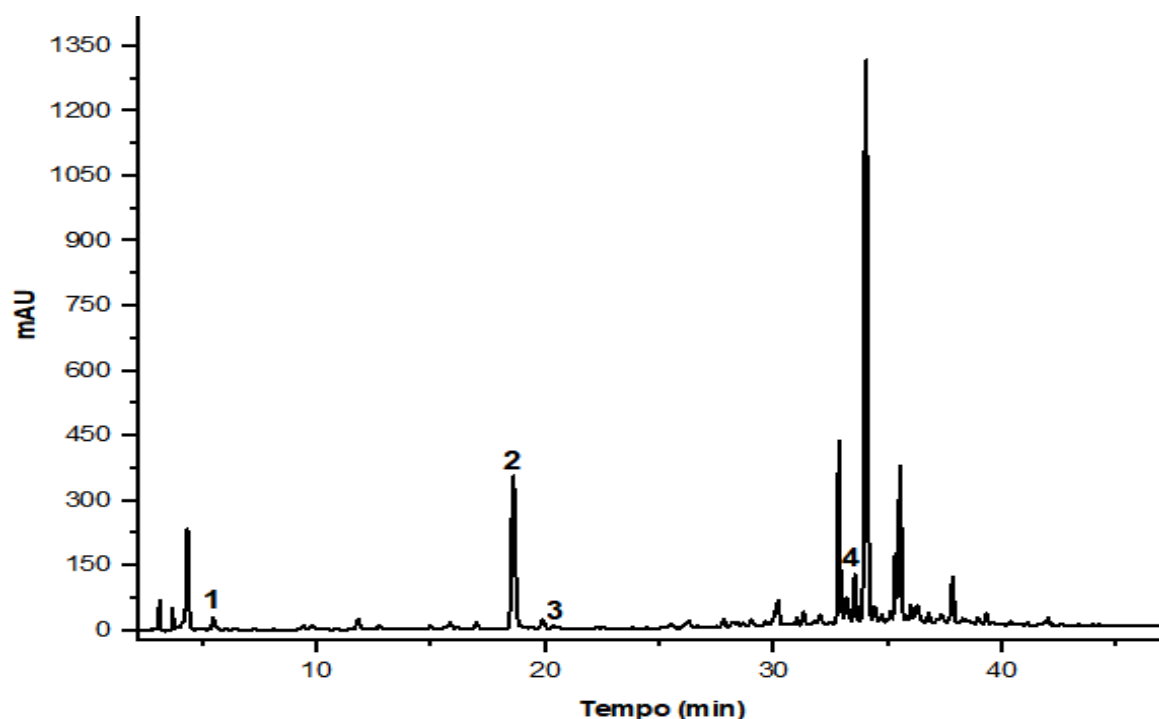
Tabela 3 - Padrões de Compostos Fenólicos

| Composto | Compostos Fenólicos | LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | LQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | TR (min) | Absorção UV (nm) | Curva de Calibração | R ² |
|----------|----------------------|------------------------------|------------------------------|----------|------------------|----------------------|----------------|
| 1 | Ác. Gálico | 0,3 | 0,075 | 5,5 | 271 | $y = 0,427x - 0,071$ | 0,99 |
| 2 | Catequina | 2,0 | 1,000 | 17,0 | 278 | $y = 0,157x - 0,015$ | 0,99 |
| 3 | Ác. Clorogênico | 1,5 | 0,500 | 18,6 | 324 | $y = 0,269x - 0,081$ | 0,99 |
| 4 | Ác. Vanílico | 0,5 | 0,075 | 19,5 | 259 | $y = 0,361x - 0,096$ | 0,99 |
| 5 | Ác. Cafeico | 0,5 | 0,100 | 20,6 | 322 | $y = 0,570x - 0,292$ | 0,99 |
| 6 | Epicatequina | 2,5 | 1,000 | 24,5 | 278 | $y = 0,117x - 0,085$ | 0,99 |
| 7 | Ác. Cumárico | 0,5 | 0,200 | 28,1 | 309 | $y = 0,856x - 0,219$ | 0,99 |
| 8 | Ác. Ferrúlico | 0,3 | 0,100 | 30,8 | 322 | $y = 0,533x - 0,199$ | 0,99 |
| 9 | Rutina | 1,0 | 0,300 | 32,2 | 254/354 | $y = 0,239x + 0,009$ | 0,99 |
| 10 | Isoquercetina | 1,0 | 0,400 | 32,8 | 253/354 | $y = 0,203x - 0,008$ | 0,99 |
| 11 | Ác. Isoclorogênico A | 3,5 | 1,000 | 33,5 | 324 | $y = 0,242x + 0,288$ | 0,99 |
| 12 | Ác. Salicílico | 0,5 | 0,300 | 34,2 | 301 | $y = 0,552x - 0,364$ | 0,99 |
| 13 | Astragalina | 0,3 | 0,100 | 35,0 | 263/345 | $y = 0,456x - 0,314$ | 0,99 |
| 14 | Miricetina | 5,0 | 1,000 | 37,0 | 371 | $y = 0,091x - 0,198$ | 0,99 |
| 15 | Quercetina | 2,0 | 0,500 | 40,6 | 252/371 | $y = 0,197x + 0,120$ | 0,99 |
| 16 | Ác. Cinâmico | 0,5 | 0,200 | 41,8 | 276 | $y = 1,374x - 0,668$ | 0,99 |
| 17 | Canferol | 2,0 | 0,500 | 44,8 | 262/366 | $y = 0,297x - 0,049$ | 0,99 |

Fonte: Autoria própria (2022).

Foram identificados 4 compostos: Ácido Gálico, Ácido Clorogênico, Ácido cafeico e Ácido Isoclorogênico A nos extratos de *C. bonariensis* (Figura 18).

Figura 18 - Cromatograma do extrato de *C. bonariensis*. (1) Ácido gálico; (2) Ácido clorogênico; (3) Ácido cafeico e (4) Ácido isoclorogênico A



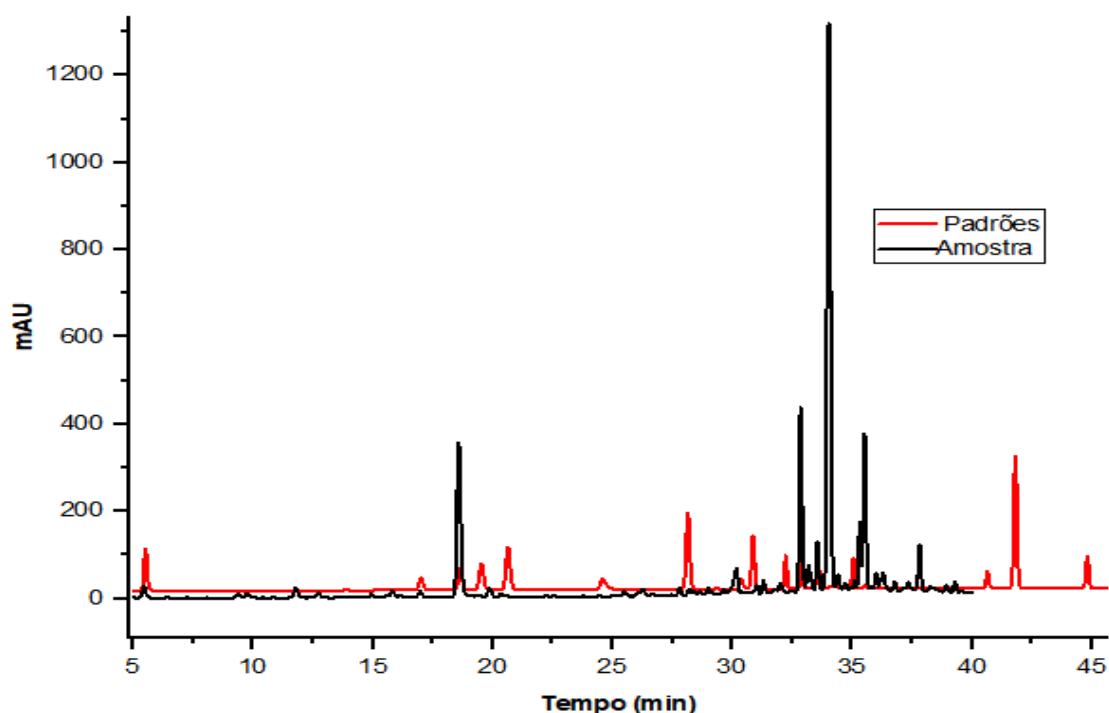
Fonte: Autoria própria (2023).

O cromatograma dos padrões de compostos fenólicos (Figura 17) e do extrato de *C. bonariensis* (Figura 18) eluíram até 64 minutos, sendo que o padrão com maior tempo de retenção é o canferol em 44,8 minutos. Foram observados sinais de picos na amostra até aproximadamente 42 minutos. O pico majoritário na amostra foi observado em 33,88 minutos, não sendo possível identificar por não ter padrão para comparação, porém, pelas características de absorção entre 250 a 400 nm e tempo de retenção fornecidas pelo software, sugere-se ser um derivado do ácido cafeico.

Pelo perfil cromatográfico da amostra de *C. bonariensis*, é possível observar uma série de picos a partir de 30 minutos, provavelmente de compostos mais apolares, por terem maior afinidade com a fase estacionária que é apolar.

Em seguida, (Figura 19) é possível observar a sobreposição dos picos cromatográficos da amostra de *C. bonariensis* e dos padrões de compostos fenólicos e seus respectivos tempos de retenção.

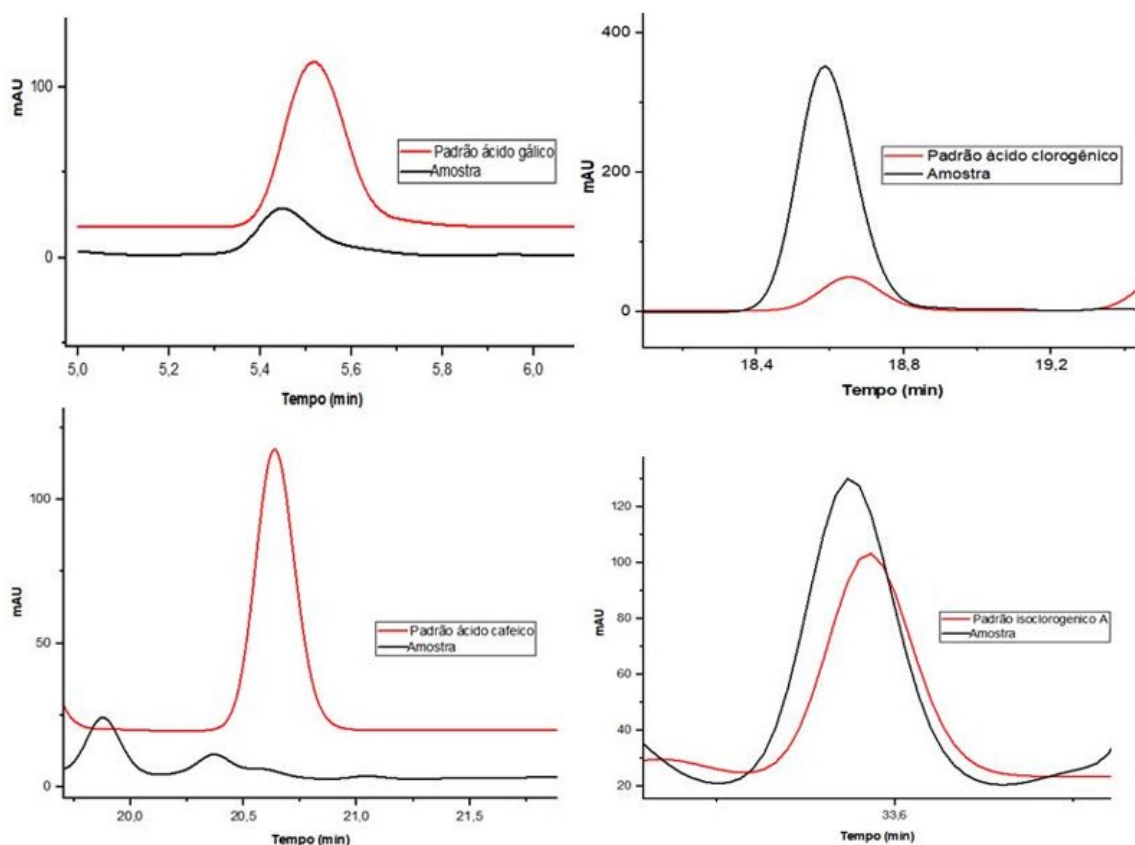
Figura 19 - Sobreposição do cromatograma do extrato de *C. bonariensis* e dos padrões



Fonte: Autoria própria (2023).

Os compostos fenólicos da amostra de *C. bonariensis* foram identificados comparando os respectivos tempos de retenção, faixa de absorção no ultravioleta e comprovação via comparação com a biblioteca construída pelos usuários no software do equipamento (Figura 20).

Figura 20 - Cromatograma dos compostos identificados

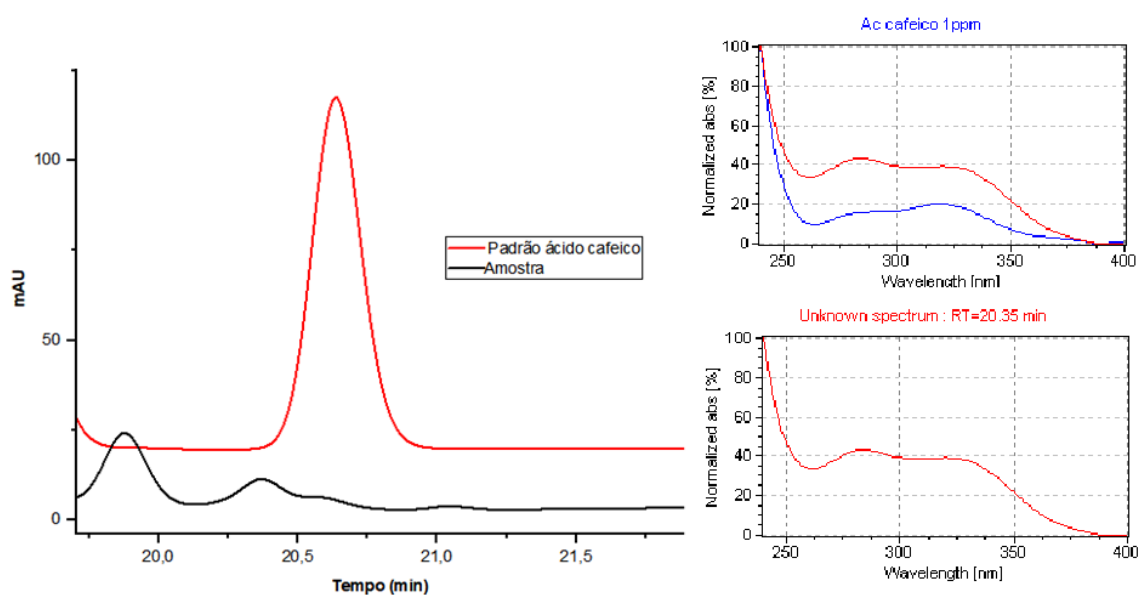


Fonte: Autoria própria (2023).

O padrão ácido gálico tem TR 5,52 min e absorção UV 271 nm e o pico encontrado na amostra apresentou TR 5,44 min e absorção em 284 nm. Para o padrão de Ácido clorogênico o TR é de 18,65 min e absorve em 324 nm, na amostra apresentou TR 18,58 min e absorção em 324 nm. O Ácido Isoclorogênico A do padrão tem TR 33,57 min, absorção em 324 e na amostra apresentou TR 33,18 min e absorveu em 326 nm.

O ácido cafeico do padrão apresentou TR 20,64 min e absorve em 322 nm e na amostra o RT foi observado um pico em 20,35 min e um sinal fraco, não sendo possível nessas condições quantificá-lo. Só foi possível comprovar a presença do Ácido cafeico devido a comparação da amostra com a biblioteca do software (Figura 21).

Figura 21 - Comparação do padrão Ácido cafeico da amostra com a biblioteca do software



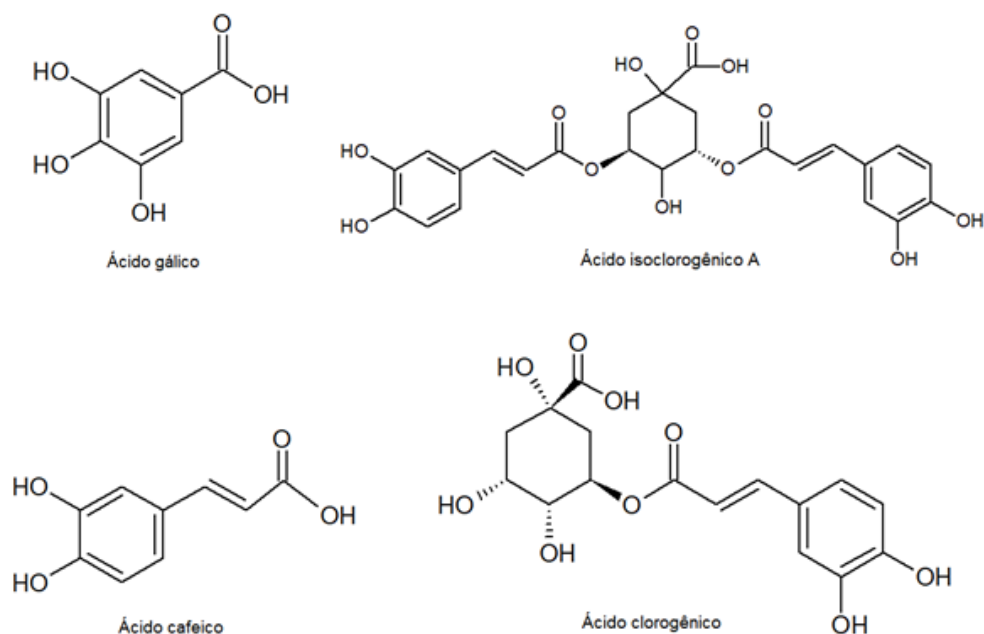
Fonte: Autoria própria (2023).

Após a identificação dos compostos da amostra, fez-se a quantificação dos mesmos (Tabela 4). Obteve-se 1,07 mg de ácido gálico por grama de amostra, 24,93 mg g⁻¹ de ácido clorogênico, ácido cafeico < LQ e 5,25 mg g⁻¹ de ácido isoclorogênico A. As moléculas dos compostos identificados podem ser observados na figura 22.

| Tabela 4 - Concentração de compostos fenólicos identificados por CLAE | |
|---|------------------------------------|
| Composto Fenólico Identificado | Concentração (mg g ⁻¹) |
| Ácido Gálico | 1,07 ± 0 |
| Ácido Clorogênico | 24,93 ± 1,41 |
| Ácido Cafeico | < LQ |
| Ácido Isoclorogênico A | 5,25 ± 0,48 |

Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 22 - Ácidos fenólicos identificados em extratos hidroetanólicos *C. bonariensis*



Fonte: Autoria própria (2023).

Schechtel et al. (2019) em extratos água:etanol 25:75 v/v encontraram 4,6556 mg g⁻¹ de ácido cafeico, 1,3908 mg g⁻¹ de ácido gálico, valores superiores ao presente trabalho, além de encontrarem 0,0117 mg g⁻¹ de catequina e 0,0177 mg g⁻¹ quercetina. Thabit et al. (2015) em extratos etanol/água 90:10 v/v encontraram quercetina e Saleem et al. (2015) também encontraram quercetina, mas em extratos metanólicos. Esses resultados demonstram a variabilidade dos compostos conforme a forma de extração e local geográfico, entre outros fatores que podem influenciar na composição e quantificação de compostos bioativos em uma mesma espécie.

5.5 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS POR CG-EM

Para identificação dos compostos presentes no óleo essencial de *C. bonariensis* calcularam-se os Índices Aritméticos (IAC) com base nos respectivos tempos de retenção, sendo então comparados com Índices Aritméticos (IAL) e perfil de fragmentação de espectro de massas disponível da literatura (ADAMS, 2017). Dessa forma, foi possível identificar e quantificar 6 compostos, sendo 4 monoterpenos: α -pineno, sabineno, β -pineno, limoneno e 2 sesquiterpenos oxigenados: espatulenol e óxido de cariofileno (Tabela 5). As moléculas dos compostos identificados podem ser observadas na Figura 23.

Dos compostos identificados, 65,052% correspondem aos hidrocarbonetos monoterpênicos e 34,946% aos sesquiterpenos oxigenados.

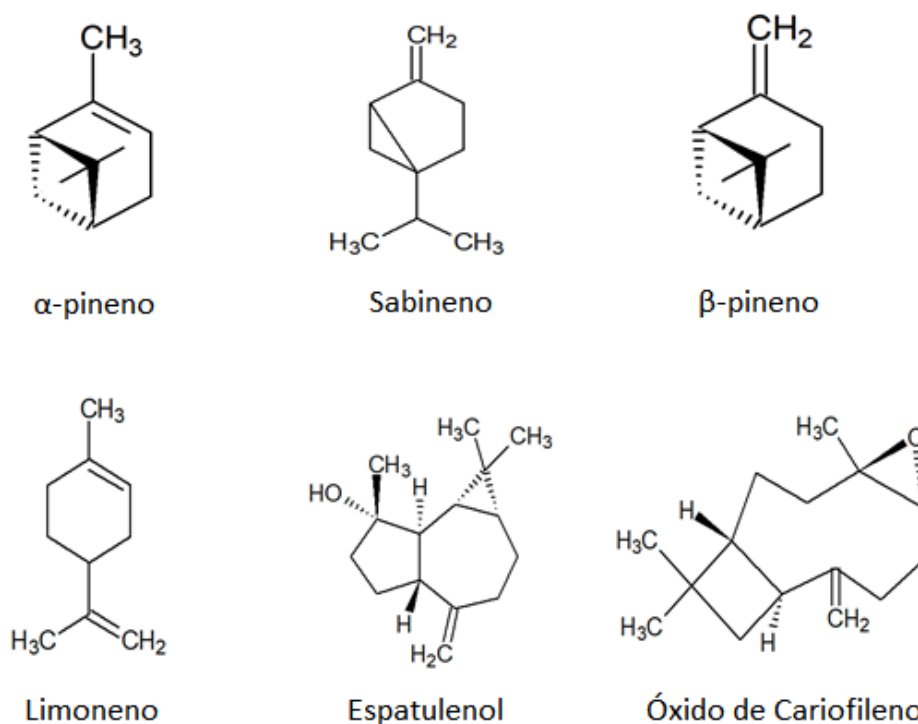
Tabela 5 - Metabólitos voláteis obtidos por hidrodestilação de amostras de *C. bonariensis*

| Composto | TR | IAC | IAL | Concentração (%) |
|----------------------------|--------|------|------|-------------------|
| α -pineno | 6,427 | 930 | 932 | 4,113 \pm 0,52 |
| Sabineno | 7,743 | 969 | 969 | 2,576 \pm 0,95 |
| β -pineno | 7,919 | 974 | 974 | 6,543 \pm 1,21 |
| Limoneno | 9,886 | 1026 | 1024 | 51,82 \pm 2,05 |
| Espatulenol | 33,227 | 1565 | 1577 | 15,45 \pm 0,32 |
| Óxido de Cariofileno | 33,413 | 1570 | 1582 | 19,496 \pm 1,83 |
| Total identificados | | | | 99,99 % |

Tr = Tempo de retenção; IAC = Índice Aritmético Calculado; IAL = Índice Aritmético Literatura.

Fonte: Autoria própria (2023).

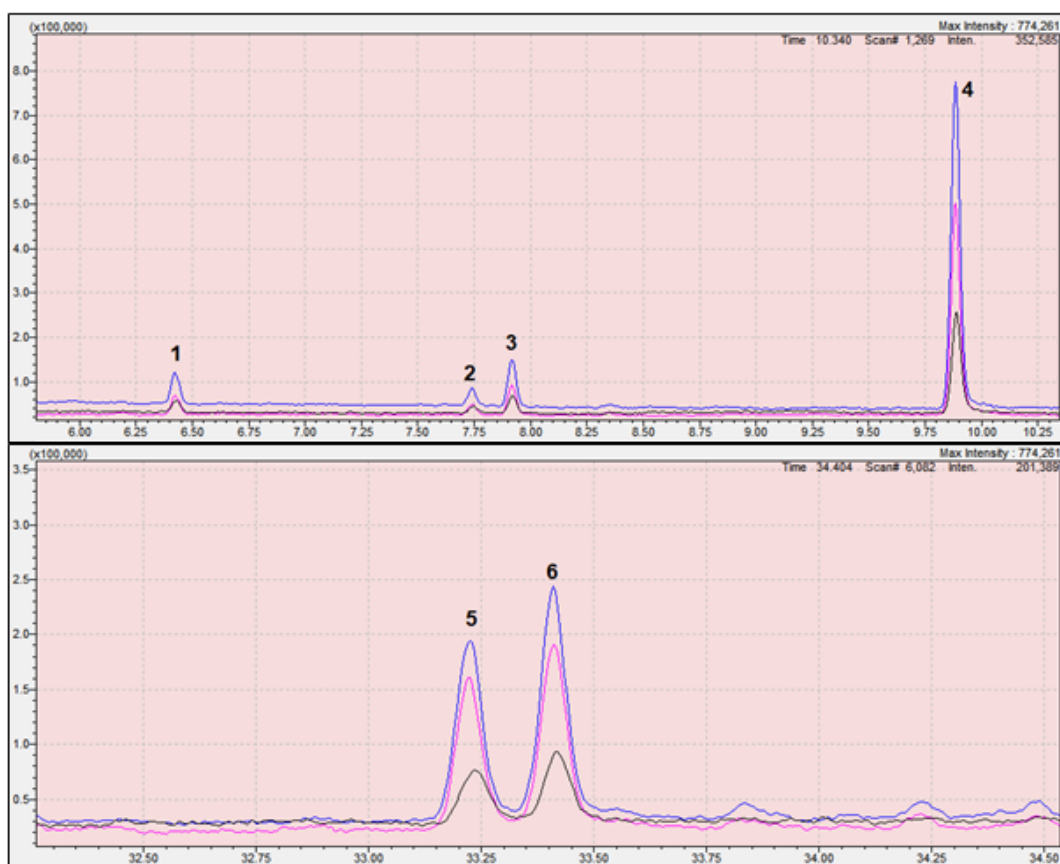
Figura 23 - Metabólitos secundários identificados em óleos essenciais de *C. bonariensis*



Fonte: Autoria própria (2023).

Também é possível observar a sobreposição dos picos cromatográficos da triplicata, confirmando assim, o perfil dos compostos obtidos (Figura 24).

Figura 24 - Sobreposição dos cromatogramas da triplicata. 1) α -pineno; 2) sabineno, 3) β -pineno; 4) limoneno; 5) espatulenol e 6) óxido de cariofileno

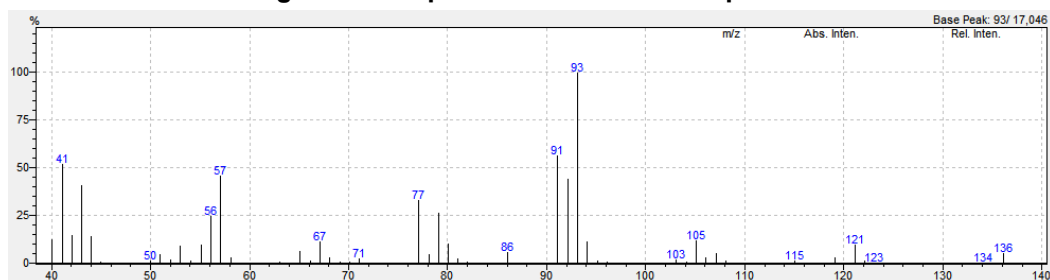


Fonte: Autoria própria (2023).

Os óleos essenciais podem ser encontrados em várias partes da planta e sua composição química pode apresentar 20 a 200 compostos diferentes conforme a espécie estudada. São chamados componentes majoritários quando a concentração de determinado componente presente entre 20 e 95%, secundários entre 1 a 20% e traços menor que 1% (SIMÕES, 2017, p. 167). No óleo essencial de *C. bonariensis* o componente majoritário identificado foi o limoneno (51,82%), seguido do óxido de cariofileno (19,496%), espatulenol (15,45%), β -pineno (6,543%), α -pineno (4,113%) e sabineno (2,576%).

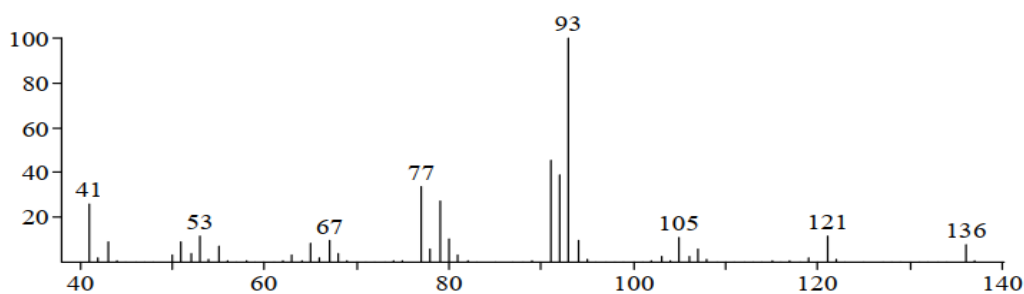
Os compostos foram identificados a partir do IAC, o IAL e avaliação do perfil de fragmentação obtido em comparação com a literatura. Os componentes α -pineno (Figura 25) e sabineno (Figura 27) foram identificados e seus espectros de massa comparados com a literatura (ADAMS, 2017) (Figura 26) (Figura 28). Para espécies de *C. bonariensis* Hoi et al. (2021) e Tzakou et al. (2005) encontraram apenas traços desses compostos.

Figura 25 - Espectro de massas do α -pineno



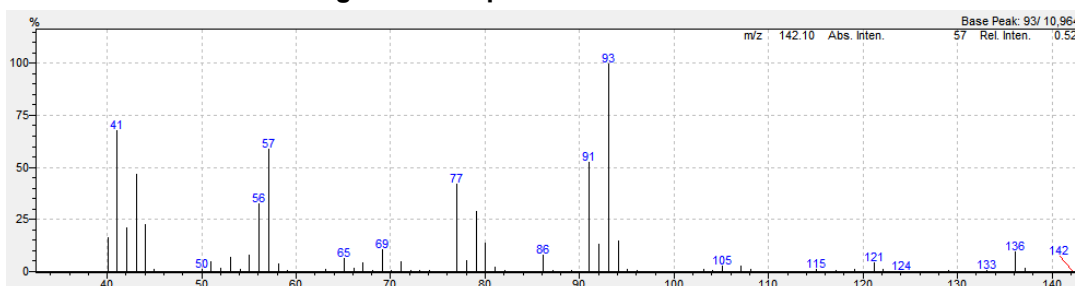
Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 26 - Espectro de massas do α -pineno literatura



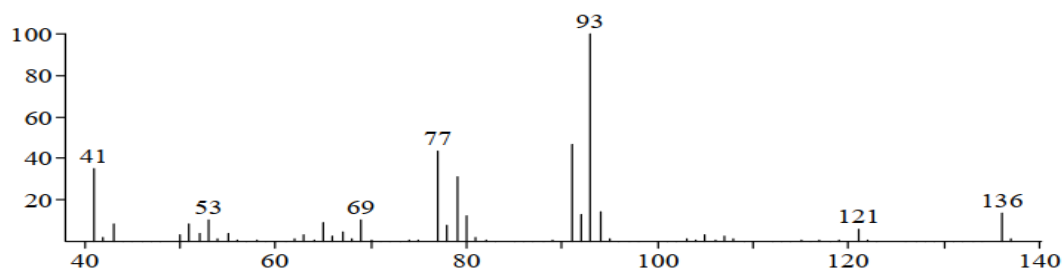
Fonte: Adaptado de Adams (2017).

Figura 27 - Espectro de massas do sabineno



Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 28 - Espectro de massas do sabineno literatura

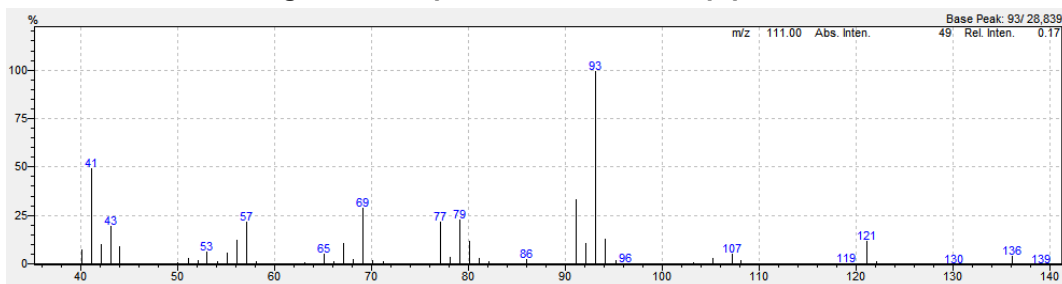


Fonte: Adaptado de Adams (2017).

Os componentes β -pineno (Figura 29) e limoneno (Figura 31) identificados em *C. bonariensis* apresentam o espectro de massas com o respectivo padrão de

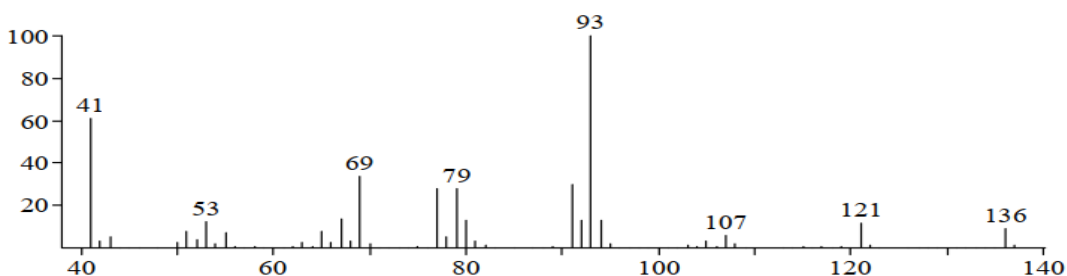
fragmentação conforme a Figura 30 e 32 respectivamente, sendo o limoneno o constituinte majoritário (51,82%).

Figura 29 - Espectro de massas do β -pineno



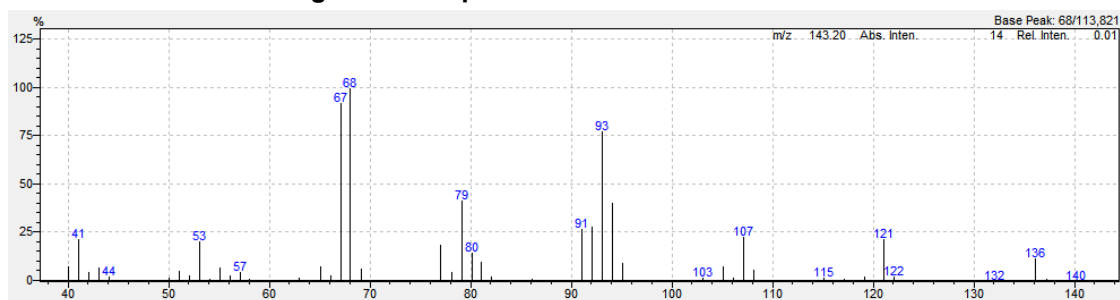
Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 30 - Espectro de massas do β -pineno literatura



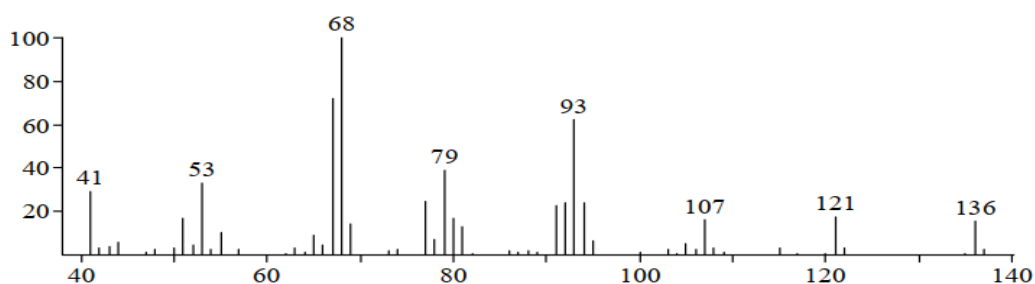
Fonte: Adaptado de Adams (2017).

Figura 31 - Espectro de massas do limoneno



Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 32 - Espectro de massas do limoneno literatura

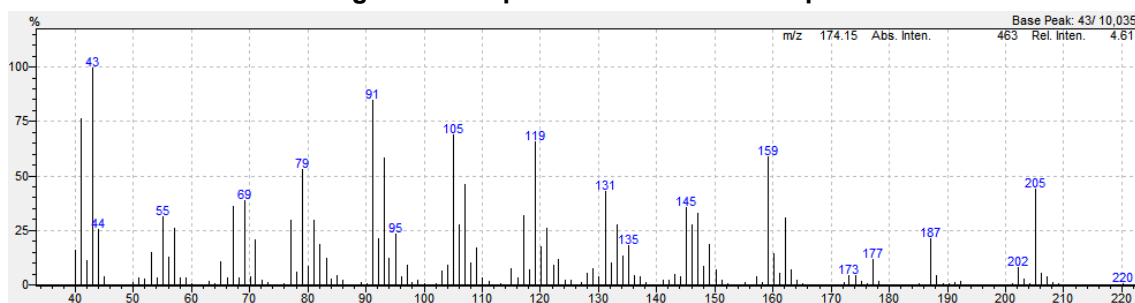


Fonte: Adaptado de Adams (2017).

O trabalho de Azevedo (1999) e Barbosa et al. (2003) também apresentam como composto majoritário o limoneno (25,97% e 29,6%), respectivamente. Para Tzakou et al. (2005) esse composto apresentou concentração 15,1% a 8,3%, não sendo o composto majoritário. Hoi et al. (2021) encontraram β -pineno (0,8%) e limoneno (0,2%) para espécie *C. bonariensis*, porém valores inferiores ao do presente trabalho. Fávila (2006) encontrou traços de limoneno e Silva et al. (1985) obteve o β -pineno (41,0%) como constituinte majoritário e limoneno (12,0%). A diferença de componentes identificados e suas respectivas concentrações representam a variabilidade dos resultados, conforme a espécie do gênero *Conyza*, e até mesmo dentro da mesma espécie.

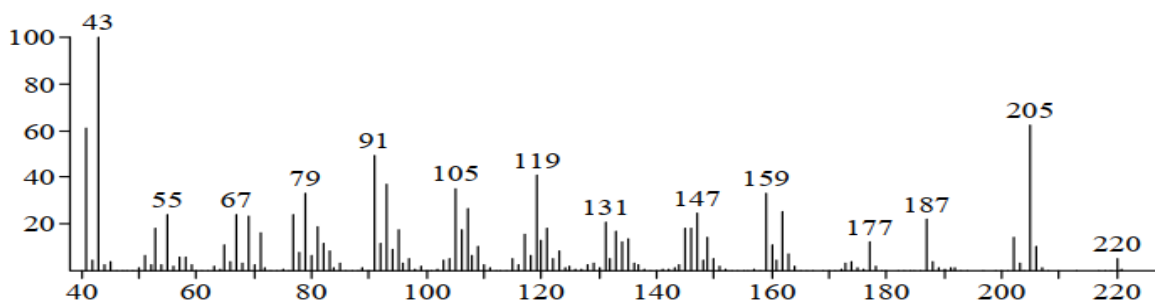
Foram obtidos também, dois sesquiterpenos oxigenados, o espatulenol (Figura 33) e o óxido de cariofileno (Figura 35). O perfil de fragmentação obtido das amostras foi comparado com a literatura (ADAMS, 2017) (Figura 34) (Figura 36), sendo possível confirmar a presença de ambos. Hoi et al. (2021) encontraram espatulenol (1,3%) e óxido de cariofileno (12,2%), valores esses inferiores aos obtidos no presente trabalho para a espécie *C. bonariensis*.

Figura 33 - Espectro de massas do espatulenol



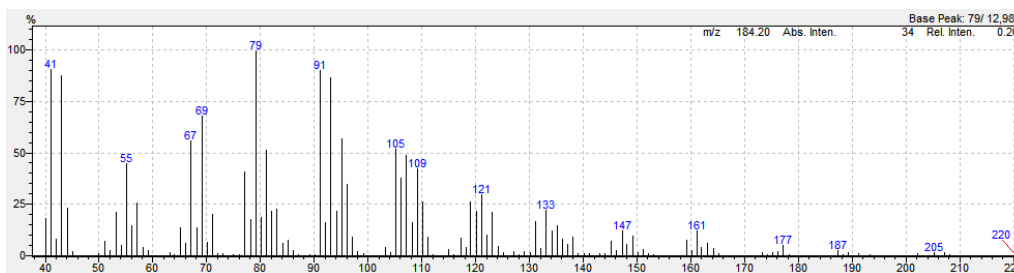
Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 34 - Espectro de massas do espatulenol literatura



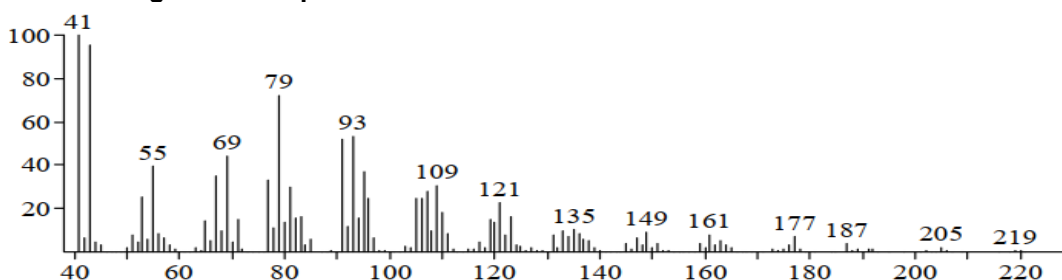
Fonte: Adaptado de Adams (2017).

Figura 35 - Espectro de massas do óxido de cariofileno



Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 36 - Espectro de massas do óxido de cariofileno literatura



Fonte: Adaptado de Adams (2017).

Estudos de longa data já haviam investigado o perfil dos óleos essenciais de diferentes partes da *C. bonariensis*. Fávila (2006) encontrou 25 compostos no óleo essencial de *C. bonariensis*, sendo os compostos majoritários o *cis*-lachnophyllum metil éster (44,31%), óxido de cariofileno (22,0%), (*E*)-espatulenol (5,14%) e β -farneseno (1,45 %) e apenas 0,74% de limoneno. Outros estudos realizados na década de 80 e 90, os pesquisadores encontraram como compostos majoritários dos óleos voláteis de *C. bonariensis* β -pineno (41,0%) e limoneno (12,0%) (SILVA et al., 1985); 11 monoterpenos, sendo o composto majoritário o limoneno (25,97%) (AZEVEDO, 1999).

Ao investigar a composição química de óleos essenciais em diferentes estágios de três espécies do gênero *Conyza* (*Conyza albida*, *Conyza bonariensis* e *Conyza Canadensis*) na Grécia, Tzakou et al. (2005) observaram a variabilidade dos compostos nas análises realizadas em três estágios das plantas: estágio vegetativo, estágio de floração e estágio floração-frutificação, sendo as coletas realizadas em fevereiro, junho e setembro. Em comum, as três espécies estudadas apresentaram o composto limoneno, sendo em maior quantidade (70,3%) a espécie *C. canadensis* com amostras coletadas no período de estágio floração-frutificação. O estágio que mais foi observada identificação de compostos na espécie *C. bonariensis* foi no estágio de floração, porém maior concentração de limoneno foi no estágio floração-

frutificação (15,1%), seguido do vegetativo (10,8%) e por último de floração (8,3%). A identificação de compostos como α -pineno, sabineno, β -pineno e limoneno desses pesquisadores corroboram com o presente trabalho, porém diferem no quesito do estágio de coleta, pois no período vegetativo apresentou apenas em comum o limoneno.

Hoi et al. (2020), avaliaram a composição química por cromatografia gasosa e espectrometria de massas de três espécies do gênero *Conyza*: *C. bonariensis*, *C. canadensis* e *C. sumatrensis*. Houve uma variação de compostos entre elas. Enquanto a espécie *C. bonariensis* apresentou como compostos majoritários 41,2% de *allo*-Aromadendrene, seguido de 13,3% de (*E*)-cariofileno e 12,2% de óxido de cariofileno, a *C. canadensis* e a *C. sumatrensis* eram ricos em limoneno, 41,5% e 25%, respectivamente. No óleo essencial da *C. bonariensis* em contrapartida, foi encontrado apenas 0,2% de limoneno.

Esses resultados refletem a variabilidade dos componentes dos óleos essenciais tanto nas diferentes espécies do gênero *Conyza*, como dentro da mesma espécie. Essa variabilidade pode ocorrer devido a vários fatores, como época de coleta, localização geográfica, entre outros (MALECK et al., 2021).

5.6 TOXICIDADE DO EXTRATO E ÓLEO ESSENCIAL DE *C. BONARIENSIS* FRENTE *P. XYLOSTELLA*

A criação, manutenção e aumento da população de *Plutella xylostella* teve início no dia 26 de agosto e foi até o dia 12 de outubro de 2022. No dia 11 de outubro iniciaram-se os testes de toxicidade dos extratos e óleos essenciais de *Cb* frente às larvas de terceiro instar de *P. xylostella* e finalizado no dia 19 de outubro. A contagem das larvas foi realizada nos dias 12, 13, 14, 15, 17 e 19 de outubro de 2022, totalizando 8 dias de experimento.

Os dados obtidos de mortalidade foram levados para análise estatística. Aplicado o teste de Análise de Variância (ANOVA), os resultados apresentaram variações significativas entre os tratamentos ($p = 0,007$ ou $p < 0,05$) com 95% de confiança. Posteriormente aplicou-se o teste de *Tukey* de comparações entre os tratamentos, em que foi encontrada diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o tratamento O1 (óleo essencial a 0,5%) e o B (branco) (Tabela 6).

No primeiro dia de teste, somente no tratamento E1 foi observada a morte de 2 indivíduos. No segundo, terceiro e quarto dia, no tratamento O1 observou-se mortalidade superior aos demais, cessando em seguida. O tratamento O1 foi o que apresentou maior mortalidade em relação aos demais com (25%), seguido de E1 (17,5%), E2 (10%) e O2 (7,5%).

Tabela 6 - Média de mortalidade de *P. xylostella*

| Tratamento | Média Mortalidade após 192 h (unidade) |
|------------|--|
| Branco | 0,75± 0,50 ^a |
| O2 | 1,50± 0,58 ^{ab} |
| E2 | 1,75± 0,50 ^{ab} |
| E1 | 2,50 ± 0,58 ^{ab} |
| O1 | 3,25 ± 1,50 ^b |

Dados: E1 = Extrato *Cb* (0,5%); E2 = Extrato *Cb* (2,0%); O1 = óleo essencial (0,5%); O2 = (2,0%); B = Branco/testemunha. Média de Mortalidade: Referente a 8 dias de experimento.

Fonte: Autoria própria (2023).

Verificou-se que no quarto dia as larvas sobreviventes iniciaram a fase pupal e no oitavo dia encerrou-se o experimento devido às demais sobreviventes também iniciarem essa fase.

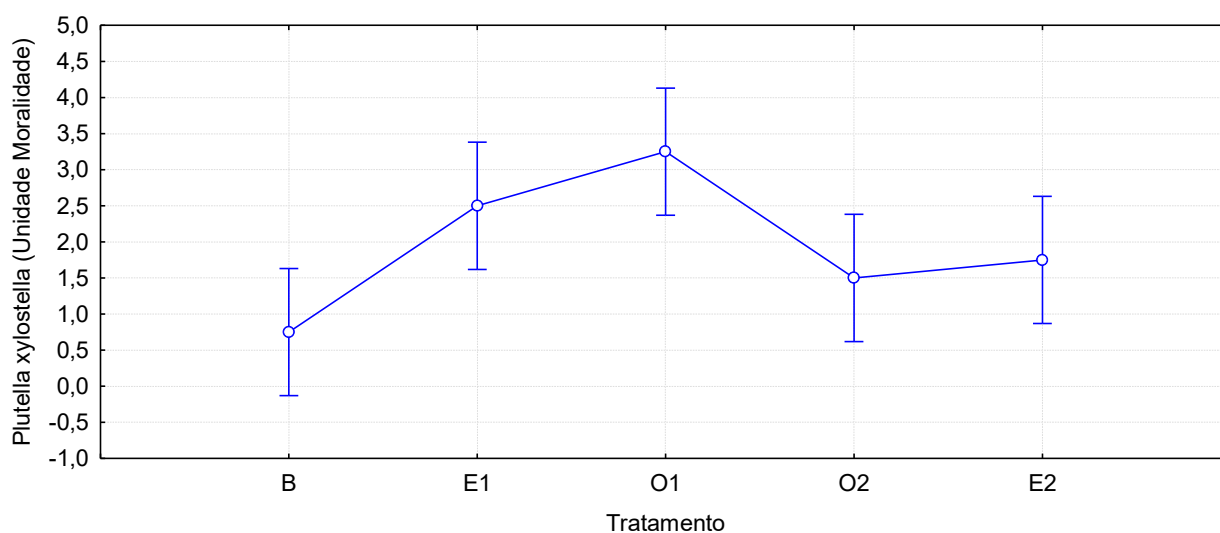
A fase larval da *Plutella xylostella* possui quatro instares, com duração que podem variar entre 4 a 8 dias, dependendo da qualidade do alimento oferecida e da temperatura utilizada na criação (COUTO, 2018; NETO, 2014). Foi observado o início da fase pupal no quarto dia em todos os tratamentos, e no sexto dia o tratamento O1 correspondia a 70% dos indivíduos nessa fase, seguido de E2 = 72,72%, E1 = 90%, O2 = 91,17% e B = 91,89%, evidenciando assim um prolongamento no processo para os tratamentos em relação a testemunha (B), em especial, o tratamento O1 (óleo essencial a 0,5%) o qual apresentou maior mortalidade e diferença estatística significativa com a testemunha (Tabela 6) ao término do experimento.

Estudos demonstraram que um ciclo mais longo no período larval e pupal apresentaram menor viabilidade dos insetos, pois pode ocorrer desequilíbrio nutricional com menor ingestão de alimentos devido a presença de compostos químicos ativos, com substâncias deterrentes alimentares. No ambiente natural, outro fator de mortalidade devido a esse prolongamento de fase está relacionado com o tempo de exposição das larvas aos inimigos naturais o que pode diminuir o

número de gerações em relação ao tempo e consequentemente uma diminuição de população do inseto (JUNIOR et al., 2011).

No gráfico de efeitos (Figura 37), é possível observar que apenas o O1 e B estão fora dos parâmetros de efeitos entre si.

Figura 37 - Gráfico de efeitos entre os tratamentos

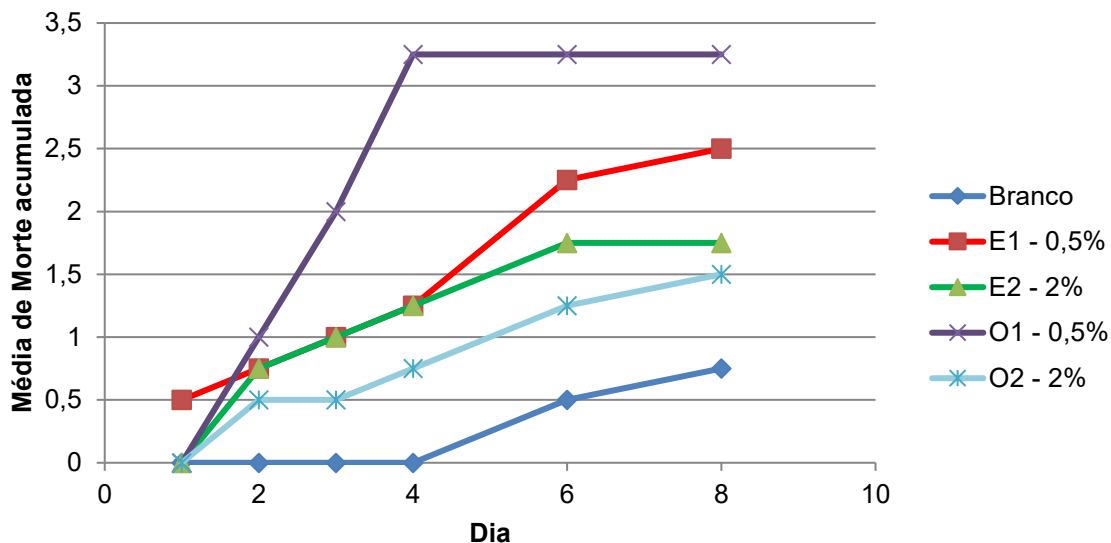


**Dados: E1 = extrato a 0,5%; E2 = Extrato a 2%; O1 = Óleo essencial a 0,5%;
O2 = Óleo essencial a 2%; B = Branco/Testemunha.**

Fonte: Autoria própria (2023).

Em seguida, fez-se o gráfico de média de mortes acumuladas para os extratos e óleos essenciais (Figura 38), comparando-os com a testemunha (B) para melhor visualização dos resultados do experimento.

Figura 38 - Média de morte acumulada dos tratamentos



Dados: O1 = E1 = extrato a 0,5 %; E2 = Extrato a 2 %; Óleo essencial a 0,5 %; O2 = Óleo essencial a 2 %; Branco = Testemunha.

Fonte: Autoria própria (2023).

Diante dos resultados, foi possível observar que o óleo essencial a 0,5% (O1) teve maior mortalidade quando comparado aos demais tratamentos e o com menor efeito frente às larvas de *P. xylostella* foi o tratamento com óleo essencial a 2% (O2).

Os compostos bioativos das plantas possuem formas diversas de agir sobre os insetos interferindo diretamente no seu metabolismo, agindo como inibidores de alimentação, crescimento, desenvolvimento, ovo deposição, reprodução, etc (COUTO, 2018).

Estudos demonstram que um dos fatores de mortalidade de insetos é devido a deterrência alimentar, que consiste na presença de substância(s) não atrativa(s) na alimentação, o que faz com que o inseto reduza consideravelmente o consumo do alimento tratado, levando-o a morte ou problema na reprodução. As substâncias mais comuns responsáveis por esses efeitos são as do grupo de compostos fenólicos produzidos pelas plantas como mecanismo de defesa. Um dos compostos responsáveis pela deterrência alimentar é ácido clorogênico, um composto capaz de interferir no ciclo de insetos, causando modificações no ciclo larval, deformações em adultos e em geral, afetando negativamente a biologia do inseto (TAVARES, 2016). Esse ácido foi encontrado no presente trabalho por cromatografia líquida de alta eficiência numa concentração de $24,93 \pm 1,41 \text{ mg g}^{-1}$ e pode ser um possível agente

que contribuiu com a mortalidade da *P. xylostella* quando comparado com o grupo de testemunha.

Couto et al. (2016) avaliaram extratos aquosos e metanólicos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Pimenta Rosa) Anacardiaceae, *Annona coriacea* Mart. (Araticum) Annonaceae, *Duguetia furfuracea* (Pindaúva do campo) Annonaceae e *Trichilia silvatica* (Catiguá-branco) Meliaceae frente larvas de terceiro instar de *P. xylostella*. Todos os extratos apresentaram deterrência alimentar, destacando-se espécies do gênero *T. silvatica* que obtiveram maiores efeitos com extratos etanólicos e nas maiores concentrações testadas (2%). Essas espécies de plantas da família *Meliaceae* apresentam em sua composição, limonoides, que são metabólitos secundários causadores de deterrência alimentar devido a sua toxicidade pós-ingestão.

Silva et al. (2020) avaliaram a interferência no desenvolvimento e reprodução da *P. xylostella* frente extratos etanólicos das folhas de *Alibertia edulis*, *Alibertia intermedia* e *Alibertia sessilis*, ambas da família Rubiaceae. As concentrações testadas foram de 1% e 3% para cada espécie. Eles observaram que a duração da fase larval e pupal foi menor que o controle, e o extrato de *A. edulis* foi a que apresentou maior efeito com 33,4% de mortalidade na concentração de 1% e apenas 10% de mortalidade na concentração de 3% do extrato. Esse estudo corrobora com os resultados obtidos, onde a maior concentração apresentou menor mortalidade. Já em relação ao ciclo larval, os resultados divergem, onde, foi observado fase larval com tempo superior para o tratamento O1 e maior porcentagem de mortalidade no experimento. Para tanto, refuta-se o conceito de senso comum ao afirmar que maiores concentrações necessariamente sejam mais eficazes, não sendo uma regra reprodutível, podendo variar conforme a condução do experimento, tipo de amostra estudada e mecanismos de ação da substância.

Peres et al. (2017) testaram extratos aquosos de *Alibertia edulis*, *Alibertia intermedia* e *Alibertia sessilis*, da família Rubiaceae frente *Plutella xylostella* e os resultados obtidos revelaram que o alongamento da fase larval (dias) corroborou com aumento da mortalidade, sendo a *A. sessilis* e *A. intermedia* as que apresentaram maior tempo do ciclo e sobrevivência larval de 49,8% e 56,41% respectivamente. *A. intermedia* que teve menor tempo larval, foi que a que não apresentou diferença significativa de mortalidade relacionada a testemunha. Não apenas a fase larval apresentou variação quanto a mortalidade, mas ocorreu

também diminuição no peso pupal, fecundidade, alterações morfológicas e longevidade dos insetos adultos. Os resultados obtidos por Peres et al. (2017) se assemelham ao presente estudo, quando observada o aumento do ciclo no período larval e aumento de mortalidade em dado tratamento.

Essas informações são de grande relevância, visto que há diversa variabilidade nos resultados conforme a espécie, o tipo de solvente utilizado e os mecanismos de ação em cada fase da *Plutella xylostella*, podendo ocorrer efeitos a longo prazo capazes de alterar a biologia do inseto, por isso a grande relevância de mais pesquisas voltadas aos efeitos em todos os ciclos do inseto para uma resposta com maior eficácia.

Alguns compostos, como ácido cafeico, tem ação na peroxidação lipídica e oxidação de proteínas que podem também serem responsáveis pelos efeitos deterrentes alimentares, no ciclo larval do inseto e induzir deformações (Peres et al., 2017). Esse ácido foi detectado por CLAE-DAD nas amostras de *C. bonariensis* no presente trabalho, porém abaixo do limite de quantificação, e apesar de não ter sido quantificado ele pode atuar sinergicamente com outros compostos. Vale destacar, que compostos majoritários não necessariamente são os responsáveis pela mortalidade ou influencia no desenvolvimento de um determinado organismo, sendo possível, compostos em baixa concentração terem melhor atividade, isso dependerá do mecanismo de ação.

Além dos testes com diferentes extratos de plantas com diferentes formas de extração e atividade toxicológica frente a *P. xylostella*, os óleos essenciais são muito promissores. As estruturas secretoras das plantas que atuam na defesa contra herbivoria liberam compostos tóxicos capaz de interferir metabolicamente nos insetos ou em processos fisiológicos (FINKLER; PIRES, 2019, p. 95).

Os principais componentes dos óleos essenciais são os terpenos, sendo os monoterpenos e sesquiterpenos os principais constituintes de óleos essenciais (CECHINEL FILHO; ZANCHETT, 2020, p. 61) podendo apresentar uma mistura de diversos terpenos, entre eles os monoterpenos bicíclicos como β -pineno e o α -pineno, e monociclos como limoneno entre outros, que uma vez liberado após ataque podem ser diretamente tóxicos ao inseto (TAIZ et al., 2017, p. 701). Esses compostos foram identificados nos óleos essenciais do presente trabalho por CG-EM, sendo o tratamento com óleo essencial de menor concentração (0,5%) apresentar maior mortalidade das larvas de *P. xylostella* em relação aos extratos e à

maior concentração de óleo essencial testada (2,0%). Como descrito anteriormente para os extratos, alguns pesquisadores também encontraram maior atividade inseticida ou de repelência nas menores concentrações testadas.

Hoi et al. (2020) avaliou a atividade larvicida de óleo essencial de três espécies do gênero *Conyza* (*C. bonariensis*, *C. canadensis* e *C. sumatrensis*) contra *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* e *Culex*. A espécie *C. canadensis* foi a que apresentou melhor atividade larvicida contra *A. aegypti* e *A. albopictus*. A pesquisa investigou os principais compostos presentes nessas espécies do gênero *Conyza*, e uma Análise de Componentes Principais (ACP) revelou que a atividade larvicida coincidia com a quantidade de limoneno nas espécies, sendo a *C. canadensis* (41,5%) a com maior concentração, seguida de *C. sumatrensis* (25,5%) e por último com baixa atividade larvicida a *C. bonariensis* (0,2%).

Apesar de algumas literaturas descreverem o limoneno como função principal a polinização (MONTEIRO, S. C.; BRANDELLI, 2017, p. 48), esse componente também age com efeito tóxico (HOI et al. 2020), (TAIZ et al., 2017, p. 701), (CECHINEL FILHO; ZANCHETT, 2020, p. 64). O limoneno foi o componente majoritário encontrado, sendo o possível composto que apresentou maior mortalidade nas larvas de terceiro instar de *P. xylostella* no presente trabalho. Além do limoneno, o α -pineno, β -pineno e o limoneno são monoterpenos com baixo peso molecular, bastante voláteis e altamente hidrofóbicos, tais características podem ser responsáveis pela interação com a membrana plasmática dos organismos, causando essa toxicidade (MONTEIRO, S. C.; BRANDELLI, 2017, p. 47), podendo serem também os responsáveis para toxicidade das larvas e alteração no ciclo pupal desses insetos.

Os óleos essenciais de plantas podem apresentar alta eficiência na mortalidade de diferentes estágios de *P. xylostella*. Um estudo realizado por Silva et al. (2020) que testaram óleos essenciais ricos em (*E*)-nerodiol de partes aéreas de *Melaleuca leucadendra* da família Myrtaceae quanto a atividade larvicida e ovicida de *P. xylostella* observaram que esses óleos essenciais eram 16 vezes mais tóxicos para o inseto que o controle positivo, o inseticida comercial AZAMAX. Resultados de investigação de óleos essenciais como descritos por Silva et al. (2020) revelam o potencial e a necessidade de mais estudos para descoberta de novos compostos de origem natural.

Atualmente o inseticida amplamente utilizado no controle a *P. xylostella* é o princípio ativo azadiractina A (CECHINEL FILHO; ZANCHETT, 2020, p. 64), porém, o uso indiscriminado desses inseticidas acarreta populações resistentes como descrito com os bioinseticidas derivados de Bt. Diante disso, pesquisas na área de descoberta de novos produtos e princípios ativos eficientes e ecologicamente seguras são de grande valia. Destacam-se os terpenos encontrados no presente trabalho o α -pineno, β -pineno e limoneno, assim como o 3-careno, mirceno, α -terpineno, canfeno (CECHINEL FILHO; ZANCHETT, 2020, p. 64), entre muitos outros sendo considerados substâncias naturais inseticidas potentes.

Pelo fato de os óleos essenciais, em especial os monoterpenos apresentarem baixo peso molecular, volatilidade e instáveis na presença de luz e calor, sugere-se uma modificação na condução para próximos testes, visto que a exposição das folhas de couve com os tratamentos por 2 horas esses compostos podem sofrer alterações químicas e diminuir seu efeito.

Não foram encontrados trabalhos do efeito tóxico ou repelente de extratos ou óleos essenciais de *C. bonariensis* frente a *P. xylostella* como comparativo.

6 CONCLUSÕES

As plantas daninhas são consideradas protagonistas nos impactos negativos em diferentes culturas do setor agrônomo, porém, muitas podem apresentar conteúdo rico em compostos bioativos produzidos como mecanismos de resistência aos diferentes tratamentos com defensivos agrícolas. No caso da espécie *C. bonariensis*, estudos já evidenciaram o potencial de compostos presente nos extratos de várias partes dessa planta, assim como nos óleos essenciais.

No presente trabalho, foram encontrados conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante por diferentes métodos, e os resultados são variados quando confrontados com outros estudos, visto que, é comum a variabilidade qualitativa e quantitativa devido às condições de coleta, extração e condução das análises. No teste microbiológico, os extratos apresentaram atividade inibitória mínima nas concentrações 10 mg mL⁻¹ para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, 5 mg mL⁻¹ para *L. monocytogenes* e *Salmonella* e atividade bactericida em 20 mg mL⁻¹ para *E. coli*.

As análises dos extratos por cromatografia líquida foi possível identificar a presença de quatro compostos fenólicos o Ácido Gálico, Ácido Clorogênico, Ácido cafeico e Ácido Isoclorogênico A. Os óleos essenciais por Cromatografia gasosa foram encontrados seis compostos, sendo quatro deles hidrocarbonetos monoterpênicos: α -pineno, sabineno β -pineno e limoneno, e dois sesquiterpenos oxigenados: espatulenol e óxido de cariofileno.

Na condução dos testes dos extratos e óleos essenciais de *C. bonariensis* frente a larvas de terceiro instar de *P. xylostella* foi possível observar que o tratamento com óleo essencial a 0,5 % foi o que apresentou diferença significativa de mortalidade quando comparado a testemunha. Não foram encontrados na literatura referências de testes da espécie *C. bonariensis* em qualquer estágio da *P. xylostella* para comparações.

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que os compostos do metabolismo secundário de *Conyza bonariensis* apresentaram efeitos tóxicos nas larvas de terceiro instar de *Plutella xylostella*, causando mortalidade e aumento do ciclo pupal, condição essa relatada como efeito negativo no organismo.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R.P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. ed. 4.1. Allured Pub Corp, 2017.
- ADEGAS, F. S. et al. Impacto econômico da resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil. Circular Técnica – **Embrapa**, ISSN 2176-2864, 2017.
- AFIUNIZADEH, M. et al. Insecticidal and oviposition deterrent effects of five medicinal plant extracts on the diamondback moth. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 129, p. 805-817, 2022.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Medicamentos Fitoterápicos, 2020.
- ALBRECHT, A. J. P. et al. Control of *Conyza* spp. with sequential application of glufosinate in soybean pre-sowing. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 50, n. 09, e20190868, 2020.
- ALMEIDA, A. S.; SANTOS, A. F. Hytochemical prospecting of the methanolic extract of leaves of the Species *Cymbopogon Citratus*. **Diversitas Journal**, Santana do Ipanema/AL., v. 3, n. 2, p. 519-525, 2018.
- AMARAL, G. S. et al. Stressful Conditions Affect Seed Quality in Glyphosate Resistant *Conyza bonariensis* (L.). **Agronomy**, Lages, v. 10, p. 1706, 2020.
- AMPARO, T. R. et al. Métodos para avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de plantas medicinais: a necessidade da padronização. **Infarma Ciênc. Farm.** v. 30, p. 50-59, 2017.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Phenolic compounds in foods – A brief review. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- ARAUJO, E. C. G.; SILVA, T. C.; LIMA, T. V. Efeitos alelopáticos de *sesbania virgata* (cav.) Pers na germinação de sementes de alface. **Revista Engenharia na Agricultura**, v. 26, n. 02, p. 101-109, 2018.
- ARAÚJO, M. J. C. **Óleos essenciais para o controle de *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Plutellidae) e *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)**. 2015. 114 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2015.
- AZEVEDO, A. A. **Caracterização Anatômica e Análise do Óleo Essencial de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (Asteraceae)** 1999. 67f. Dissertação (Mestrado em Botânica), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.
- BARBOSA, L. C. A. Essential oil composition from some plant parts of *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist. **Flavour and fragrance journal**, v. 20, p. 39-41, 2005.

- BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.
- BEZERRA, M. S. et al. Avaliação medicinal e nutricional de três espécies de Plantas Alimentícias Não convencionais (PANCs): Uma revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 5, e10410513401, 2021.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie - LWT**, v. 28, p. 25-30, 1995.
- CECHINEL FILHO, V.; ZANCHETT, C. C. C. Fitoterapia avançada : uma abordagem química, biológica e nutricional. Porto Alegre: Artmed, p. 54, 55, 64, 61, 2020.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015. CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 10th ed. Wayne, PA.
- COELHO, L. M. **Estudo proteômico de calos, folhas e galhos de *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae)**. 2018. 255 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas – UFAM – Manaus, Amazonas, 2018.
- COUTO, I. F. S. **Bioatividade de extratos de plantas nativas do cerrado sobre *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae)**. 2018. 108 f. Tese (Doutorado em entomologia e conservação da biodiversidade) - Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD, Dourados - MS, 2018.
- COUTO, I. F. S. et al. Feeding preference of *Plutella xylostella* for leaves treated with plant extracts. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, n. 3, p. 1781-1789, 2016.
- DA SILVA, R. C. O. **Validação de metodologia analítica por CLAE-DAD para determinação de compostos fenólicos e atividade biológica em coprodutos agroindustriais**. 2016. 112 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – Biotecnologia) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2016.
- DAUR, I. Chemical composition of selected Saudi medicinal plants. **Arabian Journal of Chemistry**. Saudi Arabia, v. 8, p. 329-332, 2015.
- EL-AKHAL, J. et al. Anxiolytic and Antidepressant-Like Effects of *Conyza canadensis* Aqueous Extract in the Scopolamine Rat Model. **Plants**, v. 10, p. 645, 2021.
- ESPINOZA, R. V. et al. Antioxidant activity and GC-MS profile of *Conyza bonariensis* L. leaves extract and fractions. **Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín**, v. 73, n. 3, p. 9305-9313, 2020.

FAVILA, M. A. C. **Estudo químico e biológico de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (Asteraceae)**. 2006. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, Santa Maria – RS, 2006.

FERNANDES, M. R. V. **Obtenção, padronização e avaliação biológica de extratos secos a partir da espécie *Psidium guajava* L. pelo processo *spray drying***. 2013. 237 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

FERNANDES, R. M. N.; SCAPIN, E. Plantas típicas do cerrado brasileiro usadas como inibidores da acetilcolinesterase: uma revisão sistemática. **Revista Interdisciplinar Da Universidade Federal Do Tocantins**, v. 7, n. 3, p. 20-31, 2020.

FERRERA, T. S. et al. Substâncias fenólicas, flavonoides e capacidade antioxidante em erva-de-são-paulo sob diferentes coberturas do solo e sombreamentos. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.18, n.2, supl. 1, p.588-596, 2016.

GAZZIERO, D.L.P. et al. Interferência da buva em áreas cultivadas com soja. XXVII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas - Ribeirão Preto – SP, 2010.

GIRMA, Y.; JIRU, T. M. Evaluation of Antimicrobial Activity of *Conyza bonariensis* Leaf Extracts against Clinically Isolated Fungi Causing Superficial Infection. **Journal of Chemistry**, v. 2021, 2021.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. **Insetos: fundamentos da entomologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Roca, p. 333, 332, 2023.

HOI, T. M. et al. Essential Oil Compositions of Three Invasive *Conyza* Species Collected in Vietnam and Their Larvicidal Activities against *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus*. **Molecules**, v. 25, p. 4576, 2020.

JESUS, D. S. **Estresse de metais na produtividade de compostos oriundos do metabolismo secundário de *Martianthus leucocephalus* (Mart. Ex Benth.) J.F.B. Pastore**. 2016. 111 f. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana – BA, 2016.

JUNIOR, A. L. B. et al. Influência de genótipos de couve (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.) na biologia de *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae). **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 35, n. 4, p. 710 - 717, 2011.

JUNIOR, J. A. A. N. **Avaliação do potencial antioxidante e atividade citotóxica de extratos metanólicos de plantas medicinais da Caatinga**. 2016. 59 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

- KASPARY, T. E. **Caracterização biológica e fisiológica de buva (*conyza bonariensis* L.) resistente ao herbicida glyphosate**. 2014. 99 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, Campus de Frederico Westphalen - RS, 2014.
- MAGALHÃES, G. O. **Aspectos biológicos de *plutella xylostella* (linnaeus, 1758) (lepidoptera: plutellidae) e estratégias para o manejo da praga**. 2016. 82 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” - UNESP, Jaboticabal, 2016.
- MALECK, M. et al. Óleos essenciais – um breve relato. **Rev. Teccen**, v. 14, n. 2, p. 43-49, 2021.
- MEDEIROS, M. A. C. et al. Avaliação da atividade fotoprotetora do extrato aquoso de *Rhaphiodon echinus* (Nees & Mart.) Schauer. **Scientia Plena**, v. 17, n. 4, 2021.
- MIRANDA, J. A. L. et al. Atividade antibacteriana de extratos de folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.17, n.4, supl. III, p.1142-1149, 2015.
- MONTEIRO, S. C.; BRANDELLI, C. L. C. Farmacobotânica: aspectos teóricos e aplicação. Porto Alegre: Artmed, p. 46, 60, 2017.
- MORETTI M. L. et al. Transcription of putative tonoplast transporters in response to glyphosate and paraquat stress in *Conyza bonariensis* and *Conyza canadensis* and selection of reference genes for qRT-PCR. **PLoS One**, v. 10;12, n. 7:e0180794, 2017.
- NASCIMENTO, M. et al. Avaliação da Composição Nutricional, Teor Polifenólico e Atividade Antioxidante de Diferentes Espécies da Família Urticaceae. **Rev. Internacional de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 02, p. 243 - 260, 2021.
- NETO, J. E. L. **Detecção e monitoramento da resistência de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) a inseticidas de risco reduzido**. 2014. 50 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife - PE, 2014.
- OLIVEIRA, L. F.; MAIOR, J. F. A. S.; DRESCH, R. R. **Farmacnosia Pura**. Revisão técnica: L Cristiane Bernardes de Oliveira, Lucimar Filot da Silva Brum. Porto Alegre: SAGAH, p. 16, 83, 84, 93, 94, 207, 2018.
- PAULA, C. C. et al. Antimicrobial Screening of Medicinal Plants Popularly used in Mato Grosso for Treating Infections: Advances on the Evaluation of *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist *in vitro* and *in vivo* Antibacterial Activities. **Pharmacognosy Journal**, v. 10, n. 6, p.152-166 , 2018.
- PERES, L. L. S. et al. Chemical Compounds and Bioactivity of Aqueous Extracts of *Alibertia* spp. in the Control of *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae). **Insects**, v. 8, p. 125, 2017.

POTBHARE, A. K. et al. Phytosynthesis of nearly monodisperse CuO nanospheres using *Phyllanthus reticulatus/Conyza bonariensis* and its antioxidant/antibacterial assays. **Materials Science & Engineering C**. v. 99, p. 783–793, 2019.

PRASNIEWSKI, A. **Isolamento de compostos bioativos das folhas de jambo (*Syzygium malaccense*)**. 2019. 119 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, Campus Pato Branco - PR, 2019.

RADHAKRISHNAN, B.; PRABHAKARAN, P. Biocidal activity of certain indigenous plant extracts against red spider mite, *Oligonychus coffeae* (Nietner) infesting tea. **Journal of Biopest**, v. 7, n. 01, p. 29-34, 2014.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

REIS, S. F.; FORTUNA, J. L. Atividade antimicrobiana de extratos de *Plectranthus grandis* (L. H. Cramer) R. Willemse (Boldo) e Aloe vera (Linnaeus) Burm (Babosa) sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Revista Biociências**, Taubaté, v. 22, n. 1, p. 39-47, 2016.

SALEEM, M. et al. Cytotoxic effect of methanol extract of *Conyza bonariensis* on DMBA-induced skin carcinogenesis: An *in vivo* study. **Bangladesh J Pharmacol**, v. 10, p. 467-474, 2015.

SAMPAIO, C. R. P. **Caracterização físico-química, capacidade antioxidante e compostos bioativos de frutos de murici vermelho (*Byrsonima ligustrifolia* A. Juss.) em cinco estádios de maturação**. 2015. 104 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, 2015.

SANTOS, K. B.; TONIN, L. T. D. Estudo da influência da temperatura de secagem e solvente extrator na capacidade antioxidante de folhas *Plantago major*. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 3, p. 200-211, 2019.

SEVALHO, E. S.; ROCHA, W. C. Potencial antioxidante dos diferentes extratos de *Morinda citrifolia* por TLC-DPPH•. **Conexão Ciência**, v. 12, n. 1, p. 72 -77, 2017.

SILVA, R. M. et al. *Alibertia* spp. (Rubiaceae) Extracts Interfere with the Development and Reproduction of *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae). **Gesunde Pflanzen**, v. 72, p. 351 - 360, 2020.

SILVA, M. M. C. et al. Insecticidal and Acaricidal Activity of Essential Oils Rich in (*E*)-Nerolidol from *Melaleuca leucadendra* Occurring in the State of Pernambuco (Brazil) and Effects on Two Important Agricultural Pests. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 31, n. 4, 813-820, 2020.

SILVA, G. A. et al. Constituintes do Óleo Essencial de *Erigeron bonariensis* L. (Compositae). **Tribuna Farmacêutica**, v. 53, p. 37-39, 1985.

SILVA, I. A. et al. Mecanismos de resistência das plantas alimentícias não convencionais (pAnc) e benefícios para a saúde humana. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v.15, n.1, p. 77-91, 2018.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, p. 167, 2017.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152–178, 1999.

SCHECHTEL, S. L. et al. Flaxleaf Fleabane Leaves (*Conyza bonariensis*), A New Functional Nonconventional Edible Plant? **Journal of Food Science**, v. 84, Iss. 12, 2019.

SCHNEIDER, T. **Resistência de *Conyza* spp. ao herbicida glifosato: distribuição geográfica, aspectos anatômicos, genéticos e moleculares**. 2018. 118 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Passo Fundo, 2018.

SCHAFRANSKI, K. et al. Avaliação de compostos bioativos e atividade antioxidante de extratos de folhas de amoreira preta (*Morus nigra* L.) utilizando planejamento experimental. **Quim. Nova**, v. XY, n. 00, p. 1-9, 200, 2019.

TAIZ, L. **Plant physiology and development**. 6 ed. Porto Alegre : Artmed, p. 699, 700, 2017.

TAVARES, S. S. **Ecologia Química da Cana-de-açúcar: Caracterização das respostas de defesa em diferentes cultivares de cana-de-açúcar**. 2016. 156 f. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) - Universidade de Alagoas, Maceió, 2016.

THABIT, R. A. S. et al. Antioxidant and antibacterial activities of extracts from *Conyza bonariensis* growing in Yemen. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 28, n. 1, Jan. 2015, pp. 129, Gale Academic OneFile.

TREZZI, M. M. Competitive ability of soybean cultivars with horseweed (*Conyza bonariensis*). **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 31, n. 3, p. 543-550, 2013.

TROCZKA, B. J. et al. Rapid selection for resistance to diamide insecticides in *Plutella xylostella* via specific amino acid polymorphisms in the ryanodine receptor. **Neurotoxicology**, 60, 224–233, 2017.

TZAKOU, O. et al. Volatile constituents of essential oils isolated at different growth stages from three *Conyza* species growing in Greece. **Flavour and fragrance journal**, v. 20, p. 425-428, 2005.

VARGAS, L. et al. Resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil: Histórico, distribuição, impacto econômico, manejo e prevenção. A era glyphosate: Agricultura, meio ambiente e homem. Londrina: Midiograf II, cap. 20, p. 235, 2016.

VERRUCK, S.; PRUDENCIO, E. S.; SILVEIRA, S. M. Compostos bioativos com capacidade antioxidante e antimicrobiana em frutas. **Revista CSBEA** – v.4, n.1, p.112, 2018.

XXVII CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 2010, Ribeirão Preto – SP, 2010.

YANG, L. et al. Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. **Molecules**, 23, 762, 2018.

ZANZINI, A. P. et al. Compostos bioativos presentes em couve-manteiga (*Brassica oleracea* L.) em três estádios de desenvolvimento e comparação das suas capacidades antioxidantes. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, e391974242, 2020.

ZIELINSKI, A. A. F. **Avaliação dos compostos fenólicos e atividade antioxidante in vitro de chás: classificação, modelagem e otimização por técnicas quimiométricas**. 2015. 144 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, 2015.