



UFAL

**INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**

**PRODUTOS NATURAIS EM ESTRATÉGIAS DE CONTROLE DE PRAGAS:
FEROMÔNIOS E PRODUTOS VEGETAIS**

BRUNA DA SILVA GRANJA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
Campus A. C. Simões
Tabuleiro dos Martins
57072-970 - Maceió - AL

BRUNA DA SILVA GRANJA

**PRODUTOS NATURAIS EM ESTRATÉGIAS DE CONTROLE DE PRAGAS:
FEROMÔNIOS E PRODUTOS VEGETAIS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química e Biotecnologia, da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Química.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana
Co-orientador: Prof. Dr. Henrique Fonseca Goulart

Maceió-AL
2020

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

G759p Granja, Bruna da Silva.

Produtos naturais em estratégias de controle de pragas: feromônios e produtos vegetais / Bruna da Silva Granja. – 2020.

172 f. il. : figs. ; tabs. color.

Orientador: Antônio Euzébio Goulart Santana.

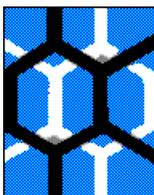
Coorientador: Henrique Fonseca Goulart.

Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2020.

Inclui bibliografias.

1. Feromônios. 2. Pragas – Controle. 3. *Erinnyis ello*. 4. Compostos voláteis. 5. *Helicoverpa armigera*. 6. Proteínas ligantes a odores. I. Título.

CDU: 632.936.2



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA**



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese da Doutoranda **BRUNA DA SILVA GRANJA** intitulada: “**PRODUTOS NATURAIS EM ESTRATÉGIAS DE CONTROLE DE PRAGAS: FEROMÔNIOS E PRODUTOS VEGETAIS**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 30 de julho de 2020, às 14h, por meio de videoconferência, LINK: meet.google.com/qwj-dotd-hyq.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana
Orientador (PPGQB/IQB/UFAL)

Prof. Dr. Henrique Fonseca Goulart
Orientador (CECA/UFAL)

Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior
(PPGQB/ICF/UFAL)

Prof. Dr. Francis Soares Gomes
(PPGQB/IQB/UFAL)

Profa Dra. Fabiane Caxico de Abreu Galdino
(PPGQB/IQB/UFAL)

Prof. Dr. João Gomes da Costa
(EMBRAPA/AL)

Profa Dra. Fabrícia da Rocha Ferreira
(IQB/UFAL)

Dedico este trabalho à minha mãe, Alanilda da Silva, pois ela é a razão de tudo que tenho conquistado e nunca mediu esforços para que eu pudesse chegar até aqui. À ela, todo meu amor, respeito, carinho e gratidão.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me guiar e fortalecer minha fé, diariamente. Por me conceder a graça de ter uma família abençoada, que me ama, incondicionalmente.

Agradeço a minha mãe Alanilda da Silva e a minha irmã Aretha Granja, por toda compreensão, paciência e confiança nas minhas decisões, me apoiando e incentivando, principalmente nos momentos difíceis. Aos meus sobrinhos, Maria Ísis Xavier e João Guilherme Xavier, por me revelarem a mais pura forma de amor.

Agradeço ao meu padrinho Antônio de Castro (*in memoriam*), por todo amor que teve por mim. Por ter me mostrado como é possível ser feliz com muita simplicidade, amor e caráter. Por ser um exemplo de pai e amigo. Onde quer que esteja, sei que está feliz por mais uma conquista minha.

Agradeço a todos os meus amigos pelas risadas e por todas as vezes que compreenderam a minha ausência, e me incentivaram a continuar.

Aos meus colegas de sala de aula e aos amigos do LPqRN, por cada experiência compartilhada, por cada palavra de conforto, pelos momentos de descontração, risos e lágrimas, companheirismo e sinceros votos de felicidade.

Agradeço em especial a Dra. Isis Souza, pela enorme contribuição ao meu trabalho e pelo suporte psicológico, mesmo quando eu não achava que precisava. Gratidão por sua existência e amizade incomparável.

Agradeço a João Vasques, por todo carinho, apoio e paciência.

Agradeço a Abel Queiroz, Ariane Soares, Adilson Sabino, Bruno Andrade e Jéssica Raimundo, pelo conhecimento compartilhado e amizade dentro e fora do laboratório.

Agradeço a Dra. Jakeline dos Santos e Dr. Vanderson Bernardo, pela disponibilidade e ajuda no meu processo de aprendizagem.

Agradeço ao Dr. Neil Oldham, da Universidade de Nottingham, e aos amigos e colegas de laboratório da UoN e Rothamsted, que contribuíram de forma ímpar para o meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana por todo ensinamento e amizade. Por sua contribuição para minha formação como doutora e indiscutível exemplo profissional.

Agradeço a todos os professores e funcionários do IQB.

À CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado.

RESUMO

O emprego de feromônios e voláteis de plantas como métodos alternativos ao uso indiscriminado de pesticidas sintéticos no controle de pragas têm sido amplamente estudados. Táticas sustentáveis e eficazes, como o controle e/ou manejo integrado de pragas, torna-se uma opção viável para substituição e/ou redução do uso de produtos químicos, além de minimizar perdas econômicas. A *Erinnyis ello* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Sphingidae) é considerada uma das principais pragas da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), devido à alta capacidade de consumo foliar das lagartas, em extensões do plantio. O uso de semioquímicos nesta cultura apresenta-se como uma estratégia promissora. Para tanto, foram determinadas substâncias emitidas por esta praga, passíveis de uso em iscas atrativas. Coletas de ovos, lagartas e pupas foram realizadas em municípios do Estado de Alagoas. A criação e reprodução dos insetos foram estabelecidas até a fase adulta. Técnicas de aeração e extração por solvente das partes do corpo dos insetos permitiram a obtenção dos compostos voláteis. Análises por Cromatografia Gasosa (CG) acoplada a Espectrometria de Massas (EM) revelaram a presença de compostos específicos de cada sexo, cuja ação específica foi comprovada por análises de Eletroantenografia (CG-EAG) dos extratos de ambos os sexos. A análise por Microscopia de Varredura Eletrônica (MEV) das antenas indicou uma diferenciação entre os sexos, com a presença de seis e sete tipos de sensilas, nas antenas de machos e fêmeas, respectivamente. Os insetos detectam as moléculas voláteis do ar através das sensilas olfativas, desta forma, o conhecimento dos mecanismos moleculares desse sistema, pode promover novos métodos eficazes no controle de pragas. A *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae) é considerada a praga mais importante da agricultura mundial e apresenta resistência a produtos químicos e formulações do seu feromônio sexual. Por isso, foram avaliadas a estrutura e a função das Proteínas Ligadoras de Odor (OBPs) de *H. armigera*. Uma biblioteca de cDNA foi construída a partir do RNA das antenas dos insetos e utilizada na clonagem de genes das OBPs (HarmPBP1 e HarmGOBP1) para expressão em *Escherichia coli*. As proteínas purificadas foram analisadas por Eletroforese em gel e EM com ionização por *electrospray* (ESI). O estudo da afinidade do complexo HarmPBP1 com o principal componente do feromônio de *H. armigera* foi realizado por Troca de Hidrogênio Deutério (EM-HDX) e indicou a afinidade da proteína ao ligante, bem como a análise por Espectroscopia de Fluorescência, que também foi aplicada a HarmGOBP1 com sete compostos selecionados, dos quais, quatro sugeriram deslocar a sonda fluorescente ligada à proteína. Alternativas dirigidas para o controle e monitoramento de pragas englobam ainda a diversidade de compostos ativos de produtos à base de plantas. As acetogeninas de anonáceas constituem uma série de produtos naturais que podem ser isoladas de diferentes partes de espécies de Annonaceae e apresentam uma atividade biológica marcante como larvicida. Foram realizados experimentos visando a elucidação estrutural do princípio ativo isolado da fração solúvel em clorofórmio (ACCR-2) do extrato etanólico da casca da raiz da *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae), em estudo fitoquímico guiado pela atividade sobre as larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae).

Palavras-chave: Semioquímicos. *Erinnyis ello*. Proteínas Ligadoras de Odor. *Helicoverpa armigera*. Acetogeninas.

ABSTRACT

The use of pheromones and plant volatiles as alternative methods to the indiscriminate use of synthetic pesticides in pest control has been widely studied. Sustainable and effective tactics, such as integrated pest control and/or management, become a viable option for replacement and/or reduction of chemical usage, in addition to minimizing economic losses. The *Erinnyis ello* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Sphingidae) is considered one of the main pests of cassava (*Manihot esculenta* Crantz), due to the high capacity of leaf consumption of caterpillars, across large areas of plantations. The use of semiochemicals in this culture presents itself as a promising strategy. For this purpose, substances emitted by this pest have been identified, which can be used in attractive baits. Collection of eggs, caterpillars and pupae were carried out in municipalities in the State of Alagoas. Insect breeding and reproduction was established until adulthood. Aeration and solvent extraction techniques from insect body parts allowed for volatile compounds to be obtained. Analysis of Gas Chromatography (GC) coupled with Mass Spectrometry (MS) revealed the presence of sex specific compounds, whose specific action was supported by Electroanthenography (GC-EAG) analyzes of extracts of both sexes. A Scanning Electron Microscopy (SEM) analysis of antennas indicated a differentiation between the sexes, with the presence of six and seven types of sensilla in the male and female antennas, respectively. Insects detect volatile molecules in the air through the olfactory sensilla. Therefore, the knowledge of the molecular mechanisms of this system can promote the development of new effective methods in pest control. The *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae) is considered the most important pest in worldwide agriculture and is resistant to chemicals and formulations of its sexual pheromone. As a result, the structure and function of *H. Armigera's* Odor Binding Proteins (OBPs) have been evaluated. A cDNA library was built from the RNA of the insect's antennae and used in the cloning of the OBPs' genes (HarmPBP1 and HarmGOBP1) for expression in *Escherichia coli*. The purified proteins were analyzed by Gel Electrophoresis and MS with electrospray ionization (ESI). The study of the affinity of the HarmPBP1 compound with the main component of *H. Armigera's* pheromone was carried out by Deuterium Hydrogen Exchange (MS-HDX). It indicated the protein's affinity for the ligand, which was supported by a Fluorescence Spectroscopy analysis also applied to HarmPBP1. The latter was conducted with with seven selected compounds, four of which showed a displacement of the fluorescent probe bounded to the protein. Alternatives aimed at pest control and monitoring also encompass the diversity of active compounds in plant-based products. Anogenaceous acetogenins are a series of natural products that can be isolated from different parts of Annonaceae species and present a striking biological activity as a larvicide. Experiments have been carried out aiming at the structural elucidation of the active isolated ingredient of the soluble fraction in chloroform (ACCR-2) from the ethanolic extract of the root bark of *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae), in a phytochemical study guided by the activity of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae).

Keywords: Semiochemicals. *Erinnyis ello*. Odor Binding Proteins. *Helicoverpa armigera*. Acetogenins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ciclo biológico da <i>E. ello</i>	27
Figura 2 - Ataque de pragas da <i>E. ello</i> em cultivos de mandioca.....	28
Figura 3 - Abrigo na fase de pupa da <i>E. ello</i>	28
Figura 4 - Ovos da espécie <i>E. ello</i> coletados a campo e individualizados no LpqRN da UFAL.....	30
Figura 5 - Lagartas da <i>E. ello</i> coletadas a campo.....	31
Figura 6 - Pré pupas e pupa de <i>E. ello</i>	31
Figura 7 - Criação e manutenção da <i>E. ello</i>	32
Figura 8 - Viabilidade da criação da <i>E. ello</i> em condições de laboratório.....	33
Figura 9 - Dimorfismo sexual em pupas da <i>E. ello</i> : a) fêmea; b) macho.....	34
Figura 10 - Dimorfismo sexual de <i>E. ello</i> : a) variações do tamanho da pupa; b) análise morfométrica.....	34
Figura 11 - Adultos da <i>E. ello</i>	35
Figura 12 - Filmagem realizada para avaliação do comportamento sexual.....	35
Figura 13 - Extração por solvente, das partes do corpo dos insetos.....	36
Figura 14 - Tufo de pêlos em ambos lados do corpo de machos da <i>E. ello</i> : a) e b) laterais do abdome; c) abaixo da perna anterior.....	37
Figura 15 - Antenas de fêmeas e machos da <i>E. ello</i>	37
Figura 16 - Sistema de aeração para coleta de compostos voláteis de <i>E. ello</i>	38
Figura 17 - Seccionamento da antena de macho da <i>E. ello</i>	40
Figura 18 - Montagem e metalização das antenas de <i>E. ello</i>	42
Figura 19 - Microscópio com amostras metalizadas para análise.....	43
Figura 20 - Adulto de <i>E. ello</i> alimentando-se de solução de mel a 15 %.....	44
Figura 21 - Cópula de adultos da <i>E. ello</i> observada pela manhã.....	45
Figura 22 - Cópula de adultos da <i>E. ello</i> observada no final da tarde.....	46
Figura 23 - Cópula de adultos da <i>E. ello</i> observada no início da noite.....	46
Figura 24 - Ovos e lagartas recém eclodidas da <i>E. ello</i> , após cópula em insetário, na Ufal.....	47
Figura 25 - Lagartas inviáveis da <i>E. ello</i> , após cópula e eclosão em insetário, na Ufal.....	48
Figura 26 - Mandioca plantada no insetário.....	48
Figura 27 - Ovos de <i>E. ello</i> : a) parasitado; b) sadio.....	51
Figura 28 - Exposição de pupas de <i>Trichogramma</i> spp. em ovos de <i>E. ello</i>	51
Figura 29 - Emergência e sexagem de <i>Trichogramma</i> spp. a partir de ovos de <i>E. ello</i>	52
Figura 30 - Ovos de <i>E. ello</i> parasitado.....	52
Figura 31 - Adultos de <i>Telenomus</i> sp. obtidos de ovos de <i>E. ello</i> parasitados por esta espécie.....	53
Figura 32 - Ovos de parasitoides da família Tachinidae em lagarta de <i>E. ello</i>	53
Figura 33 - Pupas e adulto dos taquinídeos parasitoides de larva-pupa de <i>E. ello</i>	54
Figura 34 - Pupa de taquinídeo parasitoide de larva-pupa de <i>E. ello</i>	54
Figura 35 - Larva do taquinídeo, retirada intencionalmente da pupa de <i>E. ello</i>	55
Figura 36 - Adulto de taquinídeo parasitoide de larva-pupa de <i>E. ello</i> , identificado como <i>Belvosia bicincta</i> (Tachinidae).....	55
Figura 37 - MEV de antenas de machos de <i>E. ello</i>	57
Figura 38 - Diferenciação das sensilas do tipo tricóide (Tc) presentes em cada antenômero do flagelo em antenas de <i>E. ello</i> : a) macho; b) fêmea.....	57

Figura 39 - Diferenciação das sensilas do tipo tricóide (Tc) presentes em cada antenômero do flagelo em antenas de <i>E. ello</i> : a) macho; b) fêmea.	58
Figura 40 - MEV do intersegmento entre a cabeça e a base do escapo da antena de <i>E. ello</i> , com a presença das cerdas de Böhm's bristles (Bb).....	59
Figura 41 - MEV da antena de <i>E. ello</i> , com a presença de sensilas caéticas: a) aos pares, em cada segmento flagelar; b) segmento apical.	60
Figura 42 - MEV da antena de <i>E. ello</i> , com a presença de sensilas coelocônicas....	60
Figura 43 - MEV da antena de <i>E. ello</i> , com a presença de sensilas estilocônicas....	61
Figura 44 - MEV da antena de <i>E. ello</i> , com a presença de sensilas esquamiforme..	62
Figura 45 - MEV da antena de <i>E. ello</i> , com a presença de sensila auricilica.	62
Figura 46 - Cromatogramas obtidos por CG-EM: a) extrato hexânico de glândulas sexuais em fêmeas de <i>E. ello</i> ; b) padrões de alcanos C ₇ -C ₄₀ ; c) padrão Eicosano (C ₂₀).....	65
Figura 47 - Gráfico bloxpot de respostas eletroantegráficas da <i>E. ello</i>	67
Figura 48 - Expansão da resposta eletroantegráfica da antena de macho de <i>E. ello</i> para o extrato de glândulas sexuais da <i>E. ello</i>	67
Figura 49 - Cromatograma do extrato do abdômen de machos de <i>E. ello</i>	68
Figura 50 - Resposta eletroantegráfica da antena de fêmea de <i>E. ello</i> para o extrato do abdome de machos de <i>E. ello</i>	68
Figura 51 - Cromatograma do extrato das asas anteriores dos machos de <i>E. ello</i> ...	69
Figura 52 - Resposta eletroantegráfica da antena de fêmea de <i>E. ello</i> para o extrato de asas anteriores de machos de <i>E. ello</i>	70
Figura 53 - Cromatograma do extrato do primeiro segmento do abdome dos machos de <i>E. ello</i>	71
Figura 54 - Cromatograma obtido por CG-EM dos voláteis de fêmeas de <i>E. ello</i>	72
Figura 55 - Cromatograma obtido por CG-EM dos voláteis de machos de <i>E. ello</i>	73
Figura 56 - Ciclo biológico da <i>H. armigera</i>	83
Figura 57 - Inseticidas fisiológicos do grupo das benzoilureias: a) Hexaflumuron: 1-[3,5-dicloro-4-(1,1,2,2-tetrafluoroethoxi)fenil]-3-(2,6-difluorobenzoil) ureia; b) Lufenuron: (RS)-1-[2,5-dicloro-4-(1,1,2,3,3,3-hexafluoropropoxi)fenil]-3-(2,6-difluorobenzoil) ureia; c) Clorfluazuron: 1-(3,5-dicloro-4-(3-cloro-5-trifluorometil-2-piridiloxi)fenil)-3-(2,6-difluorobenzoil) ureia.	84
Figura 58 - Gel de eletroforese em Poliacrilamida SDS-PAGE (15 %) das etapas de desnovelamento e reenovelamento da HarmGOBP1. Etapas das alíquotas coletadas: (1) lise celular; (2) desnovelamento; (3) reenovelamento e (4) proteína alvo.....	111
Figura 59 - Gel de eletroforese em Poliacrilamida SDS-PAGE (15 %) das etapas de purificação da HarmGOBP1. Etapas das alíquotas coletadas: (1), (2) e (3) retenção da proteína na coluna; (4) e (5) eluição da proteína; (6) e (7) clivagem; (8) proteína purificada e (9) final da etapa de purificação.	112
Figura 60 - Moléculas com grupos similares que atuam competindo com os íons Ni ²⁺ através da cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC). a) Histidina; b) Imidazol.	112
Figura 61 - Gel de eletroforese em Poliacrilamida SDS-PAGE (15 %) das OBPs. Concentrações obtidas: HarmGOBP1 [(1) 30µM; (2) 28µM; (3) 20µM]; HarmPBP1 [(4) 50 µM e (5) 200 µM].....	113
Figura 62 - Espectro de Massas das OBPs após digestão com a trombina.	114

Figura 63 - Ampliação do Espectro de Massas da Mioglobina (mb) a 5 μ M.	116
Figura 64 - Determinação do estado de carga e cálculo do peso molecular do espectro de massas obtido da amostra de Mioglobina a 5 μ M.	117
Figura 65 - Espectro de Massas da Mioglobina (mb) a 5 μ M.	119
Figura 66 - Espectro de Massas da Mioglobina (mb) a 5 μ M.	120
Figura 67 - Curvas de desnaturação da Mb em presença de Ureia-d4 e GdmCl-d6.	122
Figura 68 - Curvas da aplicação do método em replicatas das proteínas a) Mioglobina a 5 μ M; Faixa de concentração de GdmCl-d6 de 0,6 a 5,7 M (N = 9). b) HarmPBP1 a 2,5 μ M; Faixa de concentração de GdmCl-d6 de 0,6 a 4,2 M (N = 7).	123
Figura 69 - Curva da variação de massas da HarmPBP1 em presença e ausência do ligante Z11-16:Al.	126
Figura 70 - Estrutura da sonda fluorescente 1-NPN.	127
Figura 71 - Estrutura do triptofano (<i>Trp</i> ou <i>W</i>) (aminoácido aromático, apolar e fluorescente).	128
Figura 72 - Estruturas dos compostos selecionados para avaliação da complexação com HarmGOBP1: (1) Benzaldeído; (2) 2-Naftol; (3) Naftaleno; (4) Salicilaldeído; (5) 2-metóxi-1-naftoquinona; (6) <i>cis</i> -11-hexadecenal (Z11-16:Al).	129
Figura 73 - Emissão de fluorescência da HarmGOBP1. A proteína (2 μ M) foi excitada a 280 nm e os espectros foram registrados entre 290 nm e 450 nm. a) Espectros de emissão com gradual aumento das concentrações de 1-NPN de 0 até 22 μ M. b) Gráfico do pico de emissão da HarmGOBP1 a 330 nm e 395 nm em função da concentração da 1- NPN.	130
Figura 74 - Emissão de fluorescência da HarmPBP1. A proteína (2 μ M) foi excitada a 280 nm e os espectros foram registrados entre 290 nm e 450 nm. a) Espectros de emissão com gradual aumento das concentrações de 1-NPN de 0 até 20 μ M. b) Gráfico do pico de emissão da HarmPBP1 a 330 nm e 395 nm em função da concentração da 1- NPN.	131
Figura 75 - Gráfico do pico de emissão a 330 nm e 395 nm da HarmPBP1 incubada com a 1-NPN a 2 μ M em função da concentração do <i>cis</i> -11-hexadecenal.	132
Figura 76 - Emissão de fluorescência da HarmGOBP1. a) Espectros de emissão dos compostos (a 2 μ M) selecionados para avaliação da complexação com HarmGOBP1. b) Gráfico dos picos de emissão da HarmGOBP1 sem e com adição da 1-NPN e 2-Naftol (0 a 20 μ M).	133
Figura 77 - Gráficos do pico de emissão a 330 nm e 395 nm da HarmGOBP1 incubada com a 1-NPN a 2 μ M em função da concentração dos ligantes: a) <i>cis</i> -11-hexadecenal; b) Salicilaldeído; c) 2-metóxi-1-naftoquinona; d) Benzaldeído.	134
Figura 78 - Gráfico do pico de emissão a 330 nm e 395 nm da HarmGOBP1 incubada com a 1-NPN a 2 μ M em função da concentração do Naftaleno (0 a 20 μ M).	135
Figura 79 - Fluxograma do processo de obtenção da acetogenina de estudo.	161
Figura 80 - Espectro de RMN 1 H, em CDCl $_3$, para a amostra BRAC.	162
Figura 81 - Ampliação das regiões do espectro de RMN 1 H de BRAC, em CDCl $_3$, onde estão os sinais que confirmam o anel γ -lactona α,β -insaturado. .	163

Figura 82 - Ampliação das regiões do espectro de RMN ^{13}C de BRAC, em CDCl_3 que evidenciam a presença do anel γ -lactona α,β -insaturada.....	164
Figura 83 - Região do espectro HMBC da amostras BRAC, em CDCl_3 , mostrando os acoplamentos a longa distância entre os hidrogênios do grupo metila e grupo metilênico com os demais carbonos do anel da lactona.....	165
Figura 84 - Subunidade anel γ -lactona α,β -insaturada na qual estão dispostas as atribuições dos sinais de hidrogênio característicos desse grupo.....	165
Figura 85 - Ampliação das regiões dos espectros de HSQC e RMN ^{13}C da amostra BRAC, em CDCl_3 , mostrando a correlação direta entre os carbonos e hidrogênios do THF.	166
Figura 86 - Região do espectro COSY, em CDCl_3 onde destaca-se em laranja os acoplamentos entre os hidrogênios metínicos com os hidrogênios metilênicos do anel THF.....	166
Figura 87 - Região do espectro DEPT135, em CDCl_3 onde destaca-se os três carbonos metilênicos e o carbono metínico ligado ao grupo hidroxila do fragmento da acetogenina presente na amostra BRAC.....	167
Figura 88 - Região dos espectros (a) HMBC e (b) HSQC, em CDCl_3 onde destaca-se os sinais característicos de um grupo acetoxi provavelmente presente na amostra BRAC.	168
Figura 89 - Estrutura parcial proposta para a acetogenina isolada.	169

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Utilidades da cultura da mandioca.	25
Tabela 2 - Viabilidade da <i>E. ello</i> em condições de laboratório.	49
Tabela 3 - Funções atribuídas as sensilas das antenas de insetos.	63
Tabela 4 - Média e erro padrão da média do comprimento e largura basal das sensilas presente nas antenas de fêmeas e machos de <i>E. ello</i> , 1758 (Lepidoptera: Sphingidae).	63
Tabela 5 - Diferenciação dos picos para possíveis compostos exclusivos de cada sexo de <i>E. ello</i>	64
Tabela 6 - Composição química do extrato hexânico de glândulas sexuais em fêmeas de <i>E. ello</i>	66
Tabela 7 - Composição química do extrato das asas superiores dos machos de <i>E. ello</i>	70
Tabela 8 - Composição química dos voláteis de aeração de fêmeas de <i>E. ello</i>	72
Tabela 9 - Composição química dos voláteis de aeração de fêmeas de <i>E. ello</i>	73
Tabela 10 - Variação de massas da Mioglobina (mb) antes e após deuteração do meio reacional e consequente determinação da taxa de troca (HDX) nas condições estabelecidas de <i>quenching</i> com TFA a 1% e tampões de lavagem (5% MeOH + TFA) e de eluição (80% ACN + FA).	118
Tabela 11 - Variação de massas da Mioglobina (mb) antes e após deuteração do meio reacional e consequente determinação da taxa de troca (HDX) nas condições estabelecidas de <i>quenching</i> com FA a 1% e tampões de lavagem (5% ACN + FA) e de eluição (80% ACN + FA).	118
Tabela 12 - Média e desvio padrão obtidos das curvas do método aplicado em replicatas das proteínas (I) Mioglobina a 5 µM; Faixa de concentração do GdmCl-d6 de 0,6 a 5,7 M (N = 9). (II) HarmPBP1 a 2,5 µM; Faixa de concentração de GdmCl-d6 de 0,6 a 4,2 M (N = 7).	124
Tabela 13 - Cinco frações obtidas da fração em clorofórmio (ACCR-2).	151
Tabela 14 - Nove frações obtidas da fração Hex/CHCl ₃ 1:1 (ACCR-2.1; 110 g).	152
Tabela 15 - Onze frações obtidas da fração Hex/AcOEt 10 % 1:1 (ACCR-2.1.3). ...	152
Tabela 16 - Atividade larvicida frente a <i>A. salina</i> do extrato bruto e frações da partição da casca da raiz da <i>A. crassiflora</i>	156
Tabela 17 - Atividade larvicida frente as larvas do <i>A. aegypti</i> do extrato bruto e frações da partição da casca da raiz da <i>A. crassiflora</i>	156
Tabela 18 - Atividade larvicida da fração Hex/CHCl ₃ ; ACCR-2, frente a <i>A. salina</i> . .	157
Tabela 19 - Atividade larvicida da fração Hex/CHCl ₃ ; ACCR-2, frente ao <i>A. aegypti</i>	157
Tabela 20 - Atividade larvicida das frações da filtração Hex/CHCl ₃ ; ACCR-2.1, frente a <i>A. salina</i>	158
Tabela 21 - Atividade larvicida frente ao <i>A. aegypti</i> das nove frações obtidas da filtração da fração Hex/CHCl ₃ ; ACCR-2.1.	158
Tabela 22 - Atividade larvicida das frações obtidas da filtração ACCR-2.1.3 (Hex/CHCl ₃), frente a <i>A. salina</i>	159
Tabela 23 - Frações obtidas por CCD da fração Hex/AcOEt 10 %.	160
Tabela 24 - Prospecção fitoquímica dos extratos de da casca da raiz da <i>A. crassiflora</i>	160

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>A. aegypti</i>	<i>Aedes aegypti</i> (L.)
ACGs	Acetogeninas
ANOVA	Análise de Variância
CECA	Centro de Ciências Agrárias
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CG-EAG	Cromatografia Gasosa acoplada à Eletroantenografia
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CG-DIC	Cromatografia gasosa - Detector por Ionização de Chama
DOSY	Espectroscopia Ordenada por Difusão (<i>Diffusion Ordered Spectroscopy</i>)
EAG	Eletroantenografia
<i>E. ello</i>	<i>Erinnyis ello</i> (L.)
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
GOBPs	Proteínas Ligadoras de Odor Gerais (<i>General Odorant Binding Proteins</i>)
<i>H. armigera</i>	<i>Helicoverpa armigera</i> (Hub.)
HDX MS	Espectrometria de massa (EM) de troca de hidrogênio deutério (HDX) (<i>Hydrogen deuterium exchange (HDX) mass spectrometry (MS)</i>)
IK	Índice de Kovats
IPTG	β -D-1-tiogalactopiranosídeo de Isopropila (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside)
LPqRN	Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais
OBPs	Proteínas Ligadoras de Odor (<i>Odorant Binding Proteins</i>)
PBPs	Proteínas Ligadoras de Feromônio (<i>Pheromone Binding Proteins</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	17
2	ESTUDO DOS VOLÁTEIS DA <i>ERINNYIS ELLO</i> (LINNAEUS, 1758) (LEPIDOPTERA: SPHINGIDAE) COMO UMA ALTERNATIVA DE CONTROLE PARA COMPOR O MANEJO INTEGRADO EM CULTIVO DE MANDIOCA	20
2.1	Introdução	21
2.2	Objetivos	23
2.2.1	Objetivo geral	23
2.2.2	Objetivos específicos.....	23
2.3	Revisão da literatura	24
2.3.1	Mandioca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz).....	24
2.3.2	<i>Erinnyis ello</i> (L.) (Lepidoptera: Sphingidae).....	27
2.4	Experimental	30
2.4.1	Materiais e métodos	30
2.4.2	Viabilidade de criação, reprodução e manutenção dos insetos em laboratório	30
2.4.3	Sexagem e avaliação preliminar do comportamento de acasalamento	33
2.4.3.1	Dimorfismo sexual	33
2.4.3.2	Avaliação preliminar do comportamento de chamamento e reprodução.....	35
2.4.4	Extração por solvente para avaliação de semioquímicos.....	36
2.4.5	Extração de voláteis por aeração	38
2.4.6	Análises dos extratos obtidos.....	39
2.4.7	Eletroantenografia (EAG)	40
2.4.7.1	Eletroantenografia (EAG) – “Puff”	41
2.4.7.2	Cromatografia gasosa acoplada a eletroantenografia (CG-EAG)	41
2.4.8	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	42
2.5	Resultados e discussão	44
2.5.1	Bioensaio comportamental, reprodução e viabilidade de criação em laboratório	44
2.5.2	Controle biológico da <i>E. ello</i> durante a pesquisa	51
2.5.3	Dimorfismo sexual.....	56
2.5.3.1	Análise morfométrica.....	56
2.5.3.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	56
2.5.4	Avaliação química por cromatografia gasosa e respostas eletroantenográficas	63
2.5.4.1	Análises cromatográficas do extrato das partes do corpo do inseto	63
2.5.4.2	Análises cromatográficas e EAG	64
2.5.4.3	Análises cromatográficas dos voláteis por aeração	71
2.6	Conclusão	73
	REFERÊNCIAS	74
3	ESTRUTURA E FUNÇÃO DE PROTEÍNAS LIGADORAS DE ODOR (OBPS) DE <i>HELICOVERPA ARMIGERA</i> (HÜBNER, 1805) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)	79
3.1	Introdução	80
3.2	Objetivos	82
3.2.1	Objetivo geral	82
3.2.2	Objetivos específicos.....	82

3.3 Revisão da literatura	83
3.3.1 <i>Helicoverpa armigera</i> (Hub.)	83
3.3.2 Proteínas Ligadoras de Odor (OBPs).....	86
3.3.3 Proteínas Ligadoras de Feromônio (PBPs).....	87
3.3.4 Proteínas Ligadoras de Odores Gerais (GOBPs).....	88
3.3.5 Espectrometria de Massas (EM) de Troca de Hidrogênio Deutério (HDX).....	90
3.4 Experimental	92
3.4.1 Equipamentos	92
3.4.2 Materiais e métodos	93
3.4.2.1 Obtenção da biblioteca de DNA complementar (cDNA), clonagem e sequenciamento.....	93
3.4.2.2 Transformação em <i>E. coli</i> (XL1 Blue).....	95
3.4.2.3 Expressão e reenovelamento (<i>refolding</i>) das OBPs.....	96
3.4.2.4 Purificação das OBPs.....	97
3.4.2.5 Eletroforese em gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (15%) (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) (SDS-PAGE) ..	98
3.5 Procedimentos	99
3.5.1 Expressão e reenovelamento das OBPs.....	99
3.5.1.1 Expressão em BL21 (DE3).....	99
3.5.1.2 Desnovelamento	100
3.5.1.3 Reenovelamento	100
3.5.2 Purificação e troca de tampão.....	100
3.5.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (15 %) (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) (SDS-PAGE) 101	
3.5.4 Digestão peptídica com a trombina	102
3.5.5 Nanodrop.....	102
3.6 Preparo das amostras para análise	102
3.6.1 Reagentes e soluções	102
3.6.2 Preparação das amostras usando ZipTip® para confirmação das OBPs	103
3.6.3 Reação de troca de hidrogênio-deutério (HDX)	103
3.6.4 Fluorescência	104
3.7 Espectrometria de massas (EM) de troca de hidrogênio deutério (HDX)...	104
3.7.1 Otimização do método.....	105
3.7.1.1 Avaliação dos tampões de lavagem e de eluição.....	105
3.7.1.2 Avaliação do desnaturante	106
3.7.1.3 Aplicação do método em mioglobina e HarmPBP1	107
3.7.1.4 Avaliação da HarmPBP1 com o ligante <i>cis</i> -11-hexadecenal (Z11-16:Al) ...	108
3.8 Fluorescência	108
3.8.1 Medições de fluorescência	108
3.8.2 Fluorescência intrínseca.....	109
3.8.3 Sonda fluorescente	109
3.9 Resultados e discussão	110
3.9.1 Análise das OBPs por SDS-PAGE (15 %) e Espectrometria de Massas (EM)	110
3.9.1.1 Confirmação das OBPs por SDS-PAGE (15 %).....	110
3.9.1.2 Confirmação das OBPs por Espectrometria de Massas (EM).....	114
3.9.2 Espectrometria de massas (EM) de troca de hidrogênio deutério (HDX)	115
3.9.2.1 Otimização do método.....	115
3.9.2.2 Avaliação dos tampões de lavagem e de eluição e <i>quenching</i>	117
3.9.2.3 Avaliação do desnaturante	121

3.9.2.4 Aplicação do método com mioglobina e HarmPBP1	123
3.9.2.5 Avaliação da HarmPBP1 com o ligante <i>cis</i> -11-hexadecenal (Z11-16:Al)	125
3.9.3 Fluorescência	127
3.10 Conclusão	135
REFERÊNCIAS	136
4 PRODUTO VEGETAL PARA O CONTROLE DE LARVAS DO Aedes Aegypti (LINNAEUS, 1762) (DIPTERA: CULICIDAE)	143
4.1 Introdução	144
4.2 Experimental	146
4.2.1 Coleta e identificação da <i>Annona crassiflora</i> Mart.	146
4.2.2 Reagentes e soluções	146
4.2.3 Materiais e métodos	147
4.2.3.1 Métodos cromatográficos	147
4.2.3.2 Reveladores	147
4.2.3.3 Obtenção dos extratos da casca da raiz da <i>Annona crassiflora</i> Mart.	148
4.2.4 Prospecção fitoquímica do extrato bruto da raiz da <i>A. crassiflora</i>	148
4.2.4.1 Teste para fenóis e taninos	148
4.2.4.2 Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonoides	149
4.2.4.3 Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavononas	149
4.2.4.4 Teste para flavonóis, flavanonas, flavanonois e xantonas	150
4.2.4.5 Teste para antraquinonas, antronas e cumarinas	150
4.2.4.6 Teste para alcaloides	150
4.2.4.7 Teste para esteroides e triterpenóides Liebermann-Buchard	151
4.2.5 Filtração em gel de sílica da fração em clorofórmio (ACCR-2; 280 g)	151
4.2.6 Filtração em gel de sílica da fração Hex/CHCl ₃ 1:1 (ACCR-2.1; 109 g)	152
4.2.7 Bioensaios larvicida	153
4.3 Resultados e discussão	155
4.3.1 Avaliação da atividade larvicida do extrato etanólico da casca da raiz da <i>A. crassiflora</i> frente as larvas do <i>A. aegypti</i> e da <i>A. salina</i>	155
4.3.2 Avaliação da toxicidade	155
4.3.3 Avaliação da atividade larvicida frente ao <i>A. aegypti</i>	156
4.3.4 Avaliação da atividade larvicida da fração Hex/CHCl ₃ ; ACCR-2, frente ao <i>A. aegypti</i>	157
4.3.5 Biensaios da fração Hex/CHCl ₃ ; ACCR-2.1	158
4.3.5.1 Atividade de toxicidade e larvicida	158
4.3.6 Prospecção fitoquímica da espécie <i>A. crassiflora</i>	160
4.3.7 Identificação parcial da estrutural da amostra BRAC	161
4.4 Conclusão	169
REFERÊNCIAS	170
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	172

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os insetos, plantas e mamíferos utilizam-se de substâncias químicas, conhecidas como semioquímicos, que são mensagens particularmente importantes para a sobrevivência das espécies e possuem papel importante na reprodução e na busca de fontes de alimentos. A complexidade e o grau de especificidade dessas substâncias são singulares no reino animal (HENNEKEN, et al., 2017). Em 1930, entomologistas observaram que mariposas fêmeas eram capazes de excitar mariposas machos, mesmo quando estes não podiam vê-las ou ouvi-las. A este tipo de comunicação foi denominado "feromônio" (baseado nas palavras gregas *pherein* - para transferir - e *hormon* - para excitar) (SEMWAL, et al., 2013). A comunicação sexual em mariposas oferece um cenário simplificado para modelar e investigar a sensibilidade sensorial de percepção dos insetos (CHANG, et al., 2015).

Para melhor compreensão, os semioquímicos são divididos em: feromônios, usados na comunicação intraespecífica, ou seja, entre indivíduos de mesma espécie; e aleloquímicos, na comunicação interespecífica, ou seja, entre indivíduos de espécies diferentes. Os feromônios são amplamente divididos em duas classes, consideradas como: aqueles que produzem mudanças comportamentais de curto prazo e agem, por exemplo, como atrativos ou repelentes; e aqueles que produzem mudanças duradouras no comportamento ou desenvolvimento pela ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, por isso, são diferenciados em feromônios de agregação, alarme, epideíticos, territorial, de trilha, de informação e sexuais (MOSTAFA, et al., 2012). É através dos sistemas olfativos que os insetos são capazes de responder e discriminar estímulos complexos de odor, para procurar parceiros de acasalamento, localizar plantas hospedeiras, identificar locais de oviposição e evitar predadores, detectando uma ampla gama de semioquímicos, mesmo em concentrações baixas, de forma sensível e seletiva (BYERS, et al., 2013). Diante deste conhecimento, pretendeu-se primeiramente, determinar os semioquímicos emitidos por *Erinnyis ello* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Sphingidae), como potenciais feromônios, a fim de utilizá-los em iscas atrativas, impedindo o encontro de parceiros para acasalamento, controlando assim esta espécie, de forma específica.

Nos insetos, a detecção dos semioquímicos ocorre através de receptores odorantes (ORs), fundamentais para o reconhecimento de substâncias atrativas e

repelentes, localizada nas membranas dos dendritos dos neurônios sensoriais olfativos, responsáveis pela recepção e transdução da informação odorífera. As moléculas de odorantes lipossolúveis externas penetram nos poros da sensila, na linfa, e são reconhecidas pelas proteínas ligadoras de odor (OBPs) que as transfere aos ORs (YU, et al., 2020). As OBPs são as proteínas olfativas mais importantes dos insetos. Tanto as proteínas ligadoras de feromônios (PBPs) quanto os receptores (PRs) estão envolvidos na detecção, particularmente dos feromônios sexuais, e a interação entre eles têm sido amplamente estudada (CHANG, et al., 2015; LU, et al., 2015). Embora as evidências de que as proteínas olfativas desempenhem um papel essencial na mediação do comportamento dos insetos, sejam bem aceitas, o mecanismo olfativo ainda é pouco compreendido (QIU, et al., 2020). Assim, buscamos também, compreender a complexação proteína-ligante de *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae), para determinar seu uso na identificação de odores.

Outra forma de controle de pragas é o uso de inseticidas botânicos como uma alternativa aos pesticidas sintéticos. Espécies vegetais produzem naturalmente substâncias químicas provenientes do metabolismo secundário, que desempenham um papel defensivo, podendo inibir a ação de insetos herbívoros, impedindo que estes se alimentem e/ou prejudiquem o desenvolvimento normal dos ovos, reduzindo assim o desenvolvimento de larvas (DE MORAIS, et al., 2016). Dos produtos de plantas tropicais com potencial inseticida, os extratos de Annonaceae vêm destacando-se com grande potencial no controle de pragas. Isto é particularmente devido à presença de um grupo de substâncias conhecido por acetogeninas (ACGs) estruturalmente diversas em sua composição, encontradas exclusivamente em alguns gêneros dessa família botânica (GEISLER, et al., 2019). Pelo uso de técnicas de RMN, foi proposta a estrutura do princípio ativo contido no extrato de *Annona crassiflora*, com atividade sobre as larvas do mosquito *A. aegypti*.

Os insetos considerados como pragas de culturas são aqueles cujo crescimento populacional é praticamente incontrolável, provocando desta forma, danos nas plantas, que perdem produção e geram danos econômicos irreparáveis. Esses insetos-praga são geralmente uma espécie polífaga, com alta taxa de reprodução, normalmente favorecida pela mínima presença de predadores (ZANETTI, 2013; LIMA, et al., 2009). A prática do manejo integrado de pragas (MIP) agrega diferentes técnicas de controle, que visam promover a redução da população

dos insetos-praga na cultura. Estas técnicas podem incluir ferramentas como o controle por comportamento, o uso de plantas iscas e inimigos naturais, o uso inteligente de inseticidas e bioinseticidas (COLMENAREZ, et al., 2016).

Esse trabalho teve como objetivo desenvolver alternativas para o controle de três importantes pragas, sendo elas, *E. ello*, considerada a praga mais importante dos cultivos de mandioca; *H. armigera*, uma das pragas de maior importância econômica, no mundo e as larvas do mosquito *A. aegypti*, o principal vetor de doenças virais, incluindo a dengue, chikungunya, zica e febre amarela.

**2 ESTUDO DOS VOLÁTEIS DA *ERINNYIS ELLO* (LINNAEUS, 1758)
(LEPIDOPTERA: SPHINGIDAE) COMO UMA ALTERNATIVA DE CONTROLE
PARA COMPOR O MANEJO INTEGRADO EM CULTIVO DE MANDIOCA**

2.1 Introdução

Em alguns países tropicais e subtropicais a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma das principais fontes de carboidrato na alimentação básica das populações, que também fazem sua ingestão na forma de farinha e outros derivados. Além disso, é importante fonte de amido para as indústrias de alimentos, de papel e têxtil, entre outras. A mandioca é também utilizada como matéria-prima para produção de etanol (VALLE; LORENZI, 2014).

No cenário agrícola brasileiro, a mandioca está entre as culturas de maior relevância e é cultivada em todas as regiões. As regiões Norte e Nordeste se destacam como consumidoras e produtoras. A produção nessas regiões se dá principalmente por pequenos agricultores (RAUL, et al., 2019). A mandioca é cultivada por agricultores que operam negócios em larga escala, médios e pequenos agricultores, para subsistência e comércios locais e regionais. Possuindo capacidade de competir com grandes culturas, como soja, milho e pastagens, o que leva a geração de empregos e renda (SILVA, et al., 2012). No entanto, alguns fatores podem acarretar na perda de produção da mandioca, e dentre eles, destaca-se a ocorrência de lagartas desfolhadoras *Erinnyis ello* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Sphingidae) no plantio (DA SILVA, et al., 2020).

Vulgarmente conhecido como “gervão da mandioca”, Mandarová e/ou Mandarová-da-mandioca, este inseto apresenta alta capacidade migratória, ampla adaptação climática, extensa distribuição e ataques que podem ocorrer em qualquer época do ano, com maior frequência em períodos chuvosos (MAIA, et al, 2010). Os ataques desta praga geralmente são cíclicos e bastante comuns nos mandiocais brasileiros (NEVES, et al., 2013). Seu ciclo é relativamente curto (33 a 55 dias), podendo ter várias gerações ao ano (DIAS, et al, 2014). Os prejuízos mais significativos são observados em plantas jovens, com dois a cinco meses após o plantio, acarretando em reduções no rendimento de raízes, o que pode afetar a qualidade das manivas e causar a morte de plantas jovens, além de reduzir o teor de amido. Os prejuízos causados pelas lagartas podem também incluir as lesões e ferimentos da planta, que facilitam a penetração de doenças na cultura (PIETROWSKI, 2010). Os métodos de controle utilizados no manejo da *E. ello* podem ser cultural, químico, físico ou biológico, entretanto, estas metodologias

apresentam limitações e/ou riscos de contaminação ao meio ambiente e à saúde dos agricultores (RINGENBERG, 2014).

Em sua maioria, os inseticidas disponíveis comercialmente, quando usados adequadamente, ajudam a controlar a praga, mas por não serem específicos para *E. ello*, trazem problemas pela redução dos polinizadores, inimigos naturais e a fauna em geral, reduzindo a diversidade da população de organismos no ambiente. Se usado excessivamente, estes inseticidas apresentam riscos de intoxicação dos agricultores, assim como o risco de resíduos nos alimentos, tornando-os de qualidade imprópria para consumo, além da contaminação dos lençóis freáticos (OLIVEIRA, et al., 2018).

A alternativa mais eficiente para a redução do uso de agrotóxicos é a adoção do manejo integrado de pragas (MIP) cada vez mais importante e que oferece bons resultados, em termos biológicos, econômicos e ambientais (SUN, et al., 2017).

Nesse trabalho pretendeu-se determinar os feromônios de *E. ello* para dispor de uma ferramenta para uso no manejo integrado da praga, com uso no monitoramento da população e no controle. Para isto, foi necessária uma série de etapas interligadas, desde a criação e manutenção de uma colônia de insetos até a identificação estrutural dos compostos ativos. Os compostos ativos poderão, se não disponíveis comercialmente, serem obtidos por síntese química, para comprovar a ação, realizar testes a campo e posterior uso no monitoramento e controle da *E. ello* através de iscas atrativas. Esse método comportamental para controle da praga, estará disponível para uso, como uma tecnologia eficiente e de menor custo, contribuindo ainda para o uso inteligente de inseticidas, quando necessário.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo geral

Determinação de substâncias ativas para o uso em iscas no monitoramento e controle da espécie *Erinnyis ello* (L.).

2.2.2 Objetivos específicos

- a) Estabelecer a criação da *E. ello*;
- b) Extrair os voláteis da *E. ello*, utilizando técnicas de aeração e extração cuticular de machos e fêmeas;
- c) Realizar testes comportamentais, como CG-EAG para verificação da atividade;
- d) Caracterização das sensilas de machos e fêmeas da *E. ello* por MEV;
- e) Elucidação estrutural das moléculas ativas.

2.3 Revisão da literatura

2.3.1 Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)

Esta cultura perene arbustiva é pertencente à família Euphorbiaceae e cultivada em todo o mundo. É considerada uma cultura pouco exigente quanto a insumos, com consumo mínimo de produtos químicos, como fertilizantes, herbicidas e inseticidas; tornando-se uma das matérias-primas agro-alimentares mais baratas e sustentáveis (ADEKUNLE, et al., 2016). A mandioca é uma cultura estratégica para segurança alimentar e geração de renda. A expansão da indústria desta cultura é impulsionada principalmente pelo aumento das demandas de alimentos no continente africano, amido e para produção de etanol (MORGAN, et al., 2016). Esta cultura é considerada uma das principais fontes de carboidratos, além de ser fonte de proteínas, vitaminas, minerais e carotenoides (DE MATOS, et al., 2019). Como matéria-prima para o etanol combustível, a mandioca destaca-se por ser amplamente cultivada em condições ambientais severas, especialmente a seca, como também os baixos requisitos de insumos no plantio e colheita, pois, ao contrário das matérias-primas provenientes de indústrias à base de açúcar (melaço) a mandioca pode crescer e ser colhida durante todo o ano (OGBONNA, et al., 2010.) Isto justifica o interesse e crescimento das indústrias de combustíveis renováveis (bioetanol) na Indonésia, China, Coreia e Japão (WIDODO, et al., 2015).

Na avaliação mensal da CONAB, em abril deste ano, estimou-se que a produção brasileira de raiz de mandioca, de acordo com a última atualização do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (abril/2020), foi de 18,7 milhões de toneladas, cultivadas numa área de 1,27 milhão de hectares, representando uma produtividade de 14,75 t/ha. Entretanto, a área plantada sofreu uma redução de 3,03%, acarretando na produtividade de 14,75t/h, frente à 15,15t/h em 2019, o que ocasionou uma redução de 2,59% (CONAB, 2020).

Em termos de segurança alimentar, a importância desta cultura está relacionada ao acúmulo de amido no parênquima (órgão amiláceo) da raiz, uma importante fonte de carboidratos. Além disso, as raízes também contêm níveis significativos de vitamina C, riboflavina, tiamina e niacina (PINTO-ZEVALLOS, et al., 2016). No Brasil, o largo consumo desta raiz, seja cozida, assada, frita e da farinha em farofas, pirões, virados e recheios desempenham um importante papel sócio-

cultural e econômico. Toda cadeia produtiva de mandioca e seus subprodutos geram mais de um milhão de empregos diretos (RAUL, et al., 2019).

A mandioca tem grande número de usos correntes e potenciais, classificados segundo o tipo de raiz, em duas grandes categorias: mandioca de mesa (comercializada na forma *in natura*) e mandioca para a indústria, na qual as farinhas (e as farofas) e a fécula são mais importantes. Mas também, toda sua extensão pode ser utilizada (Tabela 1).

Tabela 1 - Utilidades da cultura da mandioca.

MANDIOCA	Parte Aérea	Folhas	Alimentação animal (triturada) e humana (suplemento)			
		Hastes	Alimentação animal (silagens, fenos e in natura)			
	Raiz	Alimentação humana	Cozidas, fritas, bolos, biscoitos, pães, tortas, roscas, cremes, pudins etc			
		Alimentação animal	Cruas, cozidas ou desidratadas (Farinhas, Raspas e Pellets)			
		Indústria	Amido (Fécula)	Uso alimentício (amido nativo e amido modificado)	Glucose Maltose Gelatinas Féculas	
				Amido Industrial (nativo e modificado)	Adesivos, Têxtil, Papel e celulose, Farmacêutica, explosivos, calçados, tintas, embutidos etc.	
			Amido Fermentado	Uso Humano/ Alimentício	Confeitarias, padarias, Indústria de biscoitos, pães etc.	
			Farinhas	Consumo humano	Farinhas de mesa Farinha panificada	
				Consumo animal	Rações balanceadas	
			Raspas	Farinhas de raspas	Farinhas de mesa Farinha panificada	
Consumo animal	Rações balanceadas					
Álcool	Combustível Desinfetante Bebidas Perfumarias/Farmacêuticas					

Fonte: Adaptado de CONAB, 2013

A farinha tem essencialmente uso alimentar. A fécula e seus produtos derivados são utilizados na alimentação humana, principalmente na preparação de alimentos típicos das regiões norte e nordeste do Brasil. E também, como insumos em diversos ramos industriais. As hastes são também fonte de material de plantio (manivas) para as novas lavouras. A comercialização de mandioca pré-cozida e congelada e na forma de *snack* tem aumentado a cada ano (CONAB, 2013).

Porém, essa cultura vêm sofrendo com a incidência crescente de pragas e doenças que demonstraram ser influenciadas por características ambientais e agrônômicas (TREMACOLDI, 2016). Os pequenos produtores raramente pulverizam pesticidas em plantações de mandioca, pois o controle químico não é economicamente viável. Mas, devido às pressões para intensificar a produção sob paradigmas agrícolas modernos, essa situação tende a mudar (PINTO-ZEVALLOS, et al., 2016).

Assim, para aumentar a sustentabilidade dos sistemas de produção e evitar o uso indiscriminado de inseticidas, no caso dos grandes produtores, métodos de controle de pragas ecologicamente corretas e economicamente acessíveis aos produtores precisam ser desenvolvidas e implementadas.

A cultura da mandioca é atacada por pragas, especialmente insetos da Ordem Hemiptera, como cochonilhas-farinhentas (Hemiptera: Sternorrhyncha: Pseudococcidae) e broca da raiz *Stictococcus vayssierei* (Richard) (Hemiptera: Stictococcidae). A *Erynnis ello* está entre as duzentas espécies de artrópodes que se alimentam da mandioca, sendo que no Brasil é a principal praga desta cultura. Ataques de pragas de importância secundária como a mosca da mandioca (Diptera: Lonchaeidae), ácaros (Acari), Tripes (Thysanoptera: Thripidae) e a mosca branca (Hemiptera: Aleyrodidae), quando ocorrem em altas infestações, também causam danos significativos à cultura (SOARES, et al., 2014).

No primeiro ano de cultivo, dependendo da variedade cultivada, o roçado de mandioca deverá receber uma inspeção detalhada, pois as plantas de 2 a 6 meses após o plantio são mais sensíveis à desfolha, podendo comprometer totalmente a produção dos tubérculos. Plantas adultas (acima de 8 meses) são mais tolerantes, uma vez que diante de desfolhas severas podem se recuperar à custa de energia dos tubérculos, reduzindo a qualidade (quantidade de amido) e a produtividade (FAZOLIN; ESTRELA, 2016). Em todos os casos, o desfolhamento pelas lagartas da *E. ello* expõe o solo a uma maior incidência solar, contribuindo para a emergência de

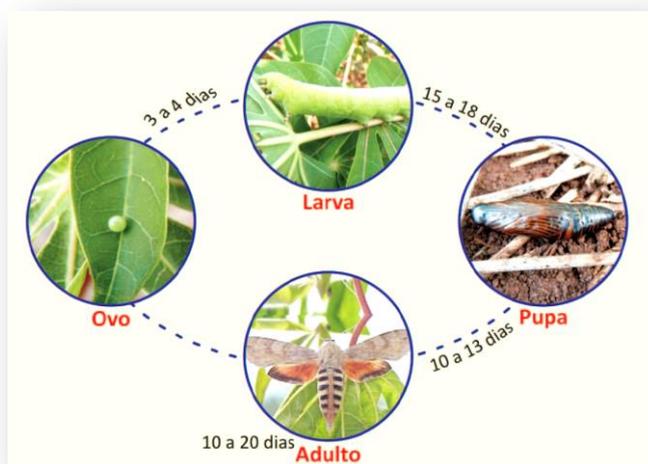
plantas invasoras, que levam à necessidade de realizar capinas adicionais, aumentando assim o custo de produção. A lagarta da *E. ello* ao se alimentar de diferentes plantas pode disseminar bacterioses (FAZOLIN, et al, 2007).

2.3.2 *Erinnyis ello* (L.) (Lepidoptera: Sphingidae)

Acredita-se que *E. ello* seja uma praga originária do Brasil, tendo sido constatada nos estados do Rio Grande do Sul e São Paulo no final do século 19. A aerodinâmica de seu corpo permite que esta praga voe grandes distâncias, alcançando assim uma ampla distribuição geográfica (FAZOLIN, et al., 2007). No Brasil ataques da praga ocorrem, principalmente, durante os períodos de setembro a fevereiro, variando conforme as regiões. Os ataques estão normalmente associados às altas temperaturas e ao início da estação chuvosa (CARVALHO, et al., 2015).

O ciclo biológico da *E. ello* (Fig. 1) varia entre 33 a 55 dias. A duração do período de incubação do ovo é de 3 a 4 dias. A lagarta apresenta 5 ínstaes que duram de 15 a 18 dias. A fase de pré-pupa dura 2 dias, enquanto o período pupal varia de 10 a 13 dias. Os adultos são mariposas de hábitos noturnos e copulam à noite, geralmente 24 horas após a emergência. A oviposição ocorre geralmente de 2 a 3 dias depois da emergência. As fêmeas tendem a viver por um período maior que os machos (FARIAS, et al., 1980).

Figura 1 - Ciclo biológico da *E. ello*.



As lagartas da *E. ello* atacam folhas de qualquer idade (Fig. 2), dando preferência as mais novas, causando destruição de brotações.

Figura 2 - Ataque de pragas da *E. ello* em cultivos de mandioca.



Fonte: Autora, 2017

Depois de completados os cinco instares, as lagartas da *E. ello* descem ao solo e abrigam-se embaixo de restos vegetais, como palhadas e troncos de árvores e arbustos (Fig. 3), onde passam pela fase de pré-pupa. Durante este período, não consomem alimento e apresentam pouca mobilidade.

Figura 3 - Abrigo na fase de pupa da *E. ello*.



Fonte: Autora, 2017

Os adultos da *E. ello* não causam danos às plantas de mandioca, pois se alimentam de néctar por meio do seu aparelho bucal do tipo sugador maxilar (CARVALHO, et al., 1980).

Ovos da mariposa podem ser observados, principalmente, na parte superior das folhas em diferentes cores. Na cor verde (ovos recém-ovipositados), amarelos (ovos viáveis), brancos ou transparentes (eclodidos ou vazios) e na cor preta, que indica estarem parasitados por um inimigo natural mais comum para esta espécie, do gênero *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (SOAERES, et al., 2014). As espécies de *Trichogramma* podem ser facilmente multiplicadas em laboratório e utilizadas em programas de controle biológico, no entanto, são tipicamente lançadas em culturas após várias gerações de criação em laboratório, o que pode reduzir sua eficiência devido à endogamia e à erosão genética (RODRIGUES, et al., 2009). O elevado número de inimigos naturais nos diferentes estágios de desenvolvimento da *E. ello* reduz a sua população, por meio do controle biológico natural. Além disso, o controle biológico também pode ser realizado por Baculovírus, de ocorrência natural, que foi isolado de lagartas mortas em cultivos de mandioca e desde então, passou a ser utilizado e desenvolvido para o controle desta praga, denominado *Baculovirus erinnyis* ou com uso de produtos biológicos comerciais à base de *Bacillus thuringiensis* (Bt) (RINGENBERG, 2014).

Entretanto, é importante o reconhecimento da fase larval predominante na população de lagartas presentes na lavoura, uma vez que para eficácia das medidas de controle é necessário que estas estejam nos três primeiros ínstaras (até 3 cm de comprimento), após esse período as lagartas são mais resistentes ao controle químico e biológico (NORONHA, et al., 2016). Na prática, o controle se torna limitado devido a dificuldade de percepção das lagartas nos primeiros instares, resultando no uso excessivo de pesticidas químicos. Isto provoca problemas relativos à resistência das pragas aos próprios produtos químicos, o aparecimento de pragas secundárias, ressurgência de pragas pela destruição de seus inimigos naturais, efeitos adversos em insetos benéficos, efeitos tóxicos ao homem e em animais e efeitos negativos ao meio ambiente (OLIVEIRA, et al., 2018).

2.4 Experimental

2.4.1 Materiais e métodos

Todos os reagentes utilizados neste trabalho são de grau analítico de pureza. As soluções padrões de alcanos C₇-C₄₀ (SIGMA-ALDRICH), os solventes grau HPLC bidestilados hexano (PANREAC) e o metanol (PANREAC), o adsorvente Porapak™ (etilvinilbenzeno-divinilbenzeno; SIGMA-ALDRICH) e a lã de vidro (DINÂMICA), foram obtidos comercialmente. Toda vidraria utilizada foi previamente limpa com os solventes e colocada para secar em estufa apropriada à 150 °C.

2.4.2 Viabilidade de criação, reprodução e manutenção dos insetos em laboratório

Foram realizadas coletas de ovos, lagartas, pré-pupas e pupas da *E. ello*, em cultivos de mandioca nos municípios de Santa Luzia do Norte, Ibateguara, Arapiraca, São Luís do Quitunde, Messias, Marechal Deodoro, Coruripe e Campo Alegre, do Estado de Alagoas.

Os ovos coletados (Fig. 4) eram contabilizados e individualizados em potes de plástico até a eclosão das lagartas, que, recém eclodidas, se alimentavam do córium do ovo.

Figura 4 - Ovos da espécie *E. ello* coletados a campo e individualizados no LpqRN da UFAL.



As lagartas coletadas a campo (Fig. 5), foram mantidas em baldes adaptados com tecido voil branco até a fase de pupa.

Figura 5 - Lagartas da *E. ello* coletadas a campo.



Fonte: Autora, 2017/2020

As pré pupas eram acondicionadas em papel toalha umedecidos e as pupas eram acomodadas em potes contendo mudas de mandioca e mantidos a temperatura ambiente ($27-29 \pm 2$ °C), simulando o habitat natural (Fig. 6).

Figura 6 - Pré pupas e pupa de *E. ello*.



Fonte: Autora, 2017/2020

A criação foi mantida no insetário, anexo ao LPqRN da UFAL, para o acompanhamento do ciclo de vida (Fig. 7) em condições similares ao ambiente natural dos insetos até a emergência dos adultos.

A praga foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos, e possui número: AC4EE96.

Figura 7 - Criação e manutenção da *E. ello*.



Fonte: Autora, 2017

As lagartas foram alimentadas diariamente com folhas de mandioca, coletadas no Centro de Engenharias e Ciências Agrárias da UFAL (CECA). Após a emergência, os adultos recém emergidos foram transferidos para gaiolas adaptadas, onde era fornecido como alimentação diária uma solução de mel 15% (CARVALHO, 1980) embebidos em chumaços de algodão.

Conforme demonstrado na figura 8, o desenvolvimento do ciclo ocorreu de forma similar ao natural. Adicionalmente, foi observado em ovos, lagartas e pupas a presença de inimigos naturais.

Figura 8 - Viabilidade da criação da *E. ello* em condições de laboratório.



Fonte: Autora, 2017

Para todas as fases de desenvolvimento com incidência da ação desses inimigos naturais foi possível realizar a identificação de parasitoides, predadores e entomopatógenos que fazem o controle biológico natural da *E. ello* no estado de AL.

2.4.3 Sexagem e avaliação preliminar do comportamento de acasalamento

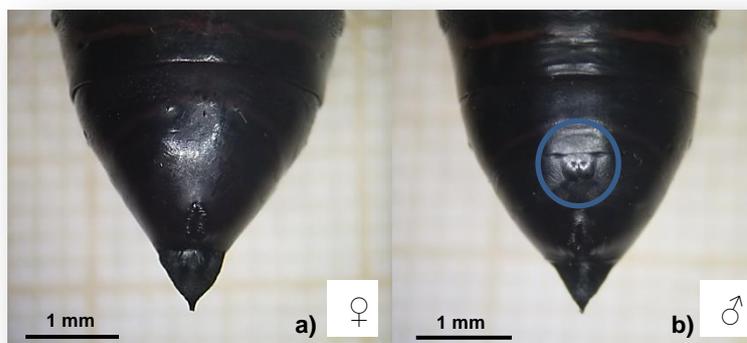
2.4.3.1 Dimorfismo sexual

A sexagem dos adultos foi realizada de acordo com prévias descrições sobre o dimorfismo sexual da *E. ello* (CEBALLOS; ROMERO, 1980).

As pupas provenientes da criação das lagartas foram primeiramente sexadas e separadas de acordo com as características observadas no último segmento

abdominal (Fig. 9). Após a sexagem, as pupas eram acondicionadas em gaiolas à temperatura ambiente($27-29 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$).

Figura 9 - Dimorfismo sexual em pupas da *E. ello*: a) fêmea; b) macho.



Fonte: Autora, 2019

Segundo a descrição de CEBALLOS; ROMERO (1980), as fêmeas geralmente são maiores que os machos, neste sentido, pupas de 50 machos e 50 fêmeas também foram avaliadas morfometricamente, quanto ao comprimento (cm), com um paquímetro (DISMA) (Fig. 10).

Figura 10 - Dimorfismo sexual de *E. ello*: a) variações do tamanho da pupa; b) análise morfométrica.



Fonte: Autora, 2019

Após a emergência dos adultos da *E. ello* (Fig. 11), foi possível confirmar as características sexuais pelas diferenças visuais apresentadas nas asas. Os adultos possuem asas anteriores de cor cinza, alongadas e estreitas, e as posteriores, vermelhas com bordas pretas (EMBRAPA, 2015). Os machos apresentam uma listra negra longitudinal nas asas anteriores (CEBALLOS; ROMERO, 1980).

Figura 11 - Adultos da *E. ello*.



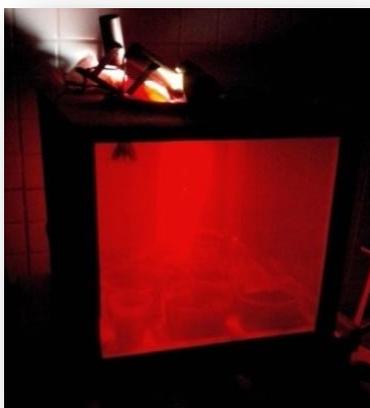
Fonte: Embrapa, 2015

Fêmeas e machos foram separados em diferentes gaiolas e observados diariamente, a fim de monitorar o comportamento e atingir idades de 24h, 48h e 72h para extração das partes do corpo ou eram mantidos juntos para reprodução.

2.4.3.2 Avaliação preliminar do comportamento de chamamento e reprodução

Foram realizadas filmagens (Fig. 12), para registrar o comportamento sexual durante a noite.

Figura 12 - Filmagem realizada para avaliação do comportamento sexual.



Fonte: Autora, 2017

2.4.4 Extração por solvente para avaliação de semioquímicos

Nas mesmas condições de criação, machos e fêmeas virgens de 24h, 48h e 72h de idade foram adormecidos em congelador, por 2 a 3 minutos. Em seguida, foram removidas asas anteriores e posteriores, pernas anteriores, pernas médias e pernas posteriores de cada inseto. As glândulas sexuais das fêmeas foram obtidas por excisão no período de chamamento, aplicando-se pressão ao abdome de cada fêmea até o ovipositor e a glândula serem expostos, assim, as glândulas foram removidas, com tesouras de dissecação fina (Fig 13).

Figura 13 - Extração por solvente, das partes do corpo dos insetos.



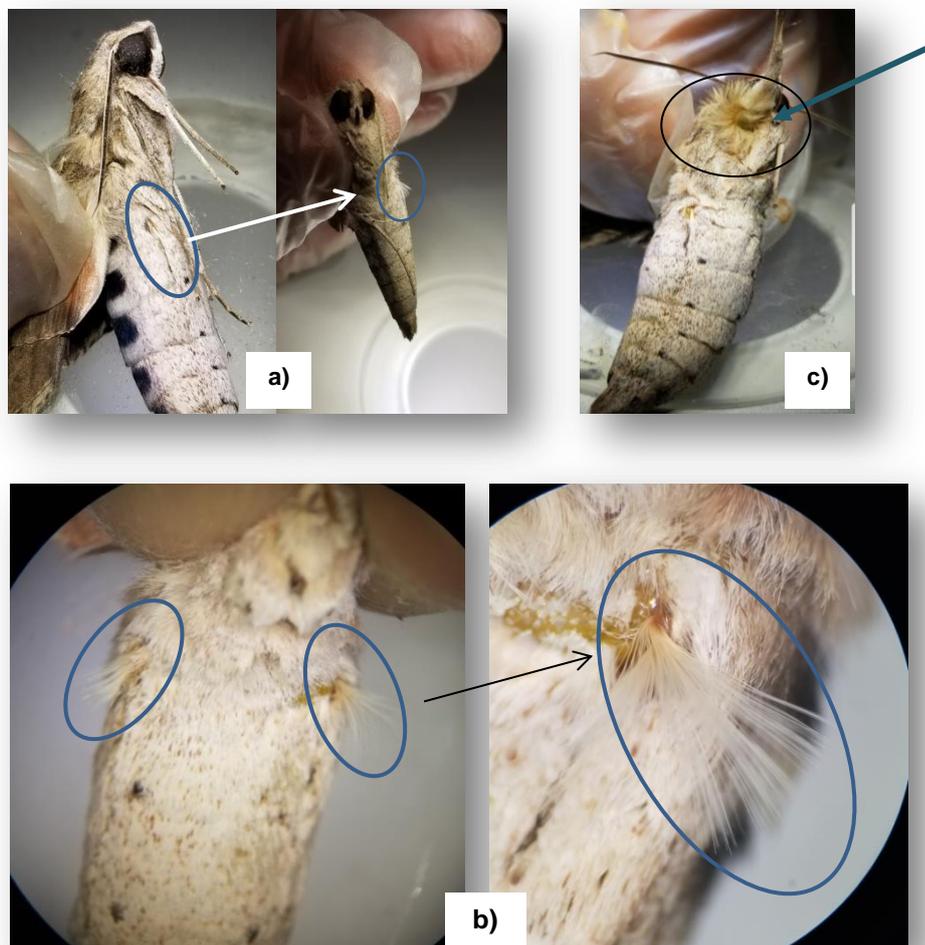
Fonte: Autora, 2017

Todas as partes removidas foram imersas em Hexano (grau HPLC bidestilado), para os quais: de 350 μL asas anterior; 200 μL asas posterior; 500 μL pernas anterior; 500 μL pernas média; 500 μL pernas posterior. Para cada glândula sexual das fêmeas eram utilizados 40 μL do solvente. Além disso, foram realizadas as excisões do abdome completo (Fig. 14a e b) e parte superior do corpo dos machos (Fig. 14c), pois estes apresentavam tufo de pêlos.

Após 20 minutos, o sobrenadante foi filtrado com auxílio de pipetas e lã de vidro, e então os extratos foram transferidos para vial cônico (2 mL), onde eram mantidos sob refrigeração (- 20 °C) para futuras análises químicas e bioensaios.

As antenas (Fig. 15) de ambos sexos também foram reservadas para análises por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Figura 14 - Tufo de pêlos em ambos lados do corpo de machos da *E. ello*: a) e b) laterais do abdome; c) abaixo da perna anterior.



Fonte: Autora, 2020

Figura 15 - Antenas de fêmeas e machos da *E. ello*.



Fonte: Autora, 2017

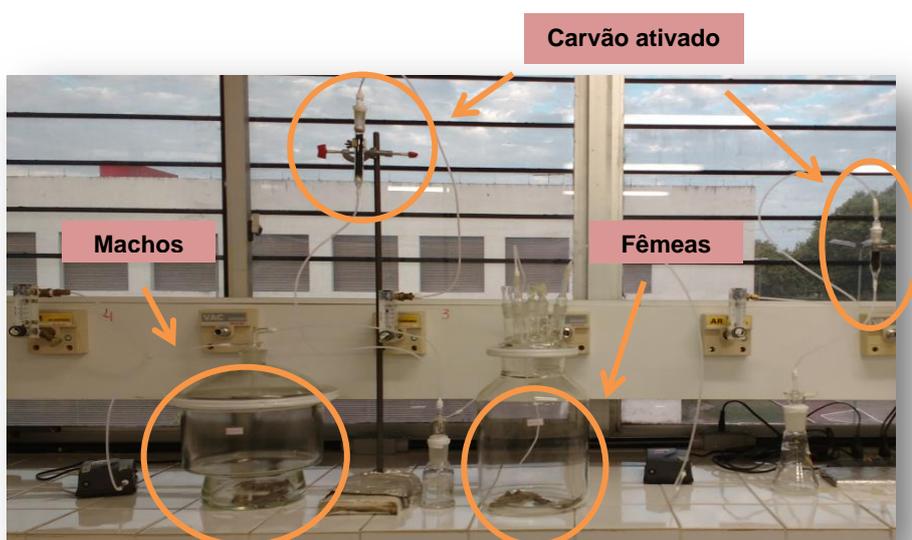
2.4.5 Extração de voláteis por aeração

Para todo processo de aeração foram necessários 4 tubos contendo o adsorvente e lã de vidro nas extremidades. Dos quais: 1 tubo para o branco do sistema (apenas passagem de ar), 1 para verificar a pureza do solvente e do adsorvente (apenas passagem do solvente no adsorvente), 1 para coleta dos voláteis de fêmeas e 1 para coleta dos voláteis dos machos. Inicialmente foi realizada a limpeza do carvão ativado, mantendo-se os tubos à 250 °C sob um fluxo de nitrogênio, durante 12 horas. O Porapak (adsorvente), após limpo com solvente, foi mantido aquecido à 130°C por 2 horas, em seguida pesou-se 50 mg (para cada tubo) e transferiu-se para os tubo contendo pequena de quantidade de lã de vidro.

Adicionalmente, colocou-se lã de vidro na extremidade de cada tubo. Condicionou-se o adsorvente passando aproximadamente 4 mL de hexano bidestilado (grau HPLC) e conectou-se a uma linha de gás (ar sintético) por 12 horas, sob aquecimento a 130 °C.

Na entrada do sistema (Fig. 16), foi adaptada uma coluna contendo o carvão ativado, para que o ar fosse pré-filtrado. A um fluxo de 400 mL/min, os voláteis foram arrastados até a extremidade oposta e, então, adsorvidos no Porapak e a dessorção foi realizada utilizando-se 500 µL de hexano bidestilado (grau HPLC) para cada tubo.

Figura 16 - Sistema de aeração para coleta de compostos voláteis de *E. ello*.



Após o tempo adequado, interrompeu-se o vácuo e os tubos contendo os compostos adsorvidos foram desconectados do sistema. Todos os voláteis emitidos pelos insetos, o que inclui os possíveis feromônios, foram coletados através desta técnica. As montagens da aeração foram realizadas no final da tarde (17h) e os voláteis foram recolhidos na manhã seguinte. Foi utilizada a mesma quantidade de fêmeas e machos virgens, com 48 h de idade.

2.4.6 Análises dos extratos obtidos

Os extratos foram analisados por Cromatografia Gasosa (CG) em um Cromatógrafo Shimadzu GC-2010 acoplado a um detector de ionização em chama (DIC). A cromatografia foi realizada em coluna capilar RTX-1 (30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 μ m Restek[®]).

Para as análises dos voláteis de extratos de aeração, a temperatura do injetor foi de 250°C e hidrogênio foi utilizado como gás de arraste. A programação da temperatura da coluna foi de 50 °C inicial, com velocidade de aquecimento de 8 °C por 5 minutos até atingir 280 °C. E injeções em modo “split”.

Para as análises dos voláteis de extratos do corpo do inseto, a temperatura do injetor foi de 250°C e hidrogênio foi utilizado como gás de arraste. A programação da temperatura da coluna foi de 120 °C inicial, com velocidade de aquecimento de 8 °C por 15 minutos até atingir 300 °C. E injeções em modo “splitless”.

Os Espectros de Massas foram obtidos através de análises dos extratos por um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (CG-EM) modelo Shimadzu QP-2010 Ultra. A coluna capilar usada foi a NST-05 (30m x 0,25mm d.i. x 0,25 μ m Nano Separation Technology[®]). O hélio foi usado como gás de arraste com fluxo de 1,10 mL/min. O espectrômetro de massas operou com ionização eletrônica (70 eV) em modo de varredura entre 35 a 400 m/z. A fonte de íons se manteve constante a 200 °C e a interface a 250 °C. As análises dos cromatogramas e cromatogramas de íons totais (TIC) foram realizadas mediante o programa CGsolution e CGMSsolution. Os espectros de massas obtidos foram analisados e comparados aos do banco de dados do instituto nacional de padrões e tecnologia (NIST08 e NIST08s) e da biblioteca wiley229 (BABUSHOK et al., 2007).

O Índice de Retenção Linear (LRI, *Linear Retention Index*) foi determinado injetando-se no sistema CG-EM e/ou CG-FID, operando nas condições descritas

acima, 1 μL de uma mistura de padrão de n-Alcanos (Sigma-Aldrich C₇-C₄₀). Os tempos de retenção obtidos no cromatograma foram usados como padrão externo de referência para o cálculo do LRI, bem como os tempos de retenção de cada pico da amostra de interesse. O LRI de cada componente foi calculado conforme a Equação 1 (VIEGAS, et al., 2007).

$$LRI = 100 * \left(\frac{t_c - t_n}{t_{n+1} - t_n} \right) + n$$

Eq. 1 - índice de retenção linear (adaptado de VIEGAS, et al., 2007)

Os valores de LRI calculados foram comparados com valores encontrados na literatura para colunas de mesma polaridade, sendo elas: DB-5; HP-5; SPB-5; CP-SIL-8; OV-73; ULTRA-2; BP-5; 007-2; RSL-200; SE-54; SE-52. Assim: t_c corresponde ao tempo de retenção do composto de interesse; t_{n+1} ao tempo de retenção do hidrocarboneto posterior; t_n ao número de carbonos do hidrocarboneto anterior e $n = n + 1$.

2.4.7 Eletroantenografia (EAG)

As antenas de cada inseto foram seccionadas na base do escapo (Fig. 17), bem como os últimos flagelômeros da ponta de cada antena, com auxílio de microtesoura, e então foram posicionadas entre dois eletrodos de prata, com as extremidades imersas em gel condutor de eletricidade (Signa gel; Parker Laboratories, Inc., Fairfield, NJ).

Figura 17 - Seccionamento da antena de macho da *E. ello*.



Fonte: Autora, 2017/2019

As respostas analógicas, em milivolts, foram obtidas, amplificadas e processadas com um controlador de aquisição de dados (IDAC-4, Syntech Hilversum, Holanda) e registradas no software EAGPro versão 1.1, 2007 (Syntech®). Cinco repetições da mesma amostra foram realizadas.

2.4.7.1 Eletroantenografia (EAG) – “Puff”

Esta técnica foi utilizada com o intuito de avaliar se os insetos respondem aos seus próprios extratos e também aos do sexo oposto, indicando, neste caso, o tipo de feromônio, de agregação ou sexual, respectivamente. Para isto, foi realizada a estatística usando a ANOVA no Software R, para os estímulos gerados nas antenas de machos, pelos extratos de glândulas abdominais de fêmeas. Assim, foi possível determinar se houve diferença significativa entre os estímulos dos extratos e aqueles gerados com os estímulos apenas do solvente.

Através deste teste, obtivemos o valor da estatística F utilizada para realizar o teste de hipótese (F value) e o p-valor ($Pr(>F)$). Se o p-valor é abaixo do nível de significância estabelecido, 0.05 (5%), então existe pelo menos uma diferença significativa entre os dois grupos (extratos e solvente).

2.4.7.2 Cromatografia gasosa acoplada a eletroantenografia (CG-EAG)

Os experimentos do CG-EAG foram realizados a fim de registrar as respostas de *E. ello* aos estímulos dos extratos (fonte de odor) que continham as substâncias extraídas dos insetos. Para isto, as antenas de machos e fêmeas foram testadas em replicatas. Os compostos eram injetados no CG-EAG (Shimadzu-GC2010) equipado com colunas RTX-5 (30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 μ m; Restek®, Bellefonte, PA, USA), em volumes de 2 ou 4 μ L.

Para as análises dos voláteis de extratos de aeração, a temperatura do injetor foi de 250°C e hidrogênio foi utilizado como gás de arraste. A programação da temperatura da coluna foi de 50 °C inicial, com velocidade de aquecimento de 8 °C por 5 minutos até atingir 280 °C. E injeções em modo “split”.

Para as análises dos voláteis de extratos do corpo do inseto, a temperatura do injetor foi de 250°C e hidrogênio foi utilizado como gás de arraste. A programação

da temperatura da coluna foi de 120 °C inicial, com velocidade de aquecimento de 8 °C por 15 minutos até atingir 300 °C. E injeções em modo “splitless”.

As respostas das antenas de machos e fêmeas da *E. ello* foram registradas utilizando o software GcEad32 versão 4.6.

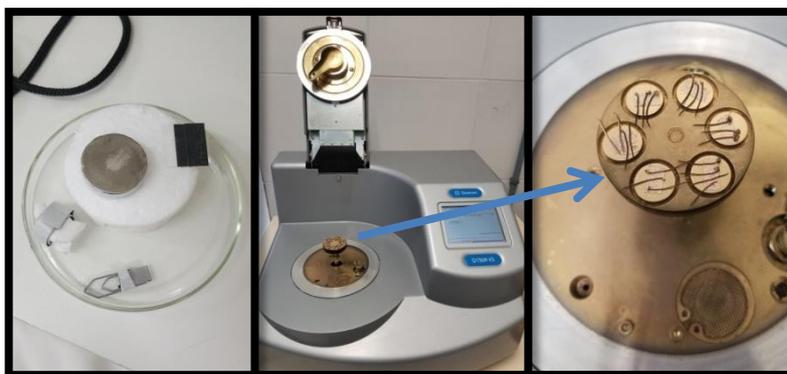
2.4.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Microscopia eletrônica de varredura das antenas foi realizada no Laboratório de análise instrumental do departamento de química do Instituto Federal de Alagoas (IFAL), utilizando-se 10 antenas de ambos sexos da *E. ello*.

As antenas foram previamente desidratadas pela imersão das mesmas em glutaraldeído a 2 % em tampão de fosfato (0,1M pH 7) durante 2 minutos. Em seguida, as antenas foram imersas em soluções de etanol diluído em água destilada para concentrações respectivas de 50, 70, 80 e 90 %, permanecendo imersas durante 2 minutos em cada solução. Subsequentemente as antenas foram acondicionadas em etanol absoluto (99,3 %).

Para a realização das análises, as antenas foram cuidadosamente retiradas do etanol, com auxílio de um pincel fino e foram mantidas por 1h no vácuo em dessecador com sílica, para remoção da umidade. Em seguida, as antenas foram colocadas sobre fita adesiva elétrica de sulfito de carbono, em suportes de alumínio. Após serem removidas do dessecador as antenas foram metalizadas em um metalizador (Q150R ES, Quoron[®]) (Fig. 18). A corrente durante o processo de metalização com alvo de ouro foi de 45 mA durante 4 minutos.

Figura 18 - Montagem e metalização das antenas de *E. ello*.



As antenas foram analisadas usando um microscópio eletrônico de varredura (INCAx-act, Oxford-instruments®) (Fig. 19) a 20 ou 10kV. A medição das antenas foram realizadas utilizando o software Pixel Pro 2.1.

Figura 19 - Microscópio com amostras metalizadas para análise.



Fonte: Autora, 2019

2.5 Resultados e discussão

2.5.1 Bioensaio comportamental, reprodução e viabilidade de criação em laboratório

A diferenciação sexual dos insetos foi visualmente confirmada após a emergência dos adultos. Uma listra negra longitudinal nas asas anteriores dos machos foi observada e com isso, machos e fêmeas virgens recém emergidos, separadamente, foram transferidos para gaiolas formando-se um ou mais casais, assim como gaiolas contendo pelo menos um macho a mais.

Desde o primeiro dia de idade (24 h), machos e fêmeas iniciam voos e/ou caminham na gaiola a partir das 17 h. A partir desse horário ocorre a alimentação por meio do aparelho bucal (espirotromba), pela sucção da solução de mel a 15 % oferecida em chumaços de algodão, no topo da gaiola (Fig. 20).

Figura 20 - Adulto de *E. ello* alimentando-se de solução de mel a 15 %.



Fonte: Autora, 2017

A literatura registra que de forma geral são as mariposas fêmeas que produzem e liberam feromônios durante um período definido do dia ou até o

acasalamento. Esse comportamento é chamado de “chamamento”, que consiste na exposição do ovipositor pela fêmea, exibindo a glândula sexual, permitindo a liberação dos compostos semi-voláteis (FOSTER, et al., 2020). Este comportamento foi observado em fêmeas de *E. ello*, que apresentaram comportamento de chamamento contínuo com exposição e contração do ovipositor, a partir das 19:40 h. Durante esta exposição, os machos, aproximavam-se em direção à fêmea. Entretanto, não foi possível observar cópula, nos dias em que ocorreu o bioensaio. As filmagens realizadas com luz vermelha também registrou o mesmo comportamento observado presencialmente, mas não registrou cópula.

Ocasionalmente, em uma das trocas de alimentação dos adultos, foi observado um casal copulando, aproximadamente às 10 h (Fig. 21). Observamos também cópula às 15:30 h e este mesmo casal permaneceu unido até às 19 h (Figs. 22 e 23). Nos dois dias seguintes, foram recolhidos 350 ovos e lagartas recém eclodidas (Fig. 24) distribuídos entre as folhas, telas e os fundos de madeira da gaiola, que continha 3 fêmeas e 4 machos.

De acordo com os padrões comportamentais apresentados pelos adultos da *E. ello*, com as fêmeas contraindo o abdome e expondo a estrutura glândular, é possível admitir que o acasalamento é interposto por um feromônio sexual, sugerindo que as fêmeas liberam uma substância química para atrair os machos.

Figura 21 - Cópula de adultos da *E. ello* observada pela manhã.



Fonte: Autora, 2020

Figura 22 - Cópula de adultos da *E. ello* observada no final da tarde.



Fonte: Autora, 2017

Figura 23 - Cópula de adultos da *E. ello* observada no início da noite.



Fonte: Autora, 2017

Embora acredite-se que a exposição e retração da glândula sexual permita que uma fêmea emita e pare de liberar feromônio, respectivamente, ALLISON; CARDÉ (2016) relataram que as mariposas fêmeas podem promover a liberação de feromônios de forma contínua ou intermitente durante o período sexualmente ativo.

Em nenhum dos bioensaios presenciais ou filmados conseguiu-se observar início e fim de cópula, no entanto foram avaliados padrões de comportamento do acasalamento, como: não houve cópula e/ou oviposição em gaiolas que continham a mesma quantidade de machos e fêmeas; não houve cópula e/ou oviposição em gaiolas que continham apenas um casal; não houve cópula e/ou oviposição em gaiolas que não continham mudas de mandioca.

Figura 24 - Ovos e lagartas recém eclodidas da *E. ello*, após cópula em insetário, na Ufal.



Fonte: Autora, 2017

Os insetos provenientes desta geração foram alimentados com folhas de mandioca e a criação foi mantida até a emergência dos adultos.

Foi observado que a partir da segunda geração da criação em laboratório, as lagartas apresentavam coloração acinzentada e/ou preta e deixavam de se alimentar. Em decorrência disso, no período do segundo e/ou terceiro instar ocorreu a morte de todas as lagartas (Fig 25).

Figura 25 - Lagartas inviáveis da *E. ello*, após cópula e eclosão em insetário, na Ufal.



Fonte: Autora, 2017

Não ficou claro se a causa da morte foi consequência de uma geração menos resistente ou se as folhas coletadas estavam contaminadas com inseticidas, então, para evitar esse tipo de risco, mudas de mandioca foram plantadas no insetário do Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais da UFAL (Fig. 26).

Figura 26 - Mandioca plantada no insetário.



Fonte: Autora, 2020

Na tabela 2 estão apresentados os dados de coletas e viabilidade, de acordo com o local e período da obtenção dos insetos.

Tabela 2 - Viabilidade da *E. ello* em condições de laboratório.

Dados de coletas						Viabilidade		
Local da coleta Alagoas	Data da coleta	Ovos coletados	Ovos parasitados	Lagartas coletadas	Pupas/ pré- pupas coletadas	Ovos inviáveis	Lagartas	Pupas (♀/♂)
Santa Luzia do Norte	jan/16	27	-	-	-	-	24	12/10
Ibateguara	mar/16	108	95	-	-	-	13	07/05
UFAL/LPqRN	1ª Geração*	20	-	-	-	-	20	13/07
UFAL/LPqRN	2ª Geração*	15	-	-	-	-	15	10/05
UFAL/LPqRN	3ª Geração*	13	-	-	-	-	13	08/05
Arapiraca	set/16	32	05	-	-	-	27	17/10
Arapiraca	out/16	50	-	-	-	33	17	10/07
São Luís do Quitunde	nov/16	-	-	205	-	-	173	173
Messias	jan/17	16	7	-	-	9	-	-
Ibateguara	mar/17	57	30	-	-	9	18	08/10
Coruripe	mar/17	19	-	-	-	19	-	-
Coruripe	mar/17	-	-	951	-	-	748	521
UFAL/LPqRN	1ª Geração*	350	-	-	-	128	222	-
Coruripe	mai/17	11	1	409	102	8	132	70/62
Coruripe	mai/17	53	9	1	2	22	22	10/15
Campo Alegre	set/17	21	9	4	-	12	14	6/8

Rio Largo	Jan/2019	41	6	-	-	20	21	10/11
Coruripe	Fev/19	32	7	78	-	26	60	40/27
Coruripe	Fev/19	397	-	5	-	252	140	70/70
Marechal Deodoro	Out/19	24	21	2	-	40	5	3/2
Marechal Deodoro	01, 05 e 12 de Nov/19	98	41	9	-	61	66	31
Marechal Deodoro	21 e 26 de Nov/19	83	39	2	-	82	21	7/11
Marechal Deodoro	03 e 08 de Dez/19	34	25	-	-	51	8	4/4
Arapiraca	Jan/2020	51	-	-	-	20	31	15/16
Marechal Deodoro	Mar/2020	40	33	3	-	33	10	4/6
Coruripe	Mar/2020	108	51	Não foi contado	-	Não foi contado	197	108/97

*Geração proveniente da criação em laboratório

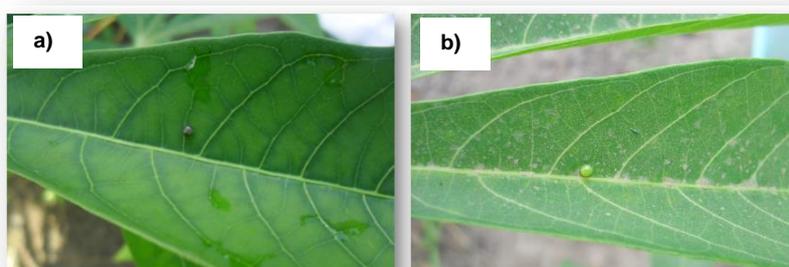
Fonte: Autora, 2017/2020

2.5.2 Controle biológico da *E. ello* durante a pesquisa

As coletas das diferentes fases de desenvolvimento de *E. ello* foram realizadas em áreas de cultivo de diferentes municípios de Alagoas. Ao longo da pesquisa, foram observados diferentes agentes biológicos atuando como inimigos naturais de ovos, lagartas e pupas, tanto predando, como parasitando ou causando doenças nos insetos.

Inicialmente observamos o parasitismo na coleta dos ovos, que são facilmente diferenciados pela cor escura (Fig. 27).

Figura 27 - Ovos de *E. ello*: a) parasitado; b) sadio.



Fonte: DOS SANTOS, 2020

O desenvolvimento do parasita foi observado até a emergência, para confirmar a identidade do mesmo (Fig. 28).

Figura 28 - Exposição de pupas de *Trichogramma* spp. em ovos de *E. ello*.



Fonte: DOS SANTOS, 2020

Os ovos do hospedeiro tornam-se escuros quando ocorre o parasitismo por *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae), no início do terceiro ínstar deste parasita, que possui três instares larvais. A mudança de coloração ocorre em decorrência da deposição de grânulos de sais de urato próximos à superfície do córion, sendo esta uma característica marcante de parasitismo por *Trichogramma* spp. Os adultos de *Trichogramma* spp. foram confirmados (Fig. 29) de acordo com suas características morfológicas e a sexagem foi realizada pela diferenciação das antenas, pois as fêmeas possuem antenas clavada e os machos possuem antenas plumosas (CÔNSOLI, et al., 1999; SOUZA, 2011).

Figura 29 - Emergência e sexagem de *Trichogramma* spp. a partir de ovos de *E. ello*.



Fonte: DOS SANTOS, 2020

Os ovos parasitados com o segundo parasitóide identificado, eram visualmente diferenciados, por apresentar manchas alaranjadas e tornar-se transparente a medida do seu desenvolvimento (Fig. 30).

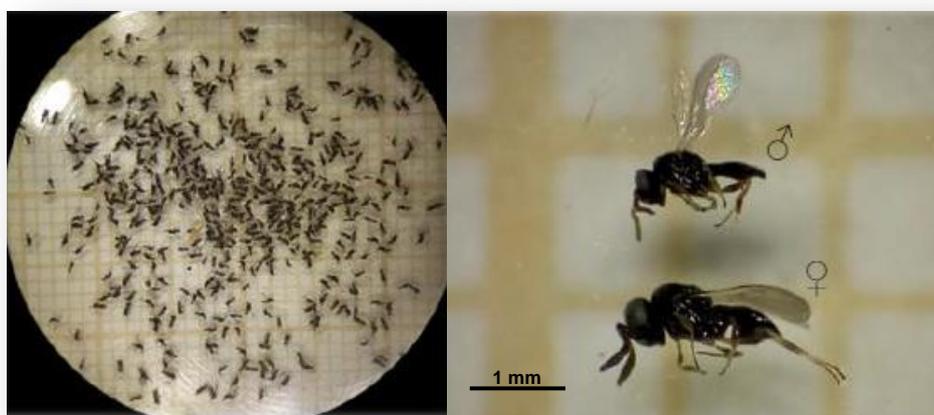
Figura 30 - Ovos de *E. ello* parasitado.



Fonte: DOS SANTOS, 2020

Após a emergência dos adultos foi possível identificar a microvespa parasitoide, *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Scelionidae) (Fig. 31). Este parasitoide foi descrito por William Harris Ashmead em 1893 e pertence à família Platygasteridae. *Telenomus* sp. é conhecido principalmente por ser parasitoide de ovos de *Tibraca limbativentris* e *Euschistus heros*, percevejos do colmo-do-arroz e marrom da soja, respectivamente (CUNHA, et al., 2015).

Figura 31 - Adultos de *Telenomus* sp. obtidos de ovos de *E. ello* parasitados por esta espécie.



Fonte: DOS SANTOS, 2020

O terceiro parasitoide não foi identificado, mas foi percebido em *E. ello*, pelos pontinhos brancos apresentados nas regiões da cabeça e tórax das lagartas, essa é uma característica de moscas parasitoides da família Tachinidae (Fig. 32).

Figura 32 - Ovos de parasitoides da família Tachinidae em lagarta de *E. ello*.



Fonte: DOS SANTOS, 2020

As larvas do parasitoide desenvolvem-se internamente e permite o desenvolvimento do hospedeiro. Esse comportamento é conhecido por endoparasitoides cenobiontes e é possível observar a saída das larvas do hospedeiro para pupar externamente (Fig. 33). A família Tachinidae é uma das mais diversificadas e ecologicamente importantes na Ordem Diptera.

Figura 33 - Pupas e adulto dos taquinídeos parasitóides de larva-pupa de *E. ello*.



Fonte: DOS SANTOS, 2020; Autora, 2019

O quarto parasitoide identificado, foi visualmente encontrado em pupas de *E. ello*, pela percepção dos espiráculos da pupa do taquinídeo, na mesma posição em todas as pupas de *E. ello* (Fig. 34).

Figura 34 - Pupa de taquinídeo parasitoide de larva-pupa de *E. ello*.



Fonte: DOS SANTOS, 2020; Autora, 2019

Esse parasitoide também apresentou-se como endoparasitoide cenoibionte, no entanto, apenas uma larva do parasitoide/hospedeiro por pupa de *E. ello* foi observado, além disso, o parasitoide manteve-se dentro do hospedeiro até a fase de pupa.

A larva do taquinídeo parasitoide foi retirada intencionalmente da pupa de *E. ello* e foi possível observar os espiráculos visualizados na fase de pupa (Fig. 35).

Figura 35 - Larva do taquinídeo, retirada intencionalmente da pupa de *E. ello*.



Fonte: DOS SANTOS, 2020; Autora, 2019

Após a emergência do taquinídeo da pupa de *E. ello*, os adultos do parasitoide foi identificado como *Belvosia bicincta* Robineau-Desvoidy (Diptera: Tachinidae) (Fig. 36).

Figura 36 - Adulto de taquinídeo parasitoide de larva-pupa de *E. ello*, identificado como *Belvosia bicincta* (Tachinidae).



Fonte: DOS SANTOS, 2020; Autora, 2019

As espécies de Robineau-Desvoidy (Diptera: Tachinidae) (Arnaud 1978) também já são conhecidas por parasitar lagartas e pupas de mariposas das famílias Hesperiiidae, Noctuidae, Saturniidae e Sphingidae (DE SOUZA, et al., 2014).

Durante a pesquisa, algumas lagartas de *E. ello* morreram dependuradas no tecido dos baldes, possivelmente por uma forma de controle por bactéria entomopatogênica ainda não identificada.

2.5.3 Dimorfismo sexual

2.5.3.1 Análise morfométrica

Análise morfométrica foi realizada utilizando-se pupas de *E. ello* ($N=50$) com machos e fêmeas coletados a campo, no dia 05 de março de 2020, na reação de Coruripe/AL. A média dos resultados não mostrou diferença significativa no tamanho das pupas dos insetos, diferente da descrição realizada por CEBALLOS; ROMERO (1980), e está apresentada abaixo:

N° de pupas	Fêmeas (\bar{x})	Machos (\bar{x})
50	4,9 cm \pm 0,27	4,8 cm \pm 0,29

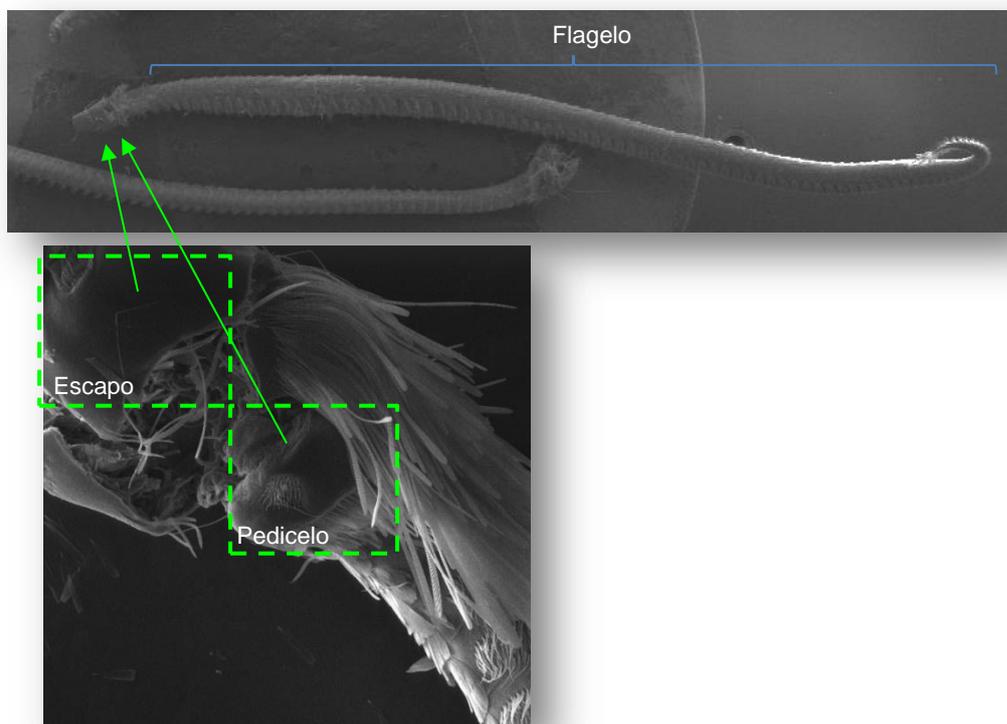
2.5.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A MEV foi realizada para ambos sexos de *E. ello* e a análise das imagens revelou diferenças em sensilas do tipo tricóide (Tc) nas antenas de machos e fêmeas, e de sensilas aurículas (Ac), presentes apenas em antenas de fêmeas.

As antenas de *E. ello* são filiformes e segmentadas, constituídas por: escapo, pedicelo e flagelo (Fig. 37).

Os tipos morfológicos e distribuição das sensilas olfativas aparentam ser particulares de cada grupo de insetos.

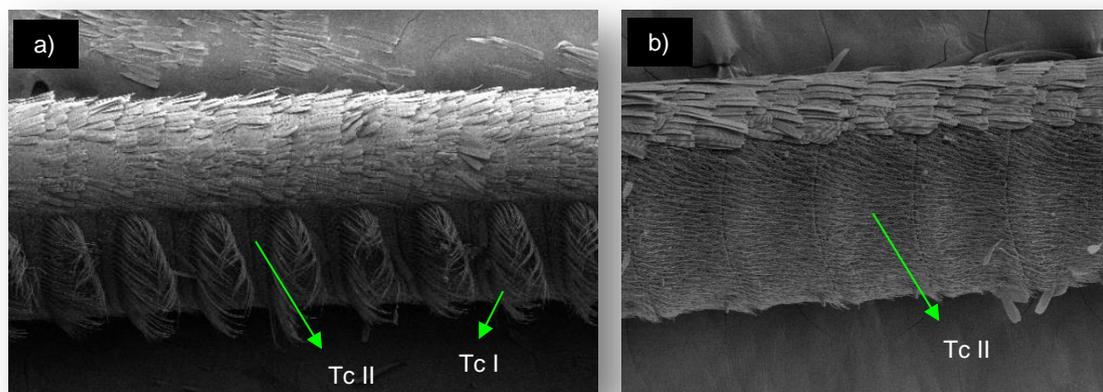
Figura 37 - MEV de antenas de machos de *E. ello*.



Fonte: Autora, 2019

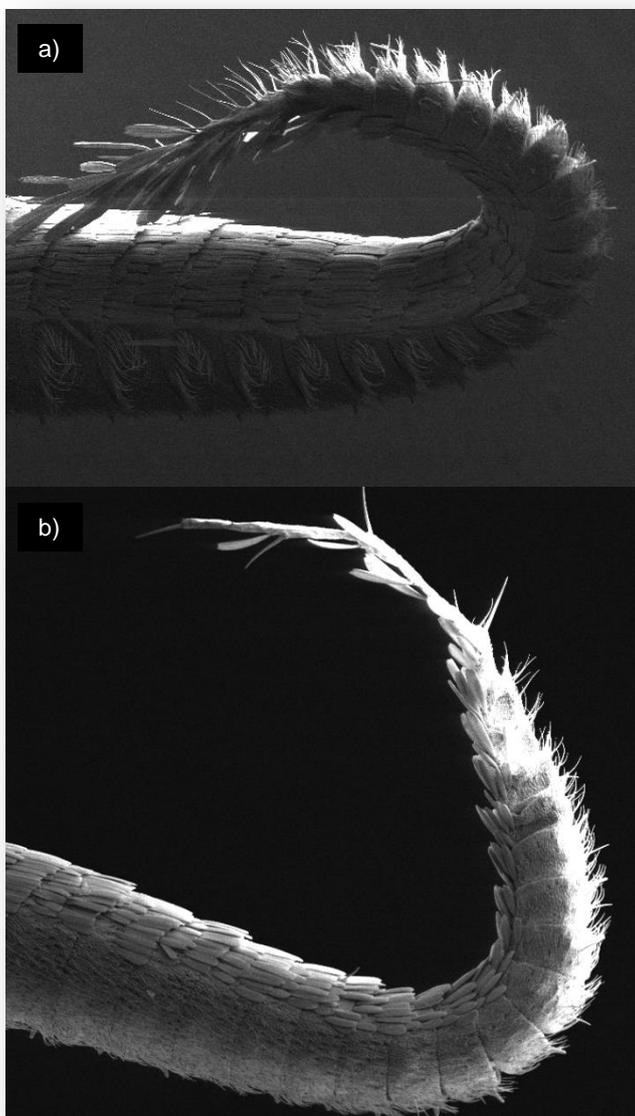
As sensilas do tipo tricóide (Tc) encontradas em antenas de ambos sexos de *E. ello*, no entanto, apenas os machos apresentam sensilas do tipo tricóide longa (Tc I) e estão presentes em todo comprimento do flagelo, em cada antenômero das antenas (Figs. 38a e 39a). Já nas antenas das fêmeas foram observadas apenas sensilas do tipo tricóide curta (Tc II) (Figs. 38b e 39b).

Figura 38 - Diferenciação das sensilas do tipo tricóide (Tc) presentes em cada antenômero do flagelo em antenas de *E. ello*: a) macho; b) fêmea.



Fonte: Autora, 2019/2020

Figura 39 - Diferenciação das sensilas do tipo tricóide (Tc) presentes em cada antenômero do flageloem antenas de *E. ello*: a) macho; b) fêmea.



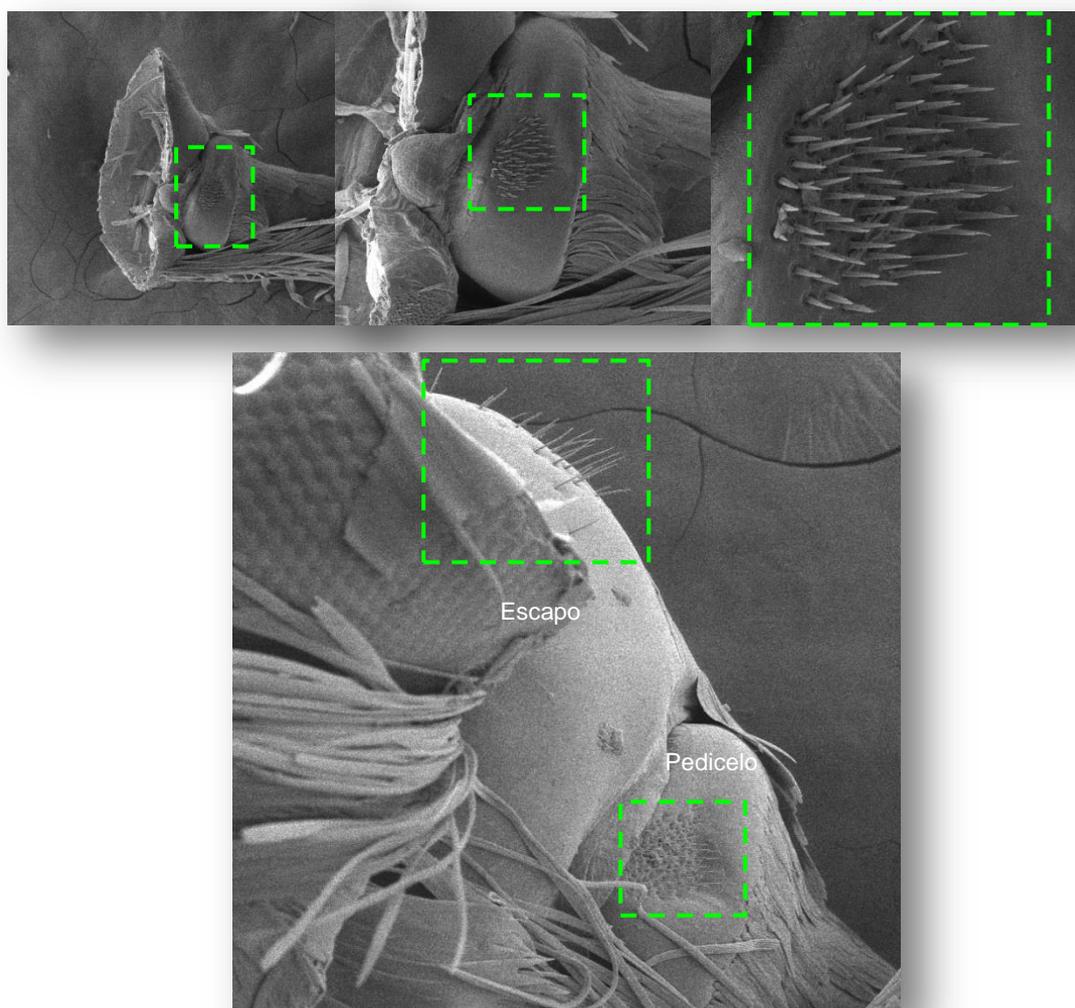
Fonte: Autora, 2019/2020

Esta diferenciação também foi observada por ZHENG e colaboradores, em 2014, no estudo de sensilas nas antenas de *Catocala remissa* Staudinger (Lepidoptera Noctuidae). É frequentemente associado que as sensilas do tipo tricóide longa (Tc I), nas antenas de mariposas machos, são receptores para feromônios sexuais de mariposas fêmeas (JEONG, et al., 2020).

Além das tricoides, cinco tipos de sensilas foram igualmente identificadas nas antenas de *E. ello*, sendo elas: Cerdas ou pêlos de Böhm (Böhm's bristles - BB); Caéticas (Sc); Coelocônicas (SCo); Estilocônicas (SSt) e Esquamiforme (SSq).

Em *E. ello* os pêlos ou cerdas de Böhm (Böhm's bristles - Bb) (Fig. 40) estão localizados nas articulações intersegmentares (pedicelo) e no escapo. Possui característica do tipo espinha e cutícula lisa. Este tipo de sensilas são mecanorreceptoras, capazes de perceber a posição e os movimentos das antenas (ZUO, et al., 2015).

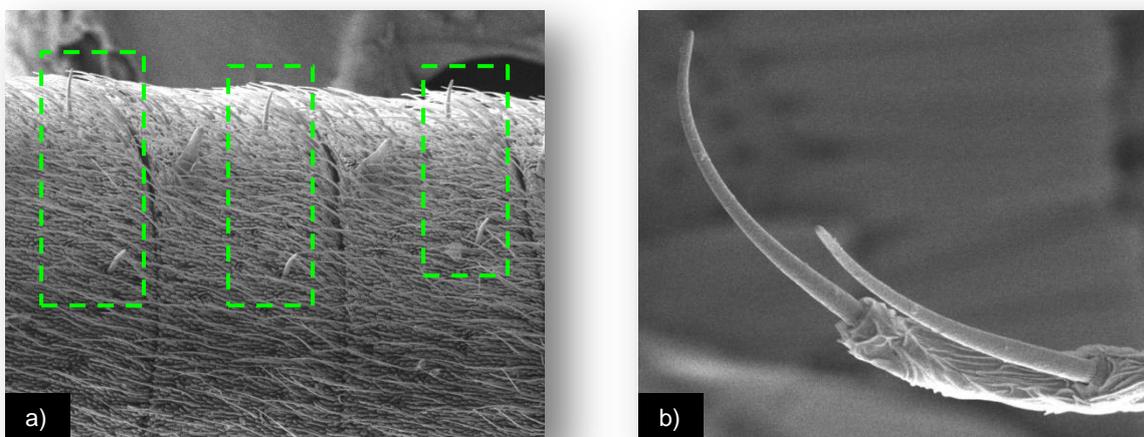
Figura 40 - MEV do intersegmento entre a cabeça e a base do escapo da antena de *E. ello*, com a presença das cerdas de Böhm's bristles (Bb).



Fonte: Autora, 2019/2020

As sensilla caéticas (Sc) (Fig. 41) apresentaram-se largas na parte basal, arredondadas em suas superfícies e ligeiramente curvadas na parte distal. Foi encontrada aos pares, em cada segmento flagelar até o segmento apical e estava presente nas antenas de ambos os sexos.

Figura 41 - MEV da antena de *E. ello*, com a presença de sensilas caéticas: a) aos pares, em cada segmento flagelar; b) segmento apical.

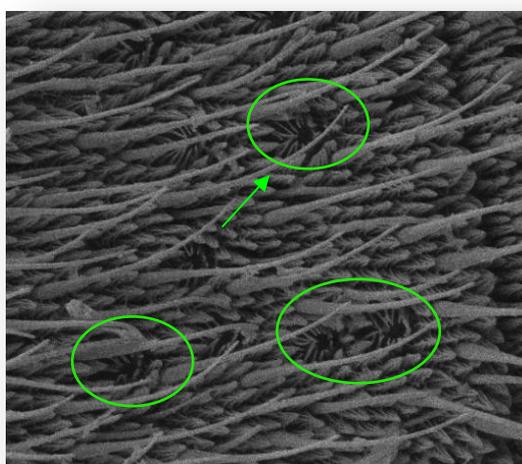


Fonte: Autora, 2019/2020

A sensilla caética têm sido descrita como sensilla tátil e palpável, podendo também funcionar como propriocepção (reconhecendo a localização espacial do corpo), além de que estar envolvida na percepção da planta hospedeira e local de oviposição (NDOMO-MOUALEU, et al., 2014).

As sensillas coelocônicas (Fig. 42) possuem, em geral, dois subtipos: com ou sem espinhos. As com espinhos são encontrados em Lepidoptera, e numerosas espécies de mariposas (ZHENG, et al., 2014).

Figura 42 - MEV da antena de *E. ello*, com a presença de sensilas coelocônicas.

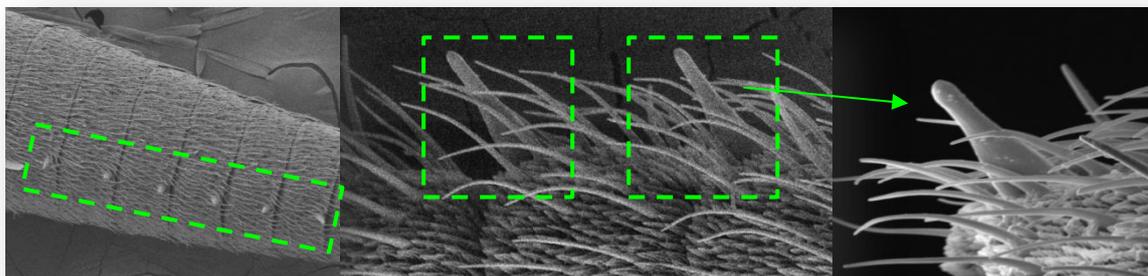


Fonte: Autora, 2019/2020

As funções dessas sensillas coelocônicas têm sido atribuídas a termorrecepção e detecção de voláteis de plantas (DA SILVA, et al., 2019). Em *E. ello*, estão presentes em ambos sexos, como uma depressão cuticular, cercada por aproximadamente 10 a 12 espinhos cuticulares. Essa característica foi descrita por CALLAHAN em 1975.

As sensillas estilocônicas foram encontradas em antenas de ambos sexos em *E. ello*, distribuídas ao longo do antenômero e apresentadas em cada segmento flagelar. Estas sensilas são caracterizadas por possuir parede cuticular lisa e serem estruturas curtas e robustas semelhantes a pequenos cones (Fig. 43). Estas sensilas são comumente observadas em antenas de lepidópteros e estão associadas as funções de detecção em mudança de umidade e variação de temperatura no ambiente (DA SILVA, et al., 2019).

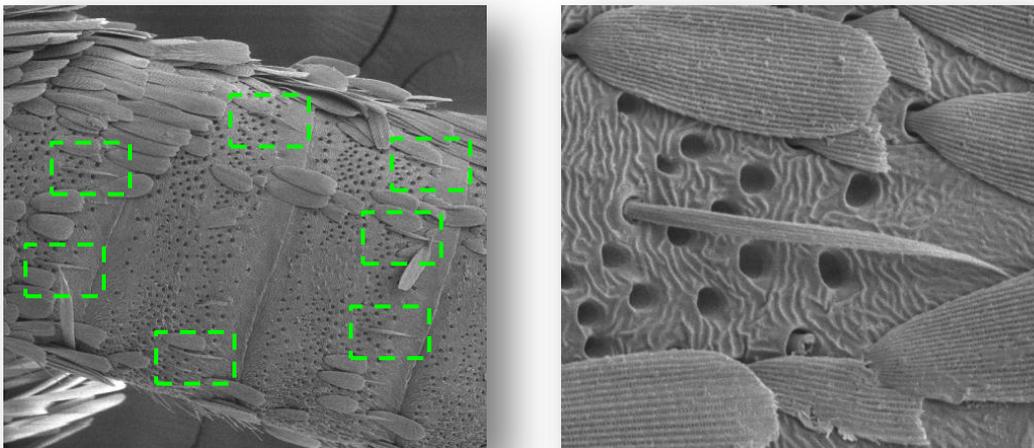
Figura 43 - MEV da antena de *E. ello*, com a presença de sensilas estilocônicas.



Fonte: Autora, 2019/2020

Foram localizadas pelo menos duas sensilas do tipo esquamiforme (SSq) nos segmentos dos antenômeros em ambos sexos de *E. ello*, entre as escamas (Fig. 44). A função dessa sensila ainda não está bem definida, mas sua morfologia e localização são similares àquelas já reportadas em outras espécies de mariposas (BAWIN et al., 2017). Entretanto, FAUCHEUX (1999) sugeriu que este tipo de sensila poderia ter função mecanorreceptora, estando envolvida na percepção dos movimentos do ar.

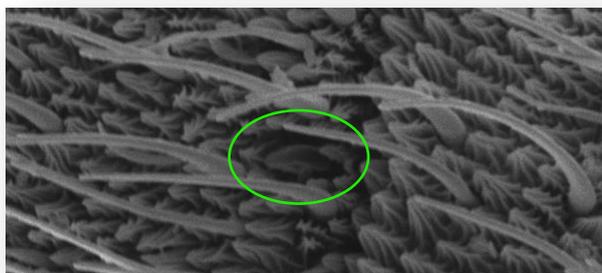
Figura 44 - MEV da antena de *E. ello*, com a presença de sensilas esquamiforme.



Fonte: Autora, 2019/2020

As sensilas aurículas foram encontradas apenas em antenas de fêmeas de *E. ello* e são caracterizadas por apresentarem superfície côncava interna e levemente inclinada para cima (Fig. 45).

Figura 45 - MEV da antena de *E. ello*, com a presença de sensila aurícula.



Fonte: Autora, 2019/2020

Este formato é semelhante ao reportado por ANSEBO e colaboradores (2005), assemelhando-se com orelhas de coelho e são consideradas nas mariposas, como as principais receptoras dos voláteis das plantas. Na criação de insetos, observamos a necessidade da planta para estimular a oviposição.

Na tabela 3 estão resumidas as funções normalmente observadas e atribuídas para cada tipo de sensila que observamos em *E. ello*.

Tabela 3 - Funções atribuídas as sensilas das antenas de insetos.

Sensilas	Função atribuída
Tricóide longa	Receptoras dos feromônios sexuais (JEONG, et al., 2020)
Böhm's bristles	Mecanorreceptoras (ZUO, et al., 2015)
Caética	Propriocepção; percepção da planta hospedeira e local de oviposição (NDOMO-MOUALEU, et al., 2014)
Coelocônicas	Termorrecepção e detecção de voláteis de plantas (ZHENG, et al., 2014).
Estilocônicas	Mudança de umidade e variação de temperatura ambiente (DA SILVA, et al., 2019)
Esquamiforme	Mecanorreceptoras (FAUCHEUX, 1999)
Aurículas	Receptoras dos voláteis de plantas (ANSEBO, et. al., 2005)

As medições (μm) das antenas foram realizadas para cada 3 ou 5 sensilas individuais do mesmo tipo, de pelo menos 5 insetos do mesmo sexo (Tabela 4). Em função disso, não foi possível aplicar Teste *t* de Student para determinar diferenças significativas de dimorfismo sexual, mas foram obtidas as médias e o erro padrão das médias de cada tipo de sensila de ambos sexos do inseto.

Tabela 4 - Média e erro padrão da média do comprimento e largura basal das sensilas presente nas antenas de fêmeas e machos de *E. ello*, 1758 (Lepidoptera: Spingidae).

Sensilas	N	Fêmeas (♀)		Machos (♂)	
		Comprimento (μm)	Largura basal (μm)	Comprimento (μm)	Largura basal (μm)
Tricóide curta	5	40,66 \pm 0,46	3,49 \pm 0,14	46,36 \pm 0,34	3,36 \pm 0,04
Böhm's bristles	3	25,44 \pm 0,41	2,56 \pm 0,19	22,77 \pm 0,28	2,84 \pm 0,23
Caética	5	66,75 \pm 0,70	4,73 \pm 0,19	62,57 \pm 0,80	4,49 \pm 0,19
Coelocônicas*	5	8,17 \pm 0,12	3,51 \pm 0,12	-	-
Estilocônicas	3	27,47 \pm 0,17	14,76 \pm 0,42	35,73 \pm 0,94	17,12 \pm 0,62
Esquamiforme	3	67,38 \pm 0,62	3,06 \pm 0,23	66,42 \pm 0,64	3,57 \pm 0,14
Aurículas*	5	8,24 \pm 0,19	2,78 \pm 0,10	-	-

Coelocônicas* não foi possível calcular este tipo de sensila em machos de *E. ello*

Aurículas* este tipo de sensila não foi observado em antenas de machos de *E. ello*

Não foi possível realizar as medições das sensilas do tipo Tricóide longa

2.5.4 Avaliação química por cromatografia gasosa e respostas eletroantenográficas

2.5.4.1 Análises cromatográficas do extrato das partes do corpo do inseto

A análise dos cromatogramas de extratos das partes do corpo de fêmeas e machos de *E. ello* por CG-DIC indicou a diferenciação dos picos para possíveis compostos exclusivos de cada sexo. Pela superposição dos cromatogramas,

observou-se que de forma geral, os extratos de machos possuem mais picos exclusivos em relação aos extratos de fêmeas (Tabela 5).

O LRI foi calculado para estes picos e comparados com os reportados na literatura, entretanto a análise por CG-EM foi realizada apenas para o extrato das asas anteriores de machos, que apresentou atividade em antenas de fêmeas, no bioensaio por CG-EAG.

Tabela 5 - Diferenciação dos picos para possíveis compostos exclusivos de cada sexo de *E. ello*.

Extratos das partes do corpo	N° de picos exclusivos	
	Fêmeas (♀)	Machos (♂)
Asas anterior	5	9
Asas posterior	12	5
Pernas anterior	4	7
Pernas média	4	9
Pernas posterior	-	2

Os extratos das glândulas sexuais de fêmeas, do abdome e do primeiro segmento do abdome dos machos também foram analisados.

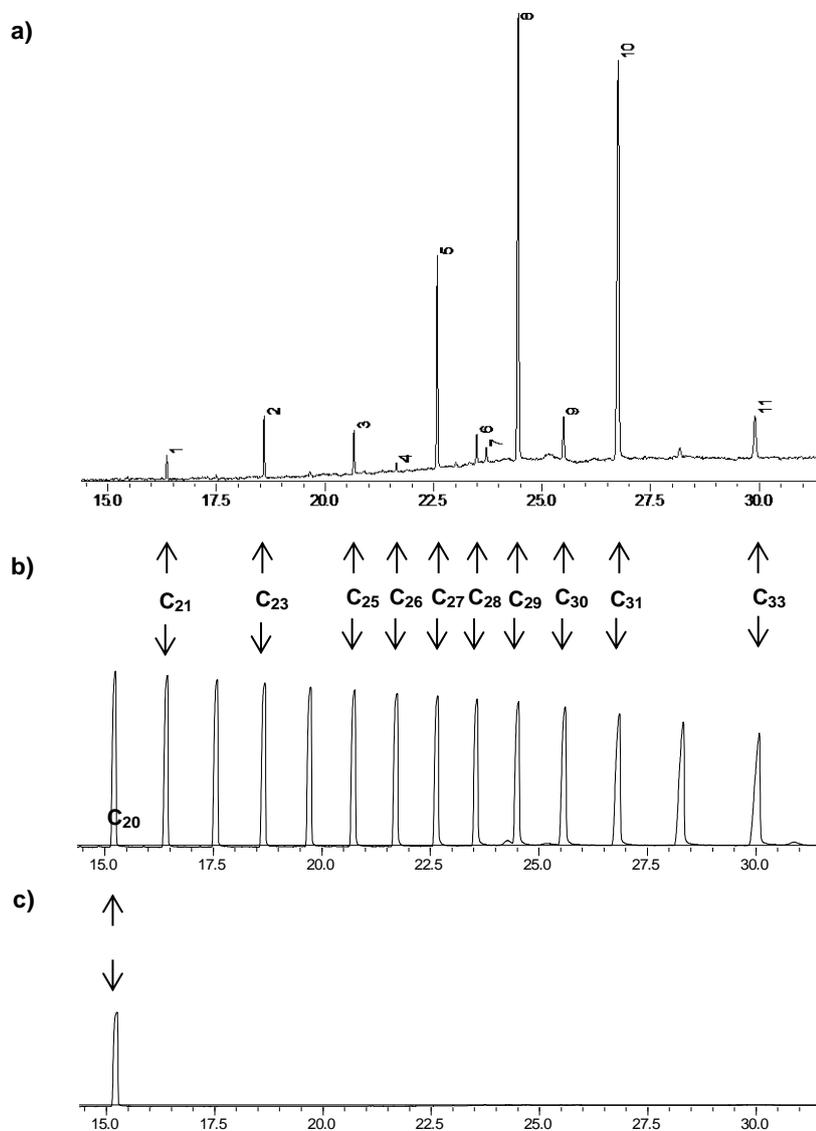
Os bioensaios realizados por CG-EAG apresentaram atividade para três dos extratos testados. Foi possível observar respostas das antenas de machos quando os estímulos eram os extratos de glândulas sexuais de fêmeas e respostas das antenas de fêmeas quando os estímulos eram extratos do abdome e de asas anteriores de machos.

2.5.4.2 Análises cromatográficas e EAG

A análise do cromatograma dos extratos das glândulas sexuais de fêmeas foi realizada com os extratos de fêmeas com idades de 24, 48 e 72 horas, separadamente. Como os cromatogramas não apresentaram diferenças entre si e para obtenção de maior quantidade do extrato, foram reunidas glândulas sexuais de fêmeas com idades entre 24 a 72 horas para a obtenção de novos extratos.

A análise do cromatograma dos compostos obtidos por CG-DIC indicou a presença de onze compostos (Fig. 46a).

Figura 46 - Cromatogramas obtidos por CG-EM: a) extrato hexânico de glândulas sexuais em fêmeas de *E. ello*; b) padrões de alcanos C₇-C₄₀; c) padrão Eicosano (C₂₀).



O LRI foi calculado do cromatograma obtido dos padrões de alcanos C₇-C₄₀ para cada pico e comparado ao reportado na base de dados do Pherobase.

A análise do cromatograma indicou que estes constituintes são na sua maioria hidrocarbonetos lineares em consulta a base de dados do Pherobase. A comparação dos cromatogramas do extrato das glândulas sexuais com o cromatograma dos padrões de alcanos C₇-C₄₀ confirma que dez compostos do extrato das glândulas sexuais são hidrocarbonetos, pela superposição dos sinais (Fig.46b). O padrão Eicosano (C₂₀) foi utilizado para fazer a distinção dos átomos de

carbonos (Fig. 46c). O pico sete, com LRI igual 2840 parece ter de 28 a 29 átomos de carbonos. Quando comparado com a base de dados Pherobase, não foram encontradas indicações de compostos para colunas de mesma polaridade usada neste trabalho. A biblioteca do EM indicou como possível estrutura, o esqualeno, mas a nossa análise não confirma a estrutura.

Com esses resultados, foram realizadas buscas de feromônios registrados para a família da espécie de estudo (Sphingidae. Ordem: Lepidoptera), mas não foram encontrados relatos ou registros de compostos característicos de hidrocarbonetos como feromônio para esta família. No caso da família Sphingidae os feromônios descritos na base de dados do Pherobase, são em geral, aldeídos de C₁₆-C₁₈. Entretanto, sabe-se que os insetos da ordem Lepidóptera apresentam uma diversidade de feromônios, que incluem hidrocarbonetos de cadeias longas (THOMAZINI, 2009).

A partir dos resultados dessa análise, foi possível identificar a composição química dos compostos extraídos de glândulas sexuais de fêmeas da *E. ello* e bioensaios de eletroantenografia foram conduzidos para avaliação da bioatividade. A tabela 6 apresenta a composição desses compostos.

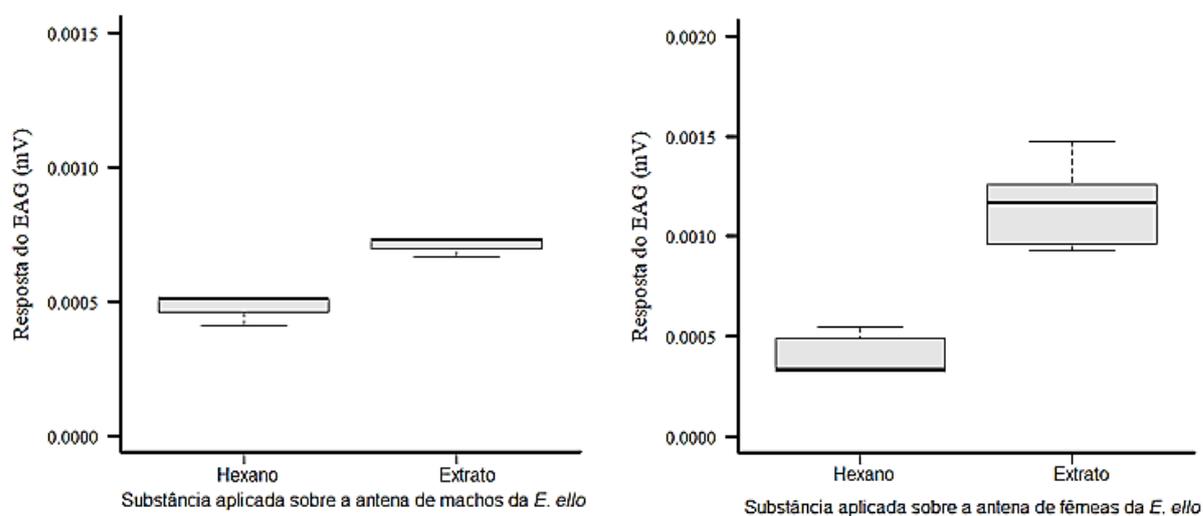
Tabela 6 - Composição química do extrato hexânico de glândulas sexuais em fêmeas de *E. ello*.

Nº do pico	Padrões comerciais C ₇ -C ₄₀	Compostos confirmados	Composto analisado por EM
1	Heneicosano	Heneicosano	
2	Tricosano	Tricosano	
3	Pentacosano	Pentacosano	
4	Hexacosano	Hexacosano	
5	Heptacosano	Heptacosano	
6	Octacosano	Octacosano	
7	-		Esqualeno
8	Nonacosano	Nonacosano	
9	Triacotano	Triacotano	
10	Hentriacotano	Hentriacotano	
11	Tritriacotano	Tritriacotano	

O bioensaio por eletroantenografia “*puff*” foi realizado e os valores de p obtidos das antenas de machos e fêmeas foram 0.0002633 e 0.004727,

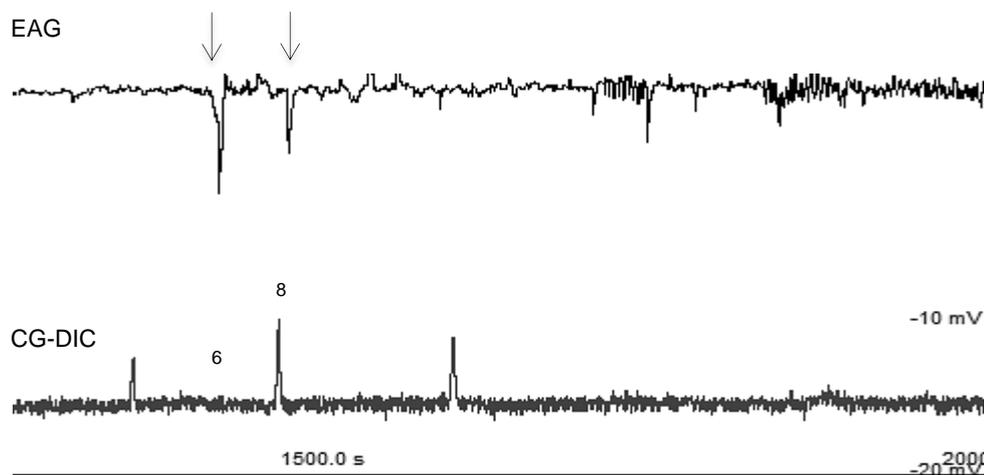
respectivamente, onde $P < 0.05$ em ambos. Através dos gráficos apresentados na figura 47, ficou claro que fêmeas e machos responderam ao estímulo provocados por extratos de glândulas sexuais de fêmeas, e foram significativamente diferentes ao estímulo provocado pelo solvente.

Figura 47 - Gráfico bloxpot de respostas eletroantegráficas da *E. ello*.



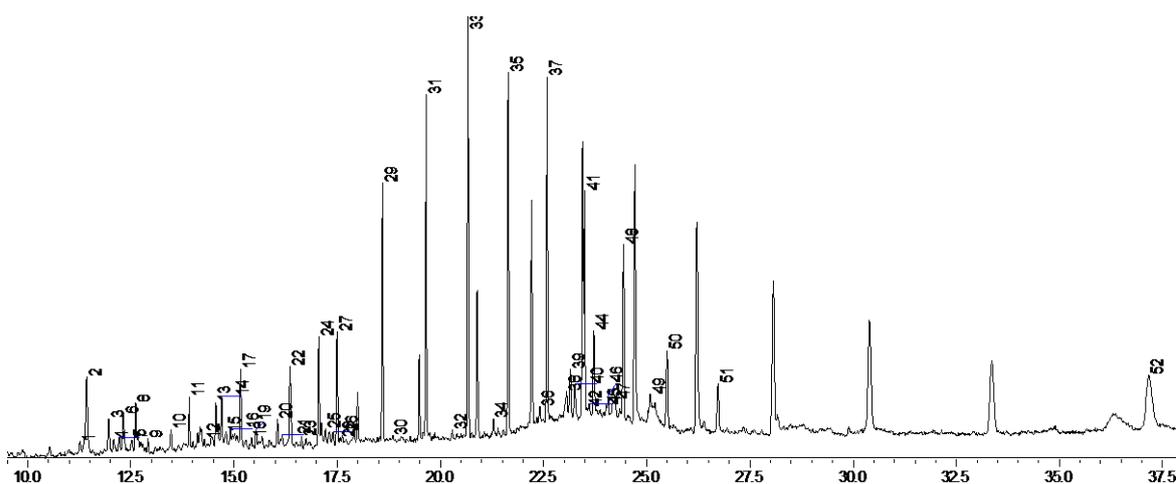
No bioensaio por CG-EAG, as antenas de machos apresentaram respostas para 2 compostos do extrato de glândulas sexuais de fêmeas. De acordo com a resposta eletroantegráfica e a análise por CG-EM, os compostos ativos (Fig. 48) são os hidrocarbonetos lineares, octacosano e nonacosano.

Figura 48 - Expansão da resposta eletroantegráfica da antena de macho de *E. ello* para o extrato de glândulas sexuais da *E. ello*.



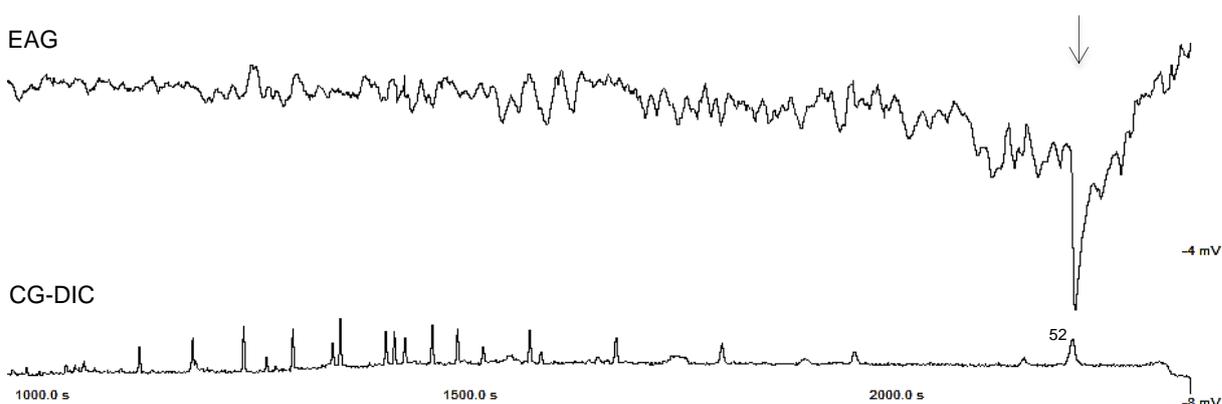
A análise do cromatograma do extrato do abdome de machos (região do tufo de pêlos) por CG-DIC, indicou a presença de 52 compostos (Fig. 49). O LRI foi calculado para os picos mais abundantes e comparados com os reportados na literatura, no entanto a análise por CG-EM foi realizada apenas para o pico com atividade em antenas de fêmeas, por CG-EAG (Fig. 50).

Figura 49 - Cromatograma do extrato do abdômen de machos de *E. ello*.



A análise por CG-EM do composto ativo não nos permitiu propor uma estrutura para esse composto ativo.

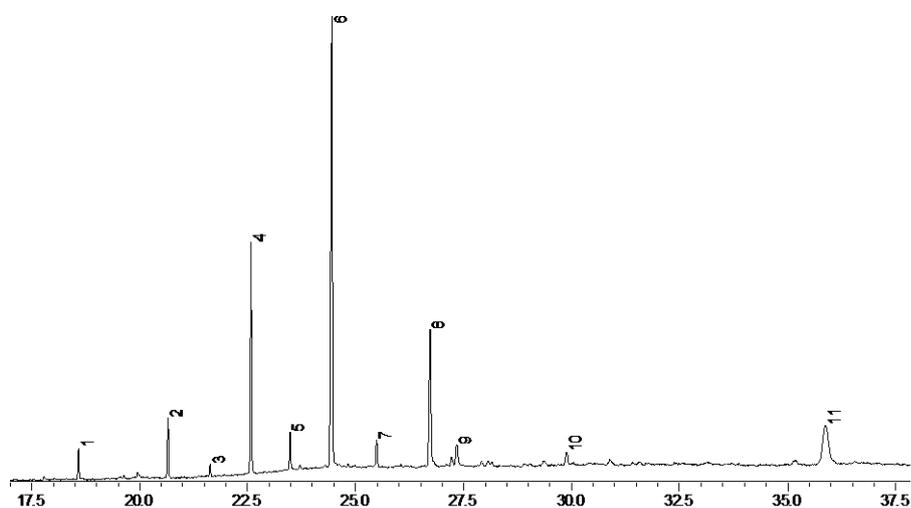
Figura 50 - Resposta eletroantegráfica da antena de fêmea de *E. ello* para o extrato do abdome de machos de *E. ello*.



Quando comparado com a base de dados Pherobase, o LRI calculado para o pico 52, indicou dois possíveis compostos, sendo um deles o 5,15-Dimetilpentatriacontano e o outro 11,15,21-Trimetilpentatriacontano. O composto 5,15-Dimetilpentatriacontano está registrado na base de dados Pherobase, descrito como composto utilizado no sistema de comunicação química da espécie *Phaedon confinis* (Latreille, 1829) (Coleoptera, Chrysomelidae). A função do composto 11,15,21-Trimetilpentatriacontano não está descrita. Entretanto, a análise por CG-EM não indica essas estruturas.

A análise do cromatograma do extrato das asas anteriores de machos, dos compostos obtidos por CG-DIC, indicou a presença de onze compostos (Fig. 51). O LRI foi calculado comparando com o cromatograma obtido nas mesmas condições para os padrões C₇-C₄₀ para cada pico e comparado ao reportado na base de dados Pherobase.

Figura 51 - Cromatograma do extrato das asas anteriores dos machos de *E. ello*.



A análise do cromatograma indicou que estes constituintes são, na sua maioria, hidrocarbonetos lineares em consulta a base de dados Pherobase. A comparação do cromatograma do extrato com o cromatograma dos padrões de alcanos C₇-C₄₀ confirma, pela superposição dos sinais, nove dos onze compostos do extrato das asas anteriores, são hidrocarbonetos lineares (Tabela 7).

O LRI foi calculado para os outros dois picos e quando comparado com a base de dados Pherobase, foi indicado o composto 11-Metilhentriacontano para o

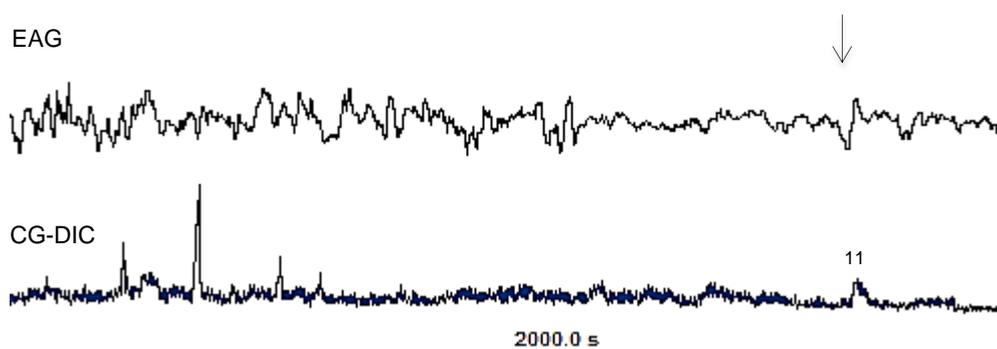
pico 9 e o composto octadecenoato de hexadecenila para o pico 11. Entretanto, a análise por CG-EM desses compostos não indica essas estruturas.

Tabela 7 - Composição química do extrato das asas superiores dos machos de *E. ello*.

Nº do pico	Padrões comerciais C ₇ -C ₄₀	Compostos confirmados
1	Tricosano	Tricosano
2	Pentacosano	Pentacosano
3	Hexacosano	Hexacosano
4	Heptacosano	Heptacosano
5	Octacosano	Octacosano
6	Nonacosano	Nonacosano
7	Triacotano	Triacotano
8	Hentriacotano	Hentriacotano
9	-	-
10	Tritriacotano	Tritriacotano
11	-	-

No bioensaio por CG-EAG, as antenas de fêmeas apresentaram respostas para 1 composto do extrato das asas anteriores de machos. De acordo com o LRI calculado, o composto ativo (Fig. 52) deve ser o composto octadecenoato de hexadecenila.

Figura 52 - Resposta eletroantenográfica da antena de fêmea de *E. ello* para o extrato de asas anteriores de machos de *E. ello*.

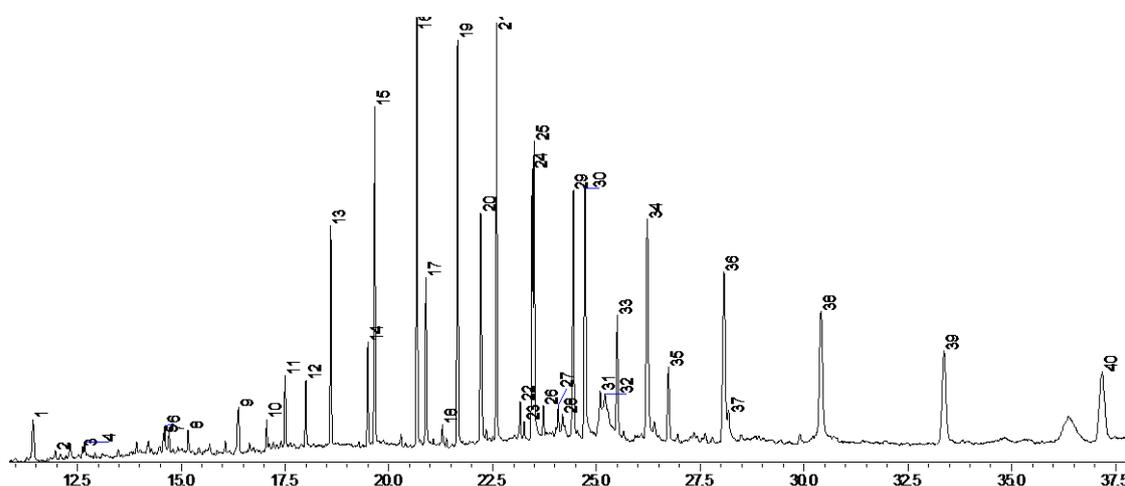


Este composto também está registrado na base de dados Pherobase, descrito como composto utilizado no sistema de comunicação química das espécies da

ordem Hymenoptera: *Bombus filchnerae* (Vogt, 1908) (Hymenoptera, Apidae); *Bombus terrestris* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera, Apidae); *Nannotrigona testaceicornis* (Lepeletier, 1836) (Hymenoptera, Meliponini); *Plebeia droryana*, (Friese, 1900) (Hymenoptera, Apidae).

A análise do cromatograma dos extratos do primeiro segmento do abdome dos machos, que apresenta o tufo de pêlos, por CG-DIC, indicou a presença de 40 compostos (Fig. 53).

Figura 53 - Cromatograma do extrato do primeiro segmento do abdome dos machos de *E. ello*.



O LRI foi calculado para os picos e comparados com os reportados na literatura, no entanto a análise por CG-EM não foi realizada, pois o extrato não apresentou atividade em antenas de fêmeas, por CG-EAG.

2.5.4.3 Análises cromatográficas dos voláteis por aeração

Os extratos de fêmeas e machos virgens com 48 h de idade foram analisados inicialmente por CG-FID. O LRI foi calculado do cromatograma obtido dos padrões de alcanos C₇-C₄₀ para cada pico e comparado ao reportado na base de dados do Pherobase. A análise do cromatograma também indicou hidrocarbonetos como constituintes das amostras, em consulta a base de dados do Pherobase. A comparação dos cromatogramas dos extratos de aeração com o cromatograma dos

padrões de alcanos C₇-C₄₀ confirma a presença hidrocarbonetos em seis picos do extrato de fêmeas (Fig. 54), mas apenas um pico do extrato de machos (Fig. 55).

Para os demais picos, foi realizada análise do CG-EM que indicou as estruturas descritas, na tabela 8 para o extrato de fêmeas e na tabela 9 para o extrato de machos. A coinjeção dos padrões dessas estruturas é necessária para confirmar os compostos.

Figura 54 - Cromatograma obtido por CG-EM dos voláteis de fêmeas de *E. ello*.

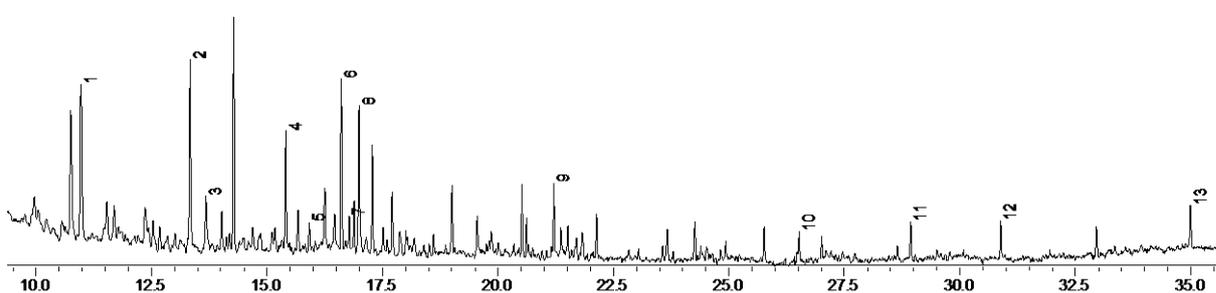


Tabela 8 - Composição química dos voláteis de aeração de fêmeas de *E. ello*.

Nº do pico	Padrões comerciais C ₇ -C ₄₀	Compostos confirmados	Compostos analisados por EM
1	Decano	Decano	
2	Undecano	Undecano	
3	-		Metilciclodeceno
4	Dodecano	Dodecano	
5	-		2-butil-1,1,3-trimetilciclohexano
6	-		2,5-dimetilacetofenona*
7	-		2,3,7-Trimetiloctano
8	-		3,4-dimetilacetofenona*
9	Nonadecano	Nonadecano	
10	-		Ácido Hexadecanóico
11	-		Ácido Octadecanóico
12	Tricosano	Tricosano	
13	Octacosano	Octacosano	

*Podem ser esses compostos ou isômeros

Figura 55 - Cromatograma obtido por CG-EM dos voláteis de machos de *E. ello*.

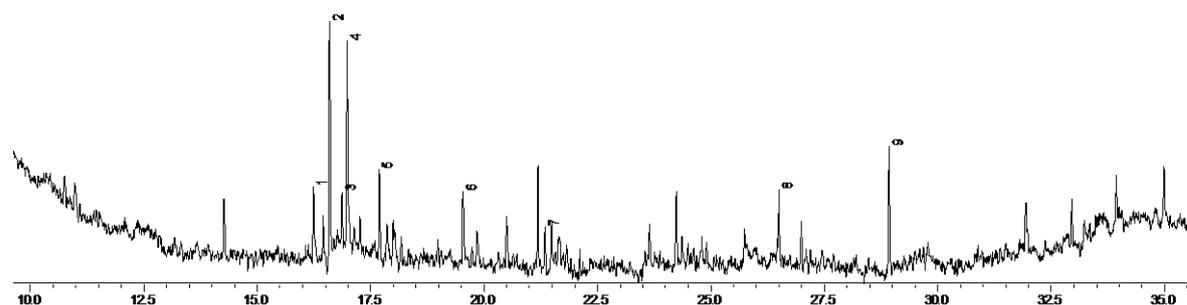


Tabela 9 - Composição química dos voláteis de aeração de fêmeas de *E. ello*.

Nº do pico	Padrões comerciais C ₇ -C ₄₀	Compostos confirmados	Compostos não confirmados
1	-		4-(1-Hidroxietil)-benzaldeído
2	-		2,5-dimetilacetofenona*
3	-		4,6-dimetil-dodecano
4	-		3,4-dimetilacetofenona*
5	-		4,6-dimetil-dodecano
6	-		p-Acetilacetofenona*
7	Nonadecano	Nonadecano	
8	-		Ácido Hexadecanóico
9	-		Ácido Octadecanóico

*Podem ser esses compostos ou isômeros

2.6 Conclusão

A criação de *E. ello* foi estabelecida com sucesso em laboratório.

A análise das antenas dos insetos revelou dimorfismo sexual quanto aos tipos de sensilas encontradas na espécie, sendo as sensilas do tipo tricóide curta, presentes apenas em machos e associada a detecção de feromônios sexuais, e as sensilas aurículas, presentes apenas em fêmeas que estão normalmente associadas a detecção de odores de plantas, no caso de fêmeas de *E. ello* justifica a dependência do inseto pela planta para oviposição.

Os voláteis de machos e fêmeas de *E. ello* foram extraídos por solvente orgânico hexano e os testes comportamentais indicaram duas substâncias bioativas, octacosano e nonacosano cuja atividade deve ser estudada mais detalhadamente para nos permitir construir iscas atrativas para uso no monitoramento e controle por comportamento.

REFERÊNCIAS

- ADEKUNLE, A.; OSAZUWA, P.; RAGHAVAN, V. Socio-economic determinants of agricultural mechanisation in Africa: A research note based on cassava cultivation mechanisation. **Technological Forecasting and Social Change**, v. 112, p. 313-319, 2016.
- AGUIAR, E. B. et al. Monitoramento do mandarová da mandioca (*Erinnyis ello* L. 1758) para o controle com baculovirus (*Baculovirus erinnyis*). **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, p. 55-59, 2010.
- ALLISON, J.D.; CARDÉ, R.T. Variation in moth pheromones. **Pheromone communication in moths: evolution, behavior, and application**, p. 25, 2016.
- BABUSHOK, V.I. et al. Development of a database of gas chromatographic retention properties of organic compounds. **J Chromatogr A**, v. 1157, n. 1-2, p. 414-421, 2007.
- BAWIN, Thomas et al. Structure and distribution of the sensilla on the antennae of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Micron**, v. 96, p. 16-28, 2017.
- BOULLIS, A.; DETRAIN, C.; FRANCIS, F.; VERHEGGEN, F.J. Will climate change affect insect pheromonal communication?. **Current Opinion in Insect Science**, v. 17, p. 87-91, 2016.
- BYERS, K.J.R.P.; SANDERS, E.; RIFFELL, J.A. Identification of olfactory volatiles using gas chromatography-multi-unit recordings (GCMR) in the insect antennal lobe. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 72, p. e4381, 2013.
- CALLAHAN, Philip S. Insect antennae with special reference to the mechanism of scent detection and the evolution of the sensilla. **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v. 4, n. 5, p. 381-430, 1975.
- CARVALHO, R. da S.; RINGENBERG, R.; PIETROWSKI, V. Controle biológico do mandarová da mandioca *Erinnyis ello*. **Embrapa Mandioca e Fruticultura-Fôlder/Folheto/Cartilha (INFOTECA-E)**, 2015.
- CEBALLOS, L.; FERNANDO, L. & ROMERO, A.A. El control de *Erinnyis ello* (L) (Gusano cachón de la yuca). **Cali: Ciat**, 24 p., 1980.
- CHANG, H. et al. Pheromone binding proteins enhance the sensitivity of olfactory receptors to sex pheromones in *Chilo suppressalis*. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2015.
- COLMENAREZ, Y. et al. Uso do manejo integrado de pragas e controle biológico pelos agricultores na América Latina e no Caribe: desafios e oportunidades. Defensivos agrícolas naturais: uso e perspectivas. **Embrapa**, Brasília, p. 802-853, 2016.

CONAB – **Companhia Nacional de Abastecimento**. HISTÓRICO MENSAL MANDIOCA, Abril, 2020.

Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuário-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-mandioca>
Acessado em: 12 de julho de 2020.

CUNHA, J.G. et al. Manejo da criação de *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Platygasteridae) associado a dois hospedeiros, *Tibraca limbativentris* (Hemiptera: Pentatomidae) e *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae). In: **Embrapa Arroz e Feijão-Resumo em anais de congresso (ALICE)**. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 14., 2015, Teresópolis.[Resumos]. Londrina: Sociedade Entomológica do Brasil, 2015.

DA SILVA, K.B. et al. Morphology and distribution of antennal sensilla of *Automeris liberia* (Lepidoptera: Saturniidae). **Micron**, v. 123, p. 102682, 2019.

DA SILVA, L.A. et al. A novel cypovirus found in a betabaculovirus co-infection context contains a poxvirus immune nuclease (poxin)-related gene. **Journal of General Virology**, p. jgv001413, 2020.

DE MATOS, Rigoberto Moreira et al. Aptidão agroclimática para o cultivo da mandioca no município de Barbalha-CE. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 12, n. 5, p. 1815-1822, 2019.

DE MORAIS, L.A.S.; MARINHO-PRADO, J.S. Plantas com Atividade Inseticida. **Embrapa Agroindústria de Alimentos-Capítulo em livro científico (ALICE)**. In: HALFELD-VIEIRA, B. de A.; MARINHO-PRADO, J.S.; NECHET, K. de L.; MORANDI, M.A.B.; BETTIOL, W. Defensivos agrícolas naturais: uso e perspectivas. Brasília, DF: Embrapa. Cap. 19. p. 542-593, 2016.

DE SOUZA TAVARES, Wagner et al. *Belvosia* sp.(Diptera: Tachinidae) parasitizing *Halysidota* sp.(Lepidoptera: Arctiidae) caterpillars on *Ficus benjamina* (Moraceae) in Brazil. **Florida Entomologist**, p. 272-276, 2014.

DIAS, M.C.; DE OLIVEIRA, I.J.; PAMPLONA, A.M.S.R. Ocorrência de pragas desfolhadoras em cultivos de mandioca no Amazonas. **Embrapa Amazônia Ocidental-Documentos (INFOTECA-E)**, 2014.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **Food Outlook Biannual report on global food markets**, 2014.

FARIAS, A.R.N.; EZETA, F.N.; DANTAS, J.L.L. O mandarová da mandioca. **Embrapa Mandioca e Fruticultura-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 1980.

FAUCHEUX, M.J. Biodiversity and unity of sensory organs in lepidopteran insects. **Société des Sciences naturelles de l'Ouest de la France, Nantes**, v. 296, 1999.

FAZOLIN, M. et al. Manejo integrado do mandarová-da-mandioca *Erinnyis ello* (L.) (Lepidoptera: Sphingidae): conceitos e experiências na região do Vale do rio Juruá, Acre. **Embrapa Acre-Documentos (INFOTECA-E)**, 2007.

FAZOLIN, M.; ESTRELA, JVL. Mandioca. **Embrapa Acre-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2016.

FOSTER, S.P.; ANDERSON, K.G.; CASAS, J. Calling Behavior and Sex Pheromone Release and Storage in the Moth *Chloridea virescens*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 46, n. 1, p. 10-20, 2020.

GEISLER, F. et al. Laboratory and field assessments of lethal and sublethal toxicities of acetogenin-based bioinsecticides against *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae). *Chilean journal of agricultural research*, v. 79, n. 4, p. 501-511, 2019.

GIRARD, B. Retention index calculation using Kováts constant model for linear temperature programmed gas chromatography. **J Chromatogr A**, v. 721, n. 2, p. 279-288, 1996.

HENNEKEN, J.; JONES, T.M. Pheromones-based sexual selection in a rapidly changing world. **Current Opinion in Insect Science**, v. 24, p. 84-88, 2017.

JEONG, Seon Ah et al. Morphological and ultrastructural characterization of olfactory sensilla in *Drosophila suzukii*: scanning and transmission electron microscopy. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, 2020.

LIMA, E.R.; ZARBIN, P.H.G.; RODRIGUES, M.A.C.M. Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 3, 722-731. 2009.

LU, Y. et al. Olfactory biosensor for insect semiochemicals analysis by impedance sensing of odorant-binding proteins on interdigitated electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 67, p. 662-669. 2015.

MAIA, V. B.; BAHIA, J. J. S. **Manejo integrado do mandarová (*Erinnyis ello ello* L.) em cultivo de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) na Região Sul da Bahia**. Ilhéus: CEPLAC/CEPEC. 2010. 16p.

MORGAN, N. K.; CHOCT, M. Cassava: Nutrient composition and nutritive value in poultry diets. **Animal Nutrition**, v. 2, n. 4, p. 253-261, 2016.

MOSTAFA, T.; EL KHOULY, G.; HASSAN, A. Pheromones in sex and reproduction: Do they have a role in humans?. **Journal of Advanced Research**, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2012.

NEVES, Y. Y. B. et al. Monitoramento, caracterização e sazonalidade da *Erinnyis Ello* associada à cultura da mandioca na região do Vale do Juruá, Acre. **Revista Sodebras**, v. 8, n. 90, 2013.

NDOMO-MOUALEU, A.F. et al. Structure and distribution of antennal sensilla in the Indianmeal moth, *Plodia interpunctella* (Hübner, 1813)(Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 59, p. 66-75, 2014.

NORONHA, A.C. da S. Manejo das principais pragas da cultura da mandioca. **Embrapa Amazônia Oriental-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2016.

NUNES, L.B.; SANTOS, W.J.; CRUZ, R.S. Rendimento de extração e caracterização química e funcional de féculas de mandioca da região do semi-árido baiano. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 20, n. 1, p. 129-134, 2009.

OGBONNA, C.N.; OKOLI, E.C. Conversion of cassava flour to fuel ethanol by sequential solid state and submerged cultures. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 7, p. 1196-1200, 2010.

OLIVEIRA, F.Q. de et al. Importância da criação de predadores em laboratório para o avanço do conhecimento e da aplicação do controle biológico em sistema de produção agroecológico. **Cadernos de Agroecologia**, v. 13, n. 1, 2018.

PIETROWSKI, V. P. Insetos-praga da cultura da mandioca na região Centro-Sul do Brasil. **UNIOESTE: Embrapa Mandioca e Fruticultura**, 2010.

PINTO-ZEVALLOS, D.M.; PAREJA, M.; AMBROGI, B.G. Current knowledge and future research perspectives on cassava (*Manihot esculenta* Crantz) chemical defenses: An agroecological view. **Phytochemistry**, v. 130, p. 10-21, 2016.

QIU, L. et al. Identification and phylogenetics of Spodoptera frugiperda chemosensory proteins based on antennal transcriptome data. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**, p. 100680, 2020.

RAUL, L. **Farinha de mandioca: o sabor brasileiro e as receitas da Bahia**. Editora Senac São Paulo, 2019.

RINGENBERG, R. Baculovirus erinnyis para o Controle Biológico do Mandarová da Mandioca. **Embrapa Mandioca e Fruticultura-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2014.

RODRIGUES, S.M.M.; SAMPAIO, M.V.; MIRANDA, J.E. Avaliação da capacidade de voo, parasitismo e emergência de linhagens de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, p. 749-753, 2009.

SEMWAL, A. et. al. Pheromones and their role as aphrodisiacs: A review. **Journal of Acute Disease**, v. 2, n. 4, p. 253-261, 2013.

SILVA, A. A. et al. Manejo de plantas daninhas na cultura da mandioca. **Planta Daninha**, 2012.

SOARES, M.A. et al. Assessment of *Trichogramma* species (Hymenoptera: Trichogrammatidae) for biological control in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Acta Scientiarum*. **Agronomy**, v. 36, n. 4, p. 403-408, 2014.

SUN, K.; ZHANG, T.; TIAN, Y. Dynamics analysis and control optimization of a pest management predator-prey model with an integrated control strategy. **Applied Mathematics and Computation**, v. 292, p. 253-271, 2017.

THOMAZINI, M.J. A comunicação química entre os insetos: obtenção e utilização de feromônios no manejo de pragas. **Embrapa Florestas-Capítulo em livro técnico-científico** (ALICE), 2009.

TREMACOLDI, C. R. Manejo das principais doenças da cultura da mandioca no estado do Pará. **Embrapa Amazônia Oriental-Capítulo em livro científico** (ALICE), 2016.

VALLE, T. L.; LORENZI, J. O. Variedades melhoradas de mandioca como instrumento de inovação, segurança alimentar, competitividade e sustentabilidade: contribuições do instituto agrônomo de campinas (IAC). **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 31, n. 1, p. 15-34, 2014.

VIEGAS, M.C.; BASSOLI, D.G. Utilização do índice de retenção linear para caracterização de compostos voláteis em café solúvel utilizando GC-MS e coluna HP-Innowax. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 2031-2034, 2007.

WIDODO, Y.; WAHYUNINGSIH, S.; NEWBY, J. Fuelling cassava development to meet the greater demand for food and bio-fuel in Indonesia. **Energy Procedia**, v. 65, p. 386-394, 2015.

YU, J. et al. Identification of a General Odorant Receptor for Repellents in the Asian Corn Borer *Ostrinia furnacalis*. **Frontiers in Physiology**, v. 11, p. 176, 2020.

YUVARAJ, J.K.; ANDERSSON, M.N.; CORCORAN, J.A.; ANDERBRANT, O.; LÖFSTEDT, C. Functional characterization of odorant receptors from *Lampronia capitella* suggests a non-ditrysian origin of the lepidopteran pheromone receptor clade. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 100, 39-47, 2018.

ZANETTI, R. Conceitos básicos do manejo integrado de pragas. **Lavras, MG**, 2013.

ZHENG, H. et al. Scanning electron microscopy study of the antennal sensilla of *Catocala remissa*. **Bull. Insectol**, v. 67, p. 63-71, 2014.

ZUO, Tongtong et al. Antennal Sensilla of *Cryptorhynchus lapathi* L. (Coleoptera: Curculionidae). **Entomological News**, v. 125, n. 3, p. 199-213, 2015.

**3 ESTRUTURA E FUNÇÃO DE PROTEÍNAS LIGADORAS DE ODOR (OBPS) DE
HELICOVERPA ARMIGERA (HÜBNER, 1805) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

3.1 Introdução

A *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae) é considerada a praga mais importante da agricultura mundial, identificada na África, Ásia, Europa, Austrália e ilhas da Região do Pacífico Ocidental, causando grandes danos ao setor (SARTORI, et al., 2015; BRAMBILA, 2018). Esta praga é altamente polífaga, apresentando capacidade de desenvolvimento em uma ampla gama de hospedeiros, tendo sido registrada em mais de 100 espécies de plantas, compreendendo cerca de 45 diferentes famílias (INÁCIO, et al., 2020).

Métodos de controle sustentáveis e efetivos são desejáveis na redução do uso de produtos químicos, em particular para *H. armigera*, porque o controle químico não é vantajoso, já que esta praga desenvolveu alta resistência a organoclorados, organofosforados e piretróides (TIAN, et al. 2017). O uso repetido destes produtos para o controle resultou no reaparecimento e surtos, resistência a inseticidas, eliminação dos inimigos naturais, além de ser nocivo ao agricultor, ao meio ambiente e causar a contaminação dos alimentos (KAMARAJ, et al., 2018). Alternativamente, o feromônio sexual de *H. armigera* já é usado rotineiramente para monitoramento e confusão sexual dessa praga em vários países, como uma ferramenta de manejo e controle em diferentes sistemas agrícolas (BORGES, et al., 2018). A impregnação do feromônio sexual em vários pontos da lavoura desorienta o inseto na busca do parceiro para o acasalamento e dificulta a sua reprodução (MALIK, et al., 2003).

Um dos mais importantes compostos presentes na glândula sexual de fêmeas de *H. armigera* é o (Z)-11-hexadecenal (Z11-16:Ald), que não foi apenas o primeiro componente descrito para *H. armigera*, como também foi o primeiro e único feromônio de longa distância descoberto para a espécie. Desde então, muitos outros componentes foram descobertos em *H. armigera*, incluindo tetradecanal (14:Al), (Z)-11-tetradecenol (Z11-14:OH), (Z)-9-tetradecenal (Z9-14:Al), hexadecanal (16:Al), (Z)-7-hexadecenal (Z7-16:Al), (Z)-9-hexadecenal (Z9-16:Al), 1-hexadecanol (16:OH), (Z)-9-hexadecenol (Z9-16:OH), (Z)-11-hexadecenol (Z11-16:OH), (Z)-11-tetradecenal (Z11-14:Al), e acetato de (Z)-11-hexadecenila (Z11-16:Ac) (ZHANG, et al., 2012). O feromônio sexual de *H. armigera* foi identificado em populações de diferentes origens geográficas e contém dois componentes principais, composto por dois aldeídos: (Z11-16:Ald) e (Z9-16:Ald) na proporção 97:3, respectivamente (LI, et al., 2017). Entretanto, pesquisas apontam que a proporção desses dois

componentes podem variar de acordo com as diferentes populações de *H. armigera* (BORGES, et al., 2018). E embora estejam disponíveis comercialmente diversas armadilhas e formulações do feromônio sexual de *H. armigera*, há uma tendência ao uso de inseticidas químicos para redução imediata de surtos populacionais (KHORSHIDI, et al., 2019).

De forma geral, os insetos detectam as moléculas voláteis presentes no ar através de sensilas olfativas, localizadas principalmente nas antenas. O sistema olfativo dos insetos tem um papel fundamental no seu crescimento e reprodução (ZHANG, et al., 2017). E por isso, o conhecimento dos mecanismos moleculares desse sistema é útil para obtenção de novos meios de controle eficazes (LIMA-MENDONÇA, et al., 2014). No modelo mais aceito, moléculas hidrofóbicas responsáveis por odores penetram por poros nas sensilas das antenas, onde são solubilizados e transportados através de um fluido aquoso, a linfa sensilar, por Proteínas Ligadoras de Odor (OBPs) (LORENZO, et al., 2012). Não é claro se as OBPs carregam as moléculas de odor até os receptores da membrana, na superfície dos dendritos celulares, ou se uma mudança conformacional resultante das OBPs é detectada pelo receptor. Contudo, é possível que ambos os mecanismos ocorram, a depender do tipo de OBP ou do receptor (LARTER, et al., 2016). Em síntese, acredita-se que pelo menos algumas OBPs promovem a transferência das moléculas de odor dentro de um órgão olfativo até as proteínas receptoras de ar e odor (ORs, *odor receptor*) nos neurônios olfativos (VOGT, et al., 2015).

Pesquisas sobre as propriedades das OBPs de *H. armigera* estão sendo realizadas, no entanto, as questões de especificidade ou de efeitos estruturais ainda não estão esclarecidas. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a estrutura e função das OBPs de *H. armigera*, para determinar seu uso na identificação de odores atraentes ou repelentes de plantas hospedeiras e não-hospedeiras, bem como no processo de atração de parceiros sexuais. Com esse conhecimento, seria possível obter uma molécula que ligue a proteína de forma irreversível ou fazendo o knock out de genes, produzindo machos sem a OBP, em ambos casos promovendo o controle da praga. Uma base de dados de cDNA para antenas de machos e fêmeas de *H. armigera* foi gerada e utilizada na clonagem de genes de OBPs para expressão em *Escherichia coli* (*E. coli*). O estudo da preferência de ligação das OBPs com as moléculas do feromônio foi realizado por meio de técnicas de EM de Troca de Hidrogênio Deutério (HDX) e por Espectroscopia de Fluorescência.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo geral

Investigar a estrutura e a função das proteínas ligadoras de odor (OBPs) de *H. armigera*, para determinar seu uso na identificação de compostos atraentes como alternativa para o controle desta praga.

3.2.2 Objetivos específicos

- a) Expressar os genes das proteínas ligadoras de odor (OBPs) em *E. coli*, com enfoque em GOBP (HarmGOBP1) e PBP (HarmPBP1);
- b) Isolar as proteínas ligadoras de feromônios (GOBP1 e PBP1) de *H. armigera*;
- c) Estudar o complexo molecular ligante-proteína através das técnicas de Espectrometria de Massas (EM), HDX e Espectroscopia de Fluorescência.

3.3 Revisão da literatura

3.3.1 *Helicoverpa armigera* (Hub.)

A *H. armigera*, mesmo tendo chegado ao Brasil muito recentemente, já possui papel de destaque como praga, bem como em todo o mundo, pois possui ampla distribuição geográfica (SOSA-GÓMEZ, et al., 2016). É uma espécie originária da costa do Mar Mediterrâneo, com ocorrência em mais de 90 países na Europa, África, Ásia e Oceania (Austrália). Sua fase de desenvolvimento passa por seis estágios e o adulto da lagarta é uma mariposa (Fig. 56) (FRONTEIRA AGRÍCOLA, 2014).

Figura 56 – Ciclo biológico da *H. armigera*.



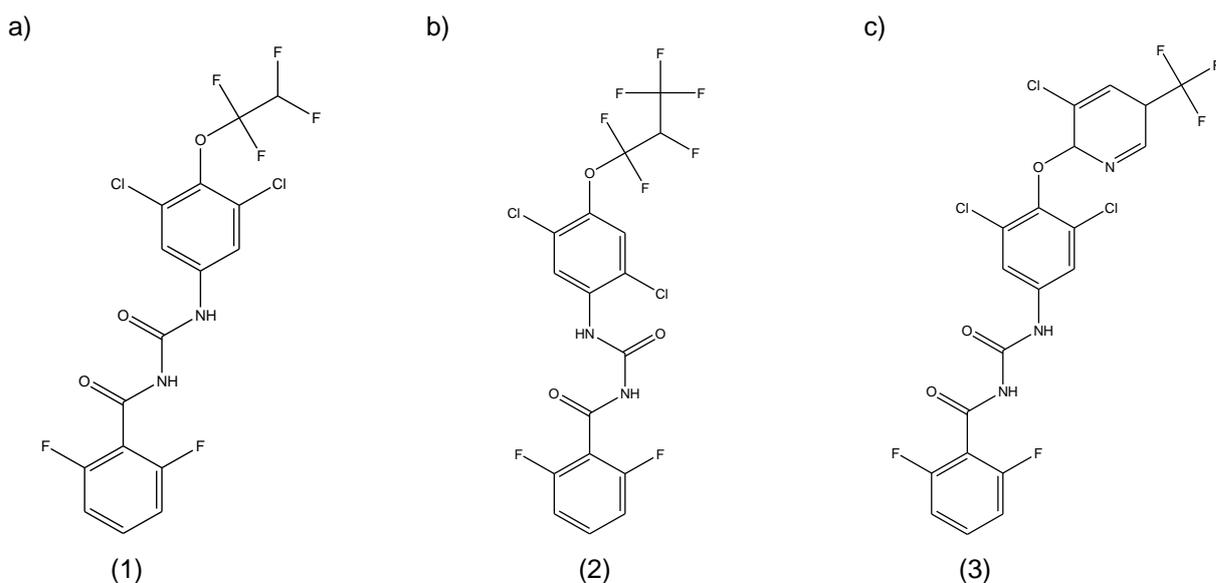
Fonte: Embrapa, 2015

As lagartas alimentam-se tanto dos órgãos vegetativos como reprodutivos da cultura, podendo limitar o crescimento da planta e causar deformações ou podridões, assim como a queda prematura dessas estruturas, acarretando perdas de até 80% na produção (LIMA, 2019). Essa peculiar capacidade de *H. armigera* de causar danos nas partes reprodutivas das culturas, em associação à sua habilidade de atacar grande número de hospedeiros, é um fator que eleva o status de importância econômica da praga (CUNNINGHAM, et al., 1999). No Brasil, *H. armigera* já foi constatada em várias culturas de importância econômica, tais como algodão, soja, milho, tomate, feijão, sorgo, milheto, grão-de-bico, pimenta, quiabo e trigo, bem como em algumas espécies de plantas daninhas (ÁVILA, et al., 2013).

O controle de *H. armigera* por inseticidas químicos sintéticos tem sido amplamente utilizado ao redor do mundo, embora haja mais de 600 relatos de resistência a múltiplos grupos de inseticidas, o que aumenta a complexidade da problemática sobre o uso desses produtos (BUENO, et al., 2013). Pesquisadores

têm apresentado progressos em estratégias inovadoras para o manejo de pragas. Entre as pesquisas recentes, buscam-se: Compreender o sistema imunológico de insetos lepidópteros, incluindo *H. armigera* (LIN, et al., 2020); Conhecer o impacto alimentar de novos inseticidas naturais derivados de plantas, conhecidos como "inseticidas botânicos", a partir de em extrato de folhas rico em tagitinina C (TagCE) em relação às lagartas de *H. armigera* (INÁCIO, et al., 2020); Entender a desintoxicação de pesticidas à base de glutathione S-transferase (GST) em *H. armigera* por meio da exposição dietética de uma mistura de pesticidas (LABADE, et al., 2018); Impedir o crescimento e desenvolvimento de *H. armigera* inibindo enzimas do tipo serina protease, no intestino médio da lagarta (SAIKHEDKAR, et al., 2018); Conhecer os efeitos dos inseticidas (Fig. 57) do grupo das benzoilureias* hexaflumuron (1), lufenuron (2) e clorfluazuron (3) em alguns parâmetros biológicos e fisiológicos em *H. armigera* pela exposição sub-letal na adição de diferentes concentrações dos inseticidas à dieta artificial das largatas (KHORSHIDI, et al., 2019).

Figura 57 - Inseticidas fisiológicos do grupo das benzoilureias: a) Hexaflumuron: 1-[3,5-dicloro-4-(1,1,2,2-tetrafluoroethoxi)fenil]-3-(2,6-difluorobenzoil) ureia; b) Lufenuron: (RS)-1-[2,5-dicloro-4-(1,1,2,3,3,3-hexafluoropropoxi)fenil]-3-(2,6-difluorobenzoil) ureia; c) Clorfluazuron: 1-(3,5-dicloro-4-(3-cloro-5-trifluorometil-2-piridiloxi)fenil)-3-(2,6-difluorobenzoil) ureia.



Fonte: adaptado de PubChem <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>

*esses inseticidas que agem como inibidores da síntese de quitina nos insetos interferindo no crescimento e desenvolvimento da praga (MARQUES, et al., 2018).

Além disso, o manejo biológico (natural ou aplicado) também é indicado para o controle de lagartas e pode ser realizado utilizando-se insetos parasitóides e predadores da lagarta. Porém, a interação inseto-parasitoide é dependente da planta onde ocorre o ataque da praga e isso influencia na potencialidade dos parasitoides em baixar o nível de ação do inseto no campo (CORRÊA-FERREIRA, et al., 2014). Outra forma de controle biológico é realizado utilizando-se vírus, bactérias, fungos e nematoides que são capazes de diminuir a população de *H. armigera*. Entre eles, destaca-se o uso de *Bacillus thuringiensis* (Bt), uma formulação biológica que controla a praga e não afeta os inimigos naturais. Contudo, uma das limitações do uso do Bt é o fato da cultura poder ser um organismo geneticamente modificado e isso vai inviabilizar o uso do controle biológico com Bt, o que não é recomendado, pois pode causar resistência nos insetos pelo uso de dois produtos com a mesma ação (MENDES, 2018). Para tanto, o monitoramento efetivo de *H. armigera* é considerado como fator chave para a o controle com a implementação de estratégias de manejo integrado. Os adultos de *H. armigera* podem ser monitorados, utilizando-se armadilhas luminosas, como também armadilhas iscadas com o seu feromônio sexual. A intensidade de captura desses adultos numa determinada área fornece uma previsão do potencial de ocorrência de ovos e de lagartas e, conseqüentemente, a implementação de técnicas de controle devido aos danos aos cultivos (ÁVILA, et al., 2013).

Neste trabalho, nós buscamos compreender o complexo molecular entre o principal componente do feromônio sexual de *H. armigera* e 6 substâncias biologicamente relevantes produzidas por insetos e plantas, com suas respectivas OBPs, para sugerir novas estratégias de controle da praga.

OBPs em lepidópteros são geralmente divididas em diferentes subfamílias: Proteínas Ligadoras de Feromônio (PBPs); Proteínas Ligadoras de Odores Gerais (GOBPs) e as Proteínas de Ligação a Antenas (ABPs, *Antennal-Binding Proteins*) (ZHANG, et al., 2012). Sendo que as PBPBs e GOBPs foram as primeiras OBPs estudadas e têm sido bem correlacionadas às sensilas olfativas (VOGT, et al., 2015). Considera-se que as PBPs ligam aos componentes dos atraentes sexuais liberados por fêmeas (usualmente uma mistura de álcoois de cadeia longa e aldeídos), enquanto que as GOBPs geralmente estão envolvidas no reconhecimento dos voláteis de plantas (ZHOU, 2010).

Em *H. armigera*, 12 OBPs foram identificadas e caracterizadas fisiologicamente (ZHANG, et al., 2012).

3.3.2 Proteínas Ligadoras de Odor (OBPs)

As OBPs dos insetos e as proteínas quimiosensoriais (CSPs, *Chemosensory Proteins*) exercem um papel relevante na comunicação química de insetos (QUI, et al., 2020). Nos últimos anos, marcadores de sequência genética (ESTs, *Expressed Sequence Tags*) de muitas espécies de insetos têm sido acumulados, contribuindo como um recurso útil para a descoberta de genes (SINGH, et al., 2019). Projetos de genoma e transcriptoma tem permitido que um grande número de sequências de OBP de insetos estejam disponíveis (KOTLOWSKI, et al., 2018).

As OBPs são proteínas globulares pequenas, de aproximadamente 13 a 20 kDa, com 120 a 150 aminoácidos, e solúveis em água. São expressas nas células de suporte da sensila olfativa e secretadas no fluido extracelular que ocupa o lúmen dos pêlos da sensila e ao redor das projeções de dendritos (espinha dentrítica) ciliares dos receptores olfativos neuronais (VOGT, et al., 2002). Muitas OBPs possuem em sua estrutura primária seis resíduos de cisteína em um padrão assimétrico que as caracteriza estruturalmente. Os seis resíduos conservados de cisteínas formam três pontes dissulfeto (cys1-cys3, cys2-cys5, e cys4-cys6) que desempenham papéis importantes na estabilização da estrutura terciária da proteína (FAN, et al., 2011). A característica mais marcante entre todas as seqüências de OBP é que o número de aminoácidos entre a segunda e a terceira cisteína é sempre três e o número de aminoácidos entre a quinta e a sexta cisteína, sempre oito. Esse padrão nas sequências de aminoácidos tornou-se uma "assinatura" para OBPs de insetos (ZHOU, 2010). Outra característica essencial das OBPs é a de possuir uma similaridade aceitável em sequência de proteínas (análise valor E do BLAST) com membros de outras famílias. As OBPs não são exclusivas das antenas, sendo também encontradas em outras partes do corpo dos insetos (XU, et al., 2009).

A percepção de feromônios e outros odores ocorre por meio de uma série complexa de eventos que vem sendo elucidados ao longo dos anos. Seres invertebrados e vertebrados usam seu sistema olfativo para detectar odores, entretanto não existe homologia entre OBPs de vertebrados e OBPs de insetos em sequência de aminoácidos (ZHOU, 2010). Pesquisas recentes têm apresentado

evidências de que as OBPs podem desempenhar papéis adicionais, auxiliando na discriminação entre diferentes compostos orgânicos voláteis funcionais com proteínas receptoras de ar e odor (ORs) expressas em sistemas heterólogos e que a presença de OBPs adequadas aumentam a sensibilidade e a seletividade das ORs aos feromônios (KOTLOWSKI, et al., 2018).

Atualmente, um grande número de PBPs e GOBPs tem sido identificado em lepidópteros, mais de 2000 sequências de OBPs de insetos foram registradas no banco de dados do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI, *National Center for Biotechnology Information*) (JING, et al., 2020).

3.3.3 Proteínas Ligadoras de Feromônio (PBPs)

A primeira OBP caracterizada em insetos foi uma proteína de ligação de feromônio (PBP), na antena de machos do bicho da seda, a mariposa gigante *Antheraea polyphemus*. PBPs são proteínas solúveis pequenas, de aproximadamente 15 a 17 kDa, concentradas na linfa sensilar das antenas de lepidópteros e são constituídas em média por uma cadeia de 142 resíduos aminoácidos (VOGT, et al., 1981). A sequência do cDNA da PBP foi identificada e clonada pela primeira vez em uma mariposa da espécie *Manduca sexta* (MsexPBP) (GYOËRGYI, et al., 1988).

As proteínas de ligação aos feromônios (PBPs) estão localizadas nas sensilas das antenas do receptor do feromônio, respondendo especificamente ao feromônio. No entanto, em 2000, Callahan e seus colaboradores relataram a expressão de PBP em baixos níveis nas antenas de fêmeas em Saturniidae, Bombycidae e Lymantriidae e em níveis relativamente elevados em membros da família Noctuidae. PBPs de lepidópteros podem ser reconhecidas baseando-se em suas sequências, por apresentarem um grupo homogêneo de proteínas bem conservadas entre as espécies. Sua semelhança estrutural tem sido relacionada à semelhança dos feromônios sexuais de lepidópteros que, apesar de algumas exceções, são geralmente constituídos de cadeias lineares com 12 a 20 átomos de carbono e um grupo funcional em uma extremidade da molécula, podendo ser um álcool, um aldeído ou um acetato (GUO, et al., 2012). As PBPs ocorrem em concentrações milimolares na linfa sensilar extracelular em torno dos receptores celulares olfativos em insetos (POPHOF, 2002). Desta forma, a comunicação sexual em mariposas é

favorecida através das PBPs, que transportam feromônios sexuais através da camada aquosa que circunda os receptores acoplados à proteína G (proteína envolvida na transdução de sinais celulares), iniciando eventos de sinalização que levam ao acasalamento (LAUTENSCHLAGER, et al., 2007). Esse processo serve como modelo e auxilia na investigação da percepção sensorial de insetos, embora a interação entre as PBPs e os receptores de feromônios (PRs) ainda permaneça amplamente desconhecida (CHANG, et al., 2015).

Comumente, existem três genes PBP em uma mariposa, cada gene exibe níveis altos de identidade de sequência entre espécies e formam três subgrupos conservados (DONG, et al., 2017). Em *H. armigera* duas bibliotecas de cDNA foram construídas com sucesso a partir das antenas dos insetos (machos e fêmeas) e 15 genes OBPs putativos foram obtidos. Observou-se que os genes HarmOBP1, HarmPBP1, HarmPBP2 e HarmPBP3 foram altamente expressos em antenas de machos (ZHANG, et al., 2011). Na avaliação dos resultados, Zhang e colaboradores (2011) observaram ainda que os genes HarmPBP1 (AY253870) e HarmPBP2 (EU647241) já haviam sido registrados no banco de dados do NCBI, entretanto, dois novos genes PBP foram identificados por análise de alinhamento, e foi constatado que o gene HQ436362 é aproximadamente 108 pares de bases mais longo que o HarmPBP1, e que HQ436360 é 48 pares de bases maior que o HarmPBP2. Com isso, os dois novos genes foram registrados e denominados por HarmPBP1 (HQ436362), e HarmPBP2 (HQ436360). No presente estudo, o NCBI foi utilizado para busca de informações da HarmPBP1 – GenBank (HQ436362).

3.3.4 Proteínas Ligadoras de Odores Gerais (GOBPs)

Em 1991, Vogt e seus colaboradores isolaram e sequenciaram parcialmente 14 possíveis OBPs de seis espécies de mariposas e observaram que dois grupos de OBPs eram fundamentalmente diferentes das PBPs estudadas (expressas em antenas de machos e fêmeas), entretanto os dois grupos eram altamente conservados entre si. Essas diferenças sugeriram que as proteínas tinham uma função diferente da de se ligar especificamente ao feromônio sexual. Presumivelmente, ligavam-se a outros odores, atuando assim como ligadoras de odores gerais. Essas proteínas foram obtidas a partir das antenas de *Manduca sexta* (Msexf1 and Msexf2), e foram descritas e denominadas como proteínas de ligação

de odor generalizado ou GOBPs. Assim, a principal diferença entre PBPs e GOBPs é o grau em que suas respectivas sequências variam quando comparadas entre espécies: PBPs são variáveis, enquanto que GOBPs são altamente conservadas.

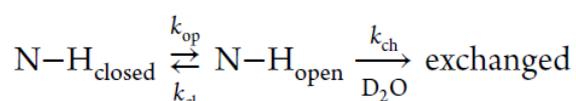
Até o momento, apenas dois subtipos de GOBP (GOBP1 e GOBP2) foram identificados em espécies de lepidópteros (JING, et al., 2019). Vogt e colaboradores (1991) relataram que a GOBPs são geralmente constituídas por cadeias de 144 (GOBP1) e 141(GOBP2) resíduos de aminoácidos, com peso molecular entre 16 kDa e 19 kDa (incluindo o peptídeo sinal). Ao longo dos anos, pesquisas realizadas com genes GOBP2 em diferentes espécies demonstraram que GOBP2s podem se ligar ao feromônio sexual em alguns casos, mas as funções das GOBP1s ainda são desconhecidas (ZHANG, et al., 2015). É estimado que as GOBPs sejam mais abundantes em antenas de fêmeas de mariposas. Adicionalmente, estudos de localização das sensilas nas antenas mostram que as GOBPs de mariposas não são apenas expressas na sensilla basiconica (sensível ao odor), mas também são detectadas na sensilla trichodea (sensível ao feromônio sexual), sugerindo que elas possam participar na quimiorrecepção dos odorantes de plantas hospedeiras, locais de oviposição e dos feromônios sexuais. Essas sugestões tem sido confirmadas por experimentos funcionais *in vitro* em diferentes mariposas (JING, et al., 2019; ZHANG, et al., 2020). Ademais, além da identificação de PBPs e GOBPs, a semelhança estrutural e a afinidade de ligação a diferentes feromônios sexuais e voláteis de plantas vem sendo determinadas por ensaios competitivos de ligantes fluorescentes e métodos computacionais de acoplamento molecular. Essas técnicas fornecem uma nova dimensão para o estudo das OBPs de insetos como um ponto importante no campo de controle de pragas. Na última década, pesquisadores relataram também que as OBPs possuem alta especificidade em relação a uma ampla gama de voláteis de plantas. Com isso, PBPs e GOBPs apresentam atualmente uma capacidade extensiva de ligação e são um grande desafio para a tomada de decisão na seleção de OBPs funcionalmente dominantes como alvo para de pesticidas (JING, et al., 2020). Em *H. armigera*, Zhang e colaboradores (2011) construíram pela primeira vez bibliotecas de cDNA a partir das antenas de machos e fêmeas do inseto e, após a discriminação e a caracterização, obtiveram um gene GOBP1 e um gene GOBP2. No presente estudo, o NCBI foi utilizado para busca de informações da HarmGOBP1 – GenBank (AY049739).

3.3.5 Espectrometria de Massas (EM) de Troca de Hidrogênio Deutério (HDX)

O estudo da estrutura e dinâmica das proteínas são fundamentais para a compreensão dos seus mecanismos funcionais. A função de uma proteína depende frequentemente da estabilidade de sua conformação nativa (POWELL, et al., 2001). A estabilidade termodinâmica do dobramento e da interação com ligantes são importantes para a compreensão dos processos biológicos (TRAN, et al., 2012).

Os estudos de troca de hidrogênio (HX) da proteína foram iniciados por Linderstrang Lang e pelo grupo do Prof. Carlsberg por volta de 1950, e estão em franca expansão desde então. Os hidrogênios próticos nos grupos das cadeias principal e lateral distribuídos por toda a molécula da proteína e ácido nucleico estão em contínua troca com os átomos de hidrogênio do solvente (isso ocorre naturalmente nas proteínas em água) (ENGLANDER, et al., 1996). A troca hidrogênio-deutério acoplada à espectrometria de massa (HDX-EM) é uma técnica usada para monitorar a estrutura e dinâmica das proteínas em solução. As proteínas nativamente dobradas são diluídas em água deuterada (D₂O) e com isso, haverá troca de hidrogênio dos grupos amida, hidroxila ou tiol da cadeia principal por seu isótopo presente no solvente, como o deutério é mais pesado que o hidrogênio, uma mudança de massa pode ser detectada por EM (DENG, et al., 2016). No entanto, essa troca só pode ocorrer se a amida estiver acessível ao solvente e não estiver envolvida em uma ligação de hidrogênio (KARCH, et al., 2018).

O mecanismo de troca pode ser representado por:



eq (1)

Fonte: SOWOLE, et al., 2014.

A maioria dos grupos N-H da cadeia principal nas proteínas dobradas nativamente estão envolvidos em ligações de hidrogênio. A deuteração nesses locais é mediada por flutuações de abertura/fechamento ativadas termicamente que rompem transitoriamente as ligações de hidrogênio e expõem os grupos N-H ao solvente. As constantes da taxa de abertura e fechamento são denominadas por k_{op} e k_{cl} , respectivamente, sendo k_{ch} a constante da taxa de troca química (SOWOLE,

et. al., 2014). Ou seja, o equilíbrio entre as formas 'aberta' e 'fechada' da amida é determinado pela constante da taxa k_{op} para a abertura da ligação e a constante taxa k_{cl} para o fechamento da ligação. Com isso, a troca de solventes só pode ocorrer enquanto o grupo amida estiver na conformação 'aberta'. A taxa de troca de solventes (k_{ch}) que ocorre enquanto o grupo amida está em conformação aberta é governada pelos efeitos estéricos e eletrostáticos dos resíduos circundantes, do próprio resíduo, do pH (ou pD) da solução e da temperatura (MASSON, et al., 2017). Assim, a taxa de troca depende de uma combinação complexa, como a estabilidade (ou flexibilidade) das regiões proteicas, incluindo estruturas secundárias, contatos intra ou intermoleculares, compactação ou relaxamento da proteína e presença ou ausência de ligantes (KARCH, et. al., 2018).

Desta forma, a técnica é baseada no fato de que a exposição de uma proteína ao D_2O induz uma troca rápida de amida $H \rightarrow D$ em regiões desordenadas que necessitam de ligação estável ao hidrogênio; em seguida, os processos de troca são interrompidos (*quenching*) simultaneamente por rápida acidificação (pH ~ 2,5) e redução da temperatura (0 °C). As condições de resfriamento precisam ser mantidas pelo restante do experimento para minimizar a “troca reversa”. As proteínas são então digeridas e os peptídeos gerados são analisados por EM para medir as mudanças de massa de segmentos proteicos individuais (KONERMANN, et. al., 2011; AMBRUS, et. al., 2016). Resumidamente, as amostras digeridas são separadas em uma coluna de fase reversa (tipicamente C18) com um gradiente de acetonitrila a pH baixo (REDHAIR, et. al., 2019). Assim, é possível fazer uma comparação quantitativa das taxas de troca relativas ao número de deutérios incorporados em cada peptídeo com os resultados da proteína não exposta ao D_2O (AMBRUS, et. al., 2016). É pressuposto então que a proteína esteja exposta a 100% de D_2O , e somente a reação de troca de deuteração ocorre, logo, não deve haver água presente e nenhum deutério incorporado pode ser substituído por um próton (conhecido como troca reversa) (MASSON, et al., 2017). Entretanto, essa técnica apresenta desafios metodológicos e técnicos consideráveis no que diz respeito à troca reversa indesejável de deutério sob condições de *quenching*/digestão/análise e mistura H/D sob ativação colisional de MS/MS (MANZI, et. al., 2016).

3.4 Experimental

3.4.1 Equipamentos

Para a medida de massa dos reagentes e padrões, visando o preparo de soluções, foi empregada uma balança analítica METTLER TOLEDO com precisão de 0,001 g. Para as medidas de pH, foi utilizado um medidor de pH (8100 pH Kit pH *and temperature meter kit*). Um kit de purificação GeneJET PCR *Purification* (Thermo Scientific™) foi utilizado no processo de clonagem e sequenciamento das proteínas de estudo. Um termociclador (MultiGene™ Mini, modelo TC050-18-230V) foi usado no processo de transformação das células. A DNA Polimerase de alta fidelidade (*Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase* (M0530) - Thermo Scientific®) foi utilizada com o tampão 5X Phusion HF para subsequente reação em cadeia da polimerase (PCR). Foram utilizadas placas de petri para o preparo das culturas. Os balões contendo o meio de cultura foram autoclavados em autoclave Rodwell (MP 25 Control) a 120 °C. As culturas eram incubadas empregando-se incubadora com agitação orbital (Lab Companion, IS-971R) a 200 rpm, com temperatura controlada a 37 °C. As medições da densidade óptica (DO₆₀₀) foram realizadas em espectrofotômetro WPA (modelo UV 1101, Cambridge U.K.). O material celular foi centrifugado utilizando centrifuga (BECKMAN, Avanti™ J-25 I) e/ou (BECKMAN COULTER, Avanti j-26S XP) e a lise celular foi realizada empregando-se um desintegrador ultrassônico (MSE, modelo Soniprep 150). Para purificação e troca de tampão da proteína foram utilizadas colunas (GE Healthcare) HisGraviTrap 1 mL e HiTrap de desalinização 5 mL. As amostras preparadas para a corrida em gel (15 %) foram incubadas a 90 °C em uma incubadora Mini Dray Bath, modelo BSH200 (Flowgen Bioscience) e um marcador molecular (*ladder*) (New England Biolabs) foi adicionado. A análise em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi realizada utilizando o kit *buffer dam* (Biod-Rad, mini-PROTEAN® Tetra System). A centrifuga Eppendorf AG (modelo centrifuge 5417 R) foi utilizada no processo de clivagem. Para realização da clivagem foi utilizado o kit Thrombin CleanCleave™ (RECOMT-1KT) (Sigma-Aldrich). Um oscilador (DENLEY, modelo A 600 Rocker) foi utilizado para manter as amostras de proteína até completa clivagem. As concentrações das amostras foram medidas em um espectrofotômetro microvolume UV-Vis, compacto, NanoDrop Lite da Thermo Scientific™. Quando necessário, as amostra foram

concentradas utilizando dispositivos de ultrafiltração descartáveis (concentradores centrífugos) Vivaspin® 500, 10 kDa ou 5 kDa MWCO (GE Healthcare). O nitrogênio líquido utilizado para congelar as amostras era recolhido de um tanque criogênico (*Dewars*) (STATEBOURNE, Cryolab 25). A revelação do gel (15 %) foi realizada por imagens de fluorescência/quimioluminescência (GENEFLOW, Syngene's G:BOX), utilizando o software GeneSys. As análises de HDX foram realizadas em um espectrômetro de massas operando no modo de ionização por *electrospray* (*Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS)*), modelo SYNAPT HDMS™ (*High Definition Mass Spectrometry*) e tecnologia Q-TOF (*Quadrupole Time-of-Flight*) (Waters, Altrincham, UK). Os espectros foram registrados e analisados utilizando o software MassLynx V4.0. As medidas de fluorescência foram realizadas em cubeta de quartzo de 2 mL, em fluorímetro (Perkin-Elmer, modelo LS50B). Os espectros foram registrados utilizando o software FL Win Lab e analisados utilizando o software Origin® 8.0 (OriginLab Corporation, Inglaterra).

3.4.2 Materiais e métodos

3.4.2.1 Obtenção da biblioteca de DNA complementar (cDNA), clonagem e sequenciamento.

Todo processo de desenho dos oligonucleotídeos (*primers*) até a obtenção da biblioteca do cDNA foi previamente executado pela equipe do Professor Neil Oldham. As análises de sequências de ácidos nucleicos foram realizadas pela Unidade de Sequenciamento de DNA, sediada na Escola de Ciências da Vida, na Universidade de Nottingham.

A biblioteca foi criada a partir da extração e isolamento do RNA da antena de adultos da *Helicoverpa armigera* (Hubner) (ZHANG, et al., 2011). Depois de sintetizado o padrão do cDNA, os *inserts* com até 600 pares de bases foram selecionados e enviados para o sequenciamento. Os resultados do sequenciamento foram analisados utilizando as ferramentas ExPASy e EMBOSS Needle. As sequências de nucleotídeos foram analisadas por busca de similaridade através da ferramenta de busca de alinhamento local básico (BLAST) e blastn.

O *GenBank/NCBI – National Center for Biotechnology Information* – foi utilizado para busca de informações das OBPs: HarmPBP1 – GenBank (HQ436362) e HarmGOBP1 GenBank (AY049739) (ZHANG, et al., 2011).

Os fragmentos do cDNA (DNA complementar ao mRNA) foram obtidos através de uma reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) (BioLabs®inc.), com os “*primers*” específicos, seguindo o protocolo do fabricante. A amplificação da sequência das OBPs foi feita a partir do clone de cDNA e foram utilizados para cada proteína (HarmPBP1 e HarmGOBP1):

Tampão 5X Phusion HF	4 µL
10 µM Desoxinucleotídeo (dNTP)	0,4 µL
10 µM <i>Forward Primer</i> (FW)	1 µL
10 µM <i>Reverse Primer</i> (RV)	1 µL
Dimetilsulfóxido (DMSO)	0,6 µL
Phusion DNA Polimerase	0,2 µL
cDNA antena* (200 µg / 2 µL)	0,5 µL
Água milli-Q estéril	12,3 µL

Nanodrop do cDNA antena: 901.8 *

O gel de agarose a 1 %, utilizado para realizar a análise do produto da PCR, foi preparado pela dissolução de 0,5 g de agarose (Sigma-Aldrich) em 50 mL do tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE), corado com ~ 7 µL de brometo de etídio e posteriormente visualizado na luz ultravioleta.

Após a análise por gel de agarose, o *insert* de cada OBP foi amplificado por PCR (20 µL), sendo a desnaturação inicial a 98 °C por 30 segundos e extensão final a 72 °C por 10 min, como segue:

HarmGOBP1 (25 Ciclos)	T °C	Tempo	HarmPBP1 (30 Ciclos)	T °C	Tempo
Desnaturação	98	10s	Desnaturação	98	10s
Anelamento	72	20s	Anelamento	60	20s
Extensão	72	30s	Extensão	72	30s

Uma nova análise em gel de agarose 1 % foi realizada e, então, seguiu-se para a purificação pela técnica da PCR *clean up spin column*, seguindo as instruções do fabricante no kit. As alíquotas contendo os DNAs foram estocadas a - 20 °C.

O vetor de expressão foi preparado usando um esqueleto plasmídeo pET28 (Merk) que retém as Taq polimerase (*Thermus aquaticus*) das terminações C e N como modelo. Uma reação em cadeia de polimerase (PCR) foi utilizada para amplificar o esqueleto plasmídeo pET28, usando os *primers* **p28LIC_C**: CACCACCACCACCTGAGATCCGGC e **p28LIC_N**: GCCGCGCGGCACCAGGCCG.

As sequências de nucleotídeos das OBPs (previamente construídas) descritas abaixo foram inseridas no vetor de expressão, nos sítios digeridos pelas enzimas de restrição *NdeI* e *NotI*.

OBPs		Sequência curta de nucleotídeos (5'→ 3')	Tm°
HarmPBP1	<i>Forward (FW)</i>	CGCGCGGCAGCCATATGGCGTCGCAAGATGTTATTAAGAACCTC	87,7
	<i>Reverse (RV)</i>	TGCTCGAGTGCGGCCGCTTAGACTTCGGCCAAGACTTCTCCGA	90,4
HarmGOBP1	<i>Forward (FW)</i>	CGCGCGGCAGCCATATGAAGGACGTACGCTCGGCTTC	91,3
	<i>Reverse (RV)</i>	TGCTCGAGTGCGGCCGCTTAGCGCGACTCGGCCTCCAT	92,7

A reação de ligação do *insert* com o vetor foi realizada através da técnica de Clonagem independente da sequência e ligação (*Sequence and Ligation Independent Cloning* - SLIC), seguindo o protocolo do grupo Oldham, adaptado de GAY et al., 2014. A reação ocorreu pela diluição de 2 µL do vetor (pET28b), 4 µL do *insert*, 1 µL do tampão NEB 2.1 (New England Buffer™) 10X (50 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl₂; 100 µg/ml BSA (Albumina Sérica Bovina, do inglês *Bovine Serum Albumin*); pH 7.9), 0,5 µL de Ditioneitol (DTT) (Sigma-Aldrich) (100 µM), 0,2 µL de T4 DNA polimerase em 2,3 µL de água deionizada. A cauda proteica de polihistidina (*His-tag*) (*N*-His6) foi utilizada como marcadora das sequências genéticas. Em seguida, a mistura foi incubada por 2,5 minutos a temperatura ambiente e por 10 minutos em banho de gelo. Desta forma, foi gerada uma proteína recombinante com a sequência MGSSHHHHSHSGLVPRGS-*insert*.

3.4.2.2 Transformação em *E. coli* (XL1 Blue)

O vetor com o *insert* ligado (5 µL) foi transformado em *E. coli* através de choque térmico a 42 °C por 30 segundos. A mistura foi adicionada ao meio de cultura LB (Luria Bertani) (900 µL) sem antibiótico e incubado por 1 hora a 37 °C. O cultivo celular foi centrifugado a 3000 xg por 1,5 minuto. O sobrenadante foi reservado e o pellet celular foi ressuspensão. As células foram semeadas em placas

de petri contendo ágar, meio de cultura LB e canamicina. As placas foram incubadas a 37 °C durante 14 horas. Colônias positivas foram selecionadas para amplificação em PCR (*Colony PCR*), seguindo o protocolo do grupo Oldham, no qual cada colônia foi ressuspensa em água estéril em um tubo de 50 µL e estocada em banho de gelo. Separadamente, preparou-se um “Master Mix” pela diluição de 6 µL do tampão 10x Tag, 1,2 µL da solução dNTP mix, 1,2 µL do T7 *Promotor*, 1,2 µL do T7 *Terminator*, 0,3 µL da Taq polimerase em 50 µL de água deionizada. Em seguida, adicionou-se um pequeno volume da suspensão bacteriana em um tubo de PCR contendo 10 µL do “master mix”. Após as transformações, ressuspendeu-se novamente e descartou-se a ponteira. Retirou-se a solução do banho de gelo e iniciou-se o programa de PCR, no termociclador, com desnaturação inicial a 95 °C por 3 min e extensão final a 68 °C por 10 min, de acordo com a tabela abaixo:

30 Ciclos	T °C	Tempo
Desnaturação	95	15s
Anelamento	50	30s
Extensão	68	60s

Em seguida, adicionou-se 2 µL de 6x SDS (Dodecil Sulfato de Sódio, do inglês, *Sodium Dodecyl Sulfate*) e realizou-se a análise em gel de agarose 1 %. Aquelas com números de bases correspondentes às proteínas estudadas foram enviadas para sequenciamento. Depois de confirmadas as sequências, as colônias nas quais a transformação ocorreu com sucesso foram usadas nas etapas subsequentes de crescimento celular e expressão proteica. Além disto, uma alíquota foi usada para preparar uma solução estoque (15 % de glicerol), que foi instantaneamente congelada com nitrogênio líquido e armazenada a -80 °C.

3.4.2.3 Expressão e reenovelamento (*refolding*) das OBPs

O meio de cultura 2xYT (2x *Yeast extract-Tryptone (YT) medium*) (Fischer Chemical) foi preparado pela dissolução de 18,6 g do meio em 600 mL de água destilada. A solução estoque de sulfato de canamicina (Gibco™) foi preparada pela dissolução de 0,6 g em água deionizada, completando-se o volume até 20 mL. Reservaram-se alíquotas de 650 µL dessa solução e congelou-se com nitrogênio

líquido, armazenando-se em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. O meio de cultura LB (Luria Bertani) (Sigma-Aldrich) foi preparado pela dissolução de 4 g do meio em 200 mL de água destilada e, a essa solução, foram adicionados 200 μL da solução estoque de canamicina. A solução estoque de IPTG a 1 M foi preparada pela dissolução de 2,383 g do composto em água deionizada a um volume final de 10 mL (alíquotas de 1000 μL foram congeladas com nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$)

A solução estoque de tampão tris a 1 M foi preparada pela dissolução de 6,06 g de tris em água deionizada, variando o volume de hidróxido de sódio (NaOH) (Fisher Chemical) 0,2 M até que fosse atingido pH $8,1 \pm 0,1$ desejado e completando-se o volume até 50 mL. A solução estoque de cloreto de sódio (NaCl) (Fischer Chemical) a 5 M foi preparada dissolvendo-se 14,61 g de NaCl em água deionizada, completando-se o volume até 50 mL. A solução tampão estoque de tris a 100 mM foi preparada diluindo-se 500 μL de tris (1 M) em 4500 μL de água deionizada. A solução de ureia (Sigma-Aldrich) a 8 M foi preparada pela dissolução de 2,40 g de ureia em água deionizada, completando-se o volume até 5 mL. A solução de Ditiotreitól (DTT) (Sigma-Aldrich) a 10 M foi preparada pela dissolução de 7,71 mg de DTT em tampão tris (100 mM), completando-se o volume até 5 mL.

- Tampão de lise (TBS) (25 mM Tris; 500 mM NaCl, pH 8)

Foi preparado diluindo-se 1,25 mL de tris (1 M) em 5 mL de NaCl (5 M) e completando-se o volume até 50 mL com água deionizada.

- Tampão de solubilização (TBS + 0.2 % Triton X-100, pH 8)

Foi preparado diluindo-se 40 μL de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) em TBS, completando-se o volume até 20 mL.

- Tampão de reenovelamento (TBS + 5:0,5 mM GSH:GSSG, pH 8)

Foi preparado dissolvendo-se 0,0415 g de GSH (Sigma-Aldrich) e 0,0083 g de GSSG (Sigma-Aldrich) em TBS, completando-se o volume até 27 mL.

3.4.2.4 Purificação das OBPs

A solução estoque de imidazol (Sigma-Aldrich) a 4 M foi preparada pela dissolução de 13,62 g deste composto em água deionizada e o volume completado para 50 mL. A solução estoque de cloreto de cálcio (CaCl_2) (Fisher Chemical) a 500 mM foi preparada dissolvendo-se 2,77 g de CaCl_2 em água deionizada até o volume

final de 50 mL. A solução 20 % de etanol foi preparada diluindo-se 20 mL de etanol (≥ 99.5 %) em 80 mL de água deionizada. As soluções tampão apresentadas a seguir, foram preparadas a partir das soluções estoque e diluídas em TBS, pH 8.

Tampão	Solução estoque	Volume para diluição (μL)	Volume final (mL)
Tampão de ligação (25 mM imidazol, TBS)	4 M Imidazol	312,5	50
Tampão de eluição (500 mM imidazol, TBS)	4 M Imidazol	6250	50
Tampão de clivagem (10 mM CaCl_2 , TBS)	500 mM CaCl_2	800	40

- O tampão de troca (50 mM Fosfato monopotássico (KH_2PO_4); 150 mM NaCl, 10 % glicerol, pH 7,4) foi preparado diluindo-se 0,34g de KH_2PO_4 , 1500 μL da solução estoque de NaCl (5 M) e 5mL de glicerol em TBS e o volume completado para 50 mL.

3.4.2.5 Eletroforese em gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (15%) (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) (SDS-PAGE)

Toda metodologia de SDS-PAGE foi realizada de acordo com Laemmil (1970). Alíquotas de 10 μL 6X SDS foram preparadas como na tabela abaixo:

Reagente	Concentração
Tris-HCl	80 mM
SDS	2%
Glicerol	10%
Azul de bromofenol	0,0006%
DTT	0,1 M

A solução estoque de Persulfato de amônio (APS) (10 %) (Sigma-Adrich) foi preparada pela dissolução de 2 mg em 20 μL de água deionizada.

Os tampões de resolução e de empilhamento foram preparados conforme apresentado na tabela abaixo:

	Volume (μL)	
	Gel de resolução (15%; 5 mL)	Gel de empilhamento (3%; 2 mL)
Água deionizada	1770	1185
40% acrilamida	1875	150
1,5 M Tampão Tris (pH 8.8)	1250	-
0,5 M Tampão Tris (pH 6.8)	-	250
10% Tampão SDS	50	25
10% APS	50	25
TEMED (Tetrametiletilenodiamina)	5	3

3.5 Procedimentos

3.5.1 Expressão e reenovelamento das OBPs

3.5.1.1 Expressão em BL21 (DE3)

Este método foi realizado de forma rápida e estéril para maximizar a eficiência da transformação.

Foram reservados dois frascos erlenmeyer (2000 mL) e adicionados 600 mL do meio de cultura 2xYT para cada um deles, então deixou-se autoclavando durante 14 horas. Paralelamente, realizou-se uma raspagem da cepa (estocada em glicerol) da OBP apropriada (HarmPBP1 ou HarmGOBP1) com ponta de uma ponteira, a qual foi inserida em um tubo falcon contendo 13 mL do meio LB + canamicina, incubando-se sob agitação a 37 °C. Após 14 horas de incubação, foram adicionados a cada erlenmeyer autoclavado 5 mL do material celular que foi deixado para crescimento em tubo falcon, contendo a OBP apropriada. Adicionou-se também 600 μL de canamicina, então, incubou-se novamente a 37 °C sob agitação. Após ~ 2 horas de incubação, realizou-se a primeira leitura da densidade óptica (OD_{600}), retornando a incubar a 37 °C sob agitação até que fosse atingido $\text{OD}_{600} \sim 0,7$ para ambas OBPs. Em seguida, foram adicionados, em cada frasco, 600 μL do indutor (de galactosidase) IPTG e 2 gotas de Antifoam 204 (Sigma-Aldrich), incubando-se novamente a 37 °C sob agitação por 3 h. O material celular foi então centrifugado durante 15 minutos a 3500 xg e 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e as células sedimentadas foram coletadas, reunidas, pesadas e estocadas a -20 °C.

3.5.1.2 Desnovelamento

As células estocadas foram ressuspensas com 10 mL do tampão de lise (TBS) previamente resfriado. A suspensão foi incubada em banho de gelo por 10 minutos e submetida a lise, realizando-se 8 ciclos de 10 segundos sonicando e 30 segundos em banho de gelo. Nesta etapa, retirou-se uma alíquota de 1 μ L e reservou-se para posterior eluição em gel (15 %). Transferiu-se o material celular para tubos de centrifugação e centrifugou-se durante 30 minutos a 35000 xg e 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 10 mL do tampão de solubilização (TBS + 0,2 % Triton X-100) previamente gelado. Repetiu-se o processo de sonicação, centrifugação e ressuspensão duas vezes e então foram adicionadas às células 1,5 mL da solução de ureia (8 M) e 1,5 mL da solução de DTT (10 mM), incubando-se a temperatura ambiente por 1 hora. Novamente retirou-se uma alíquota de 1 μ L da fração sobrenadante e reservou-se para posterior eluição em gel (15 %).

3.5.1.3 Reenovelamento

Após o período de 1 hora de incubação a temperatura ambiente, foram adicionados 27 mL do tampão de reenovelamento e incubou-se durante 14 horas. Após as 14 horas, retirou-se uma alíquota de 1 μ L da fração sobrenadante e reservou-se para posterior eluição em gel (15 %). Centrifugou-se a 35000 xg por 10 minutos a 4°C. Filtrou-se o sobrenadante utilizando filtros de seringa com poro de 0,22 μ M e reservou-se para a etapa de purificação.

3.5.2 Purificação e troca de tampão

Lavou-se a coluna [HisGravTrap (Ni²⁺) 1 mL] com 10 mL de água deionizada. Subsequentemente, ambientou-se a coluna com 10 mL do tampão de ligação, e em seguida, eluiu-se a proteína (HarmPBP1 ou HarmGOBP1), descartando-se o eluido. Subsequentemente adicionou-se 10 mL do mesmo tampão, coletando-se 3 frações de 1 mL em eppendorf. Adicionou-se de 10 mL do tampão de eluição, coletando-se mais 3 frações de 1 mL em eppendorf. Lavou-se a coluna com 10 mL de água deionizada e, em seguida, com 10 mL de etanol a 20 %.

Em outra coluna (HisTrap 5 mL) prosseguiu-se com a purificação com posterior troca de tampão.

Na etapa de purificação, lavou-se a coluna com 25 mL de água deionizada e ambientou-se com 25 mL do tampão de clivagem, então eluiu-se 2,5 mL das 3 últimas frações coletadas anteriormente [da coluna de Níquel (Ni^{2+})]. Adicionou-se à coluna 5 mL do mesmo tampão de clivagem, coletando-se imediatamente 3 frações de 1 mL. Lavou-se a coluna com 25 mL de água deionizada e, em seguida, com 5 mL de etanol a 20 %.

Na etapa de troca de tampão, o processo foi o mesmo, contudo o tampão utilizado foi o tampão de troca iônica.

3.5.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (15 %) (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) (SDS-PAGE)

Para o gel de separação proteica, foi preparada uma solução contendo 1226 μL de água deionizada, 1250 μL de tampão de resolução, 2499 μL de protogel, 20 μL de APS (10 %) e 5 μL de TEMED. Esta solução foi transferida para uma placa de vidro (1.0 mm; 5 mL) e foi adicionado aproximadamente 1 mL de isopropanol (50 % (v/v) solução aquosa) para remoção das bolhas formadas na placa. Após 20 minutos, foi preparada uma nova solução para o gel de empilhamento. A solução continha 775 μL de água deionizada, 1000 μL do tampão de empilhamento, 200 μL de protogel, 20 μL de APS (10 %) e 5 μL de TEMED. Em seguida, removeu-se o isopropanol da placa de vidro e adicionou-se a nova solução. Um molde de plástico em forma de pente com 15 dentes foi inserido na parte superior da placa, para a formação de poços que foram usados para adicionar as amostras após a polimerização do gel. Enquanto aguardava-se a polimerização do gel, as amostras foram preparadas pela adição de 2 μL de 6x SDS em cada alíquota de 10 μL das frações da amostra, então, incubou-se a 90 °C por 5 minutos.

Após 25 minutos e a incubação das frações da amostra, o molde de plástico foi retirado da placa. Com a formação dos poços visíveis, um marcador (*ladder*) apropriado foi inserido na primeira coluna da placa, seguido de 10 μL das frações da amostra, nas colunas subsequentes. A placa de vidro foi transferida para a cuba de eluição do gel (contendo o kit *buffer dam*).

3.5.4 Digestão peptídica com a trombina

Em um eppendorf, adicionou-se 300 μ L de trombina e 200 μ L de tampão de clivagem. Centrifugou-se a 500 xg durante 2 minutos a 5 °C. Descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 600 μ L do mesmo tampão e centrifugou-se, repetindo-se esse processo duas vezes. Após descarte do sobrenadante, ressuspendeu-se a resina pela adição de 300 μ L do tampão de clivagem 10x (fornecido no kit). Dessa suspensão, foram distribuídos 100 μ L em 3 novos eppendorfs e adicionados a eles as frações de 1 mL da proteína. Então, deixou-se no oscilador, até completa clivagem. A resina foi recuperada e estocada em 50 % glicerol e 50 % 10 mM Tris-HCl e as frações foram reservadas para medida da concentração no nanodrop.

3.5.5 Nanodrop

Foi retirado 1,5 μ L de cada fração e inserido no equipamento, para leitura da concentração em mg/mL. Em seguida, com as concentrações conhecidas, as frações das proteínas (HarmPBP1 e HarmGOBP1) foram diluídas utilizando o tampão de troca, instantaneamente congeladas com nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C.

3.6 Preparo das amostras para análise

3.6.1 Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados neste trabalho são de grau analítico de pureza, exceto a acetonitrila (ACN) que é grau LC-MS. As soluções foram preparadas com água deionizada (18,2 M Ω ·cm) obtidas a partir de purificador Millipore (Epsom, UK).

O tampão de eluição (80% ACN) foi preparado pela adição de 16 mL de ACN (Fisher Chemical), 20 μ L de ácido fórmico (AF) (Sigma-Aldrich) e o volume foi completado até 20 mL com água deionizada. O tampão de lavagem (5 % MeOH) foi preparado pela adição de 1 mL de metanol (MeOH) grau HPLC (Fisher Chemical) e 20 μ L de ácido trifluoroacético (TFA) (Sigma-Aldrich) em 19 mL de água deionizada. A solução estoque de AF a 1 % foi preparada pela diluição de 1 μ L de AF em 99 μ L de água deionizada. O tampão de eluição (80 % ACN) foi preparado pela adição de

800 μL de ACN e 1 μL de AF em 199 μL de água deionizada; O tampão de lavagem (5 % ACN) foi preparado pela adição de 50 μL de ACN e 1 μL de AF em 949 μL de água deionizada.

3.6.2 Preparação das amostras usando ZipTip® para confirmação das OBPs

À cada eppendorf contendo uma alíquota de 10 μL das amostras foi adicionado 1 μL de TFA a 1 %. Separadamente, foram reservados eppendorfs contendo 5 μL do tampão de eluição. A ZipTip foi preparada fazendo-se uma lavagem com tampão de eluição (3 vezes), seguido pelo condicionamento da coluna, com o tampão de lavagem (5 vezes). Subsequentemente, as amostras foram adsorvidas na coluna (20 vezes) e lavadas outras 20 vezes usando o tampão de lavagem. Por fim, eluiu-se (5 vezes) as amostras nos 5 μL reservados em eppendorf inicialmente e imediatamente analisadas por espectrometria de massas.

3.6.3 Reação de troca de hidrogênio-deutério (HDX)

A solução estoque de tampão fosfato a 0,1 M foi preparada pesando-se 77,385 mg de fosfato dissódico (Na_2HPO_4) (Sigma-Aldrich) e 13,125 mg de fosfato monossódico (NaH_2PO_4) (Sigma-Aldrich) em 3 mL de água deionizada. A solução estoque de tampão fosfato deuterado a 0,1 M foi preparada pesando-se 77,385 mg de Na_2HPO_4 e 13,125 mg de NaH_2PO_4 em 3 mL de Óxido de deutério (99 atom % D) (D_2O) (Sigma-Aldrich). O pH das duas soluções foi ajustado para 7,4.

A solução estoque de mioglobina (Mb) (Sigma-Aldrich) a 100 mM foi preparada dissolvendo-se 1,7 mg de Mb em 1 mL de água deionizada.

- Desnaturantes

A solução estoque de Ureia-d4 (99 atom % D) (Sigma-Aldrich) a 8 M foi preparada pela dissolução de 256,32 mg em 500 μL de tampão fosfato deuterado (0,1 M; pH ~ 7,4). A solução estoque de Ureia-d4 (99 atom % D) a 9 M foi preparada pela dissolução de 576,72 mg em 1 mL de tampão fosfato deuterado (0,1 M; pH ~ 7,4). Preparou-se uma solução estoque de cloreto de guanidínio deuterado (GdmCl-d_6) dissolvendo-se 3 g de GdmCl (Sigma-Aldrich) em 10 mL de D_2O (Sigma-Aldrich) e transferindo-se a solução para balão de fundo redondo (100 mL).

Incubou-se a solução por 25 minutos e em seguida, congelou-se com nitrogênio líquido e a água removida em um liofilizador (*power dry*) a $-110\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 24 horas. No dia seguinte, ressuspendeu-se a solução em $\sim 12\text{ mL}$ de D_2O e repetiu-se o processo. Desse processo, foi coletado 2,71 g de GdmCl-d6 (85 %), então, pesou-se 0,069 g e diluiu-se em 1 mL de tampão fosfato deuterado (0,1 M; pH $\sim 7,4$) para obter uma concentração de 6 M.

3.6.4 Fluorescência

A solução estoque da sonda fluorescente a 1 mM foi preparada pela dissolução de 2,19 mg de N-fenil-1-naftilamina (1-NPN) (Sigma-Aldrich) em 10 mL de MeOH. As soluções de proteína (HarmPBP1 ou HarmGOBP1) a 2 μM foram preparadas pela diluição da proteína em 998 μL de Tris-HCl (25 mM).

- Ligantes

A solução estoque de *cis*-11-hexadecenal (Z11-16:Al) a 0,5 M foi preparada pela diluição de 62 μL do composto em 438 μL de MeOH. A solução estoque de salicilaldeído a 0,5 M foi preparada pela diluição de 26,60 μL do composto em 473,40 μL de MeOH. A solução estoque de benzaldeído (BnAL) a 0,5 M foi preparada pela diluição de 25,40 μL do composto em 474,60 μL de MeOH. A solução estoque de Naftaleno a 0,5 M foi preparada pela dissolução de 0,03204 g do composto em MeOH até o volume final de 500 μL . A solução estoque de 2-Naftol a 0,5 M foi preparada pela dissolução de 0,03604 g do composto em MeOH até o volume final de 500 μL . A solução estoque de 2-metóxi-1-naftoquinona foi preparada pela dissolução de 0,047 g do composto em MeOH até o volume final de 500 μL .

Todas as soluções estoque dos ligantes foram novamente diluídas para concentração final de 1 mM, perfazendo o volume final de 1 mL, cada.

3.7 Espectrometria de massas (EM) de troca de hidrogênio deutério (HDX)

No método descrito a seguir, a mioglobina foi utilizada como proteína modelo. Ao final da otimização, o método foi aplicado para a mioglobina, para HarmPBP1 e para a complexação entre a HarmPBP1 e o ligante *cis*-11-hexadecenal (Z11-16:Al).

3.7.1 Otimização do método

A fim de garantir que o desnaturante fosse diluído na concentração adequada, a ordem de adição dos reagentes foi estabelecida na seguinte sequência:



- 1° Desnaturante
- 2° Tampão
- 3° Proteína
- 4° *Quenching*

Durante o tempo de incubação estabelecido para a reação de troca (HDX) a ZipTip foi preparada fazendo-se uma lavagem com tampão de eluição (3 vezes), seguido pelo condicionamento da coluna com o tampão de lavagem (5 vezes). As amostras foram adsorvidas na coluna (20 vezes) e lavadas outras 20 vezes usando o tampão de lavagem. Seguindo-se a eluição das amostras (5 vezes) em 5 μ L do tampão de eluição, reservados em eppendorfs no início do experimento e imediatamente analisadas por espectrometria de massas em SYNAPT HDMS™.

As reações de troca foram realizadas de forma individual com subsequente análise, para minimizar a ocorrência de “troca reversa”. Foi realizada uma breve avaliação do tempo de incubação que inicialmente ocorreu com 5 minutos e posteriormente ficou definido em 15 minutos, pela observação de melhora na performance do método, todos os experimentos de cada avaliação foram realizados no mesmo dia para garantir a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados.

3.7.1.1 Avaliação dos tampões de lavagem e de eluição

- Tampão de lavagem (5% MeOH + TFA) / Tampão de eluição (80% ACN + FA)
A reação de troca foi interrompida pela adição de ácido trifluoroacético (TFA) a 1 %.
- Tampão de lavagem (5% ACN + AF) / Tampão de eluição (80% ACN + AF)
A reação de troca foi interrompida pela adição de ácido fórmico (AF) a 1 %.

Foram reservados 4 eppendorfs contendo 5 μ L dos respectivos tampões de eluição. Sendo 2 eppendorfs para avaliação usando TFA a 1 % e 2 eppendorfs para avaliação usando AF a 1 %.

Em outros 4 eppendorfs, foram adicionados:

Eppendorf 1 e 2) 19 μL de tampão fosfato (D_2O)

Eppendorf 3 e 4) 19 μL da Ureia-d4 (8,55 M)

Subsequentemente foram adicionados aos ependorfs 1 μL de mioglobina a 100 μM , incubando-se em banho de gelo por 5 minutos. Em seguida, a reação de troca foi interrompida pela adição de 2 μL de TFA ou FA a 1 %.

As amostras foram adsorvidas em ZipTip, lavadas com tampão de lavagem e eluídas com tampão de eluição como descrito no item **3.7.1**.

3.7.1.2 Avaliação do desnaturante

Para a avaliação dos desnaturantes Ureia-d4 (9 M) e GdmCl-d6 (6 M), foram reservados inicialmente 16 ependorfs contendo 5 μL do tampão de eluição.

Em outros 4 ependorfs, foram adicionados:

Eppendorf 1 e 2) 19 μL de tampão fosfato (H_2O)

Eppendorf 3 e 4) 19 μL de tampão fosfato (D_2O)

Em outros 6 ependorfs, foram adicionados a Ureia-d4 (9 M) nas concentrações:

Ureia-d4 (M)	1,35	3,15	4,95	6,75	8,10	8,55
Ureia-d4 (μL)	3	7	11	15	18	19
Tampão fosfato (D_2O) (μL)	16	12	8	4	1	0

Em outros 6 ependorfs, foram adicionados a GdmCl-d6 (6 M) nas concentrações:

GdmCl-d6 (M)	1,20	2,10	3,00	3,90	5,40	5,70
GdmCl-d6 (μL)	4	7	9	6	1	0
Tampão fosfato (D_2O) (μL)	15	12	10	13	18	19

Para cada concentração dos desnaturantes e aos demais ependorfs foram adicionados, subsequentemente 1 μL de mioglobina a 100 μM , incubando-se em banho de gelo por 15 minutos. Em seguida, a reação de troca foi interrompida pela adição de 2 μL de TFA a 1 %.

As amostras foram adsorvidas em ZipTip, lavadas com tampão de lavagem e eluídas com tampão de eluição como descrito no item **3.7.1**, utilizando-se os tampões de lavagem (5 % MeOH + TFA) e de eluição (80 % ACN + FA).

3.7.1.3 Aplicação do método em mioglobina e HarmPBP1

O método foi aplicado para as duas proteínas, usando GdmCl-d6 (6 M) como desnaturante e tampão Tris-HCl (50 mM) nas diluições.

Para a análise com a mioglobina, preparou-se inicialmente as diluições de GdmCl-d6 (6 M) em triplicata, como segue abaixo:

GdmCl-d6 (M)	0,60	1,20	1,50	1,80	2,10	3,00	3,90	5,40	5,70
GdmCl-d6 (μL)	6	12	15	18	21	30	39	54	57
Tampão Tris-HCl (D ₂ O) (μL)	51	45	42	39	36	27	18	3	0

Cada ponto das diluições foi dividido em 3 eppendorfs. Em seguida foram reservados 3x 11 eppendorfs contendo 5 μL do tampão de eluição.

Em outros (3x) 2 eppendorfs, foram adicionados:

19 μL de tampão Tris-HCl (H₂O)

19 μL de tampão Tris-HCl (D₂O)

Para a análise com a HarmPBP1 a 50 μM, preparou-se inicialmente as diluições de GdmCl-d6 (6 M) em duplicata, como segue abaixo:

GdmCl-d6 (M)	0,60	1,50	2,10	2,70	3,60	4,20
GdmCl-d6 (μL)	4	10	14	18	24	28
Tampão Tris-HCl (D ₂ O) (μL)	34	28	24	20	14	10

Em outros (2x) 2 eppendorfs, foram adicionados:

19 μL de tampão Tris-HCl (H₂O)

19 μL de tampão Tris-HCl (D₂O)

Ao final das diluições, foram adicionados a todos eppendorfs (individualmente e subsequentemente), 1 μL da mioglobina a 100 μM, incubando-se em banho de gelo por 15 minutos. A reação de troca foi interrompida pela adição de 2 μL de TFA

a 1 %. As amostras foram adsorvidas em ZipTip, lavadas com tampão de lavagem e eluídas com tampão de eluição como descrito no item **3.7.1**, utilizando-se os tampões de lavagem (5 % MeOH + TFA) e de eluição (80 % ACN + FA).

3.7.1.4 Avaliação da HarmPBP1 com o ligante *cis*-11-hexadecenal (Z11-16:Al)

Em 1 eppendorf contendo 19 μ L da HarmPBP1 (50 μ M) foi adicionado 1 μ L do ligante Z11-16:Al (~ 4 mM), incubando-se por 30 minutos a temperatura ambiente.

Paralelamente, em (2x) 8 eppendorfs, as curvas foram preparadas pela diluição do desnaturante nas concentrações:

GdmCl-d6 (M)	0,60	1,50	2,10	2,40	2,70	3,60	4,20	5,70
GdmCl-d6 (μ L)	2	5	7	8	9	12	14	19
Tampão Tris-HCl (D ₂ O) (μ L)	17	14	12	11	10	7	5	0

A cada curva, foram reservados 10 eppendorfs contendo 5 μ L do tampão de eluição.

Em outros (2x) 2 eppendorfs, foram adicionados:

19 μ L de tampão Tris-HCl (H₂O)

19 μ L de tampão Tris-HCl (D₂O)

Ao final das diluições, foram adicionados a todos os eppendorfs (individualmente e subsequentemente), 1 μ L da HarmPBP1 a 50 μ M ou 1 μ L da HarmPBP1 (50 μ M) + Z11-16:Al, incubando-se em banho de gelo por 15 minutos. A reação de troca foi interrompida pela adição de 2 μ L de TFA a 1%. As amostras foram adsorvidas em ZipTip, lavadas com tampão de lavagem e eluídas com tampão de eluição como descrito no item **3.7.1**, utilizando-se os tampões de lavagem (5 % MeOH + TFA) e de eluição (80 % ACN + FA).

3.8 Fluorescência

3.8.1 Medições de fluorescência

As medidas foram realizadas utilizando 1 mL como volume final das reações.

As configurações das medidas de fluorescência estão apresentadas abaixo:

Configuração	Fluorescência intrínseca (Triptofano)	Sonda fluorescente (1-NPN)
Excitação (λ)	280 nm	337 nm
Emissão (λ)	290 – 450 nm	350 – 600 nm
Fenda de excitação (λ)	5.0 nm	5.0 nm
Fenda de emissão (λ)	5.0 nm	5.0 nm

3.8.2 Fluorescência intrínseca

Foi realizado previamente um teste utilizando os ligantes sem adição da sonda fluorescente (1-NPN), para verificar se algum dos compostos já apresentava fluorescência. Neste caso, foi adicionado à cubeta 1 mL da solução de Tris-HCl a 25 mM e realizada a primeira medição. Em seguida, a proteína (HarmPBP1 ou HarmGOBP1) foi diluída nesta solução, para uma concentração final de 2 μ M, e foi realizada a segunda medição. A seguir, as medidas foram registradas para cada alíquota de 2 μ L do ligante (1 mM) desejado adicionada.

Após verificar a possível fluorescência dos compostos, a saturação das OBPs foi medida pela titulação da amostra da proteína (HarmPBP1 ou HarmGOBP1) com a 1-NPN. Desta forma, foram adicionadas à cubeta 1 mL da solução de Tris-HCl a 25 mM e realizada a primeira medição. Em seguida, a proteína (HarmPBP1 ou HarmGOBP1) foi diluída nesta solução, para uma concentração final de 2 μ M e foi realizada a segunda medição. Então, foram adicionados 2 μ L da 1-NPN para a terceira medição. Por fim, as medidas foram registradas para cada alíquota de 2 μ L do ligante (1 mM) desejado adicionada, até a concentração final de 22 μ M.

3.8.3 Sonda fluorescente

A curva de calibração da 1-NPN foi realizada pela adição de 1 mL da solução de Tris-HCl a 25 mM na cubeta, gravando-se a primeira medição. Em seguida, a proteína (HarmPBP1 ou HarmGOBP1) foi diluída nesta solução, para uma concentração final de 2 μ M e foi realizada a segunda medição. Então, foram adicionadas alíquotas de 2 μ L da 1-NPN até concentração final de 22 μ M. O aumento da intensidade de fluorescência foi gravado a 330 nm.

3.9 Resultados e discussão

De acordo com os resultados das análises de sequências de nucleotídeos realizadas pela Unidade de Sequenciamento de DNA (Universidade de Nottingham), as identidades das proteínas foram confirmadas, sendo elas:

Pheromone Binding Protein 1 (PBP1) de *Helicoverpa armigera* (16,49 kDa):
 mgs shhhhhhssg **lvprgs** hmASQDVIKNLSMNFAPLEDCCKEMDLPDSVTTDFYNFWKEGYEFTNRQTGCAI
 LCLSSKLELLDQELKLHHGKAQEF AKKHGADDAMAKQLVDLIHGCAQSTPDVADDPCMKT LNVAKCFKAKIHEL
 NWAPSMELVVGEVLAEV

General Odorant Binding Protein 1 (GOBP1) de *Helicoverpa armigera* (17,04 kDa):
 mgs shhhhhhssg **lvprgs** hmKDVTLGFGQALDKREESQLTEEKMEEFFHFWRDDFKFEHRELGCAIQCMSRH
 FNLLTDSSRMLHDNAEKFIQSPNGEVLARQMVELIHSCEKQFDHEDDHCWRILHVAECFKGSCVQRGIAPSME
 LMMTELIMEAESR

Após essa confirmação, as amostras foram expressas e purificadas. Observando as sequências geradas, podemos perceber que o vetor de expressão pET-28 usado na etapa da clonagem foi eficiente para a codificação do sítio de clivagem da trombina entre a cauda de histidina e a sequência de interesse. Portanto, a purificação ocorreu em duas etapas e foi facilitada pela presença do marcador de histidina (6xHis-tag); e um sítio de clivagem da trombina, destacado em vermelho na apresentação das sequências das proteínas acima, que reconhece a sequência de Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser, clivando a ligação peptídica entre Arg e Gly (HEFTI, et al., 2001). Sendo que em cada etapa deste processo foi retirada uma alíquota das amostras, a fim de comprovar a presença das proteínas. Para isto, as análises foram realizadas por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) e Espectros de Massas de proteínas intactas, garantindo com isso a qualidade dos experimentos, atestando a pureza e a presença de modificações pós-traducionais.

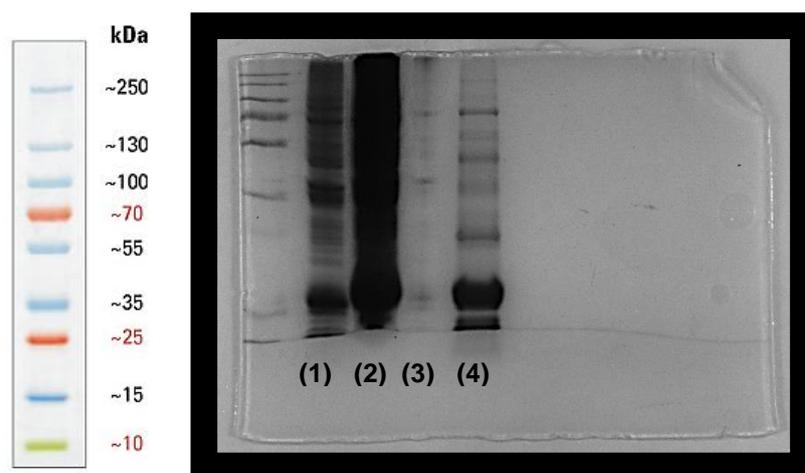
3.9.1 Análise das OBPs por SDS-PAGE (15 %) e Espectrometria de Massas (EM)

3.9.1.1 Confirmação das OBPs por SDS-PAGE (15 %)

Do *pellet* celular estocado após a expressão em *BL21 (DE3)*, deu-se início a etapa de lise celular, promovendo a liberação do conteúdo das células, incluindo as

proteínas de interesse, no meio aquoso extracelular (Fig. 58). Desta etapa, foi coletada a primeira alíquota (1). Em seguida, o novo *pellet* obtido foi ressuspensão em uma solução tampão Tris (pH 8) contendo Ureia e DTT para solubilizar a proteína de interesse (desnovelamento), de onde foi retirada a alíquota (2). Após 1 hora de incubação (temperatura ambiente) da etapa anterior, foi promovido o reenovelamento da proteína pela adição de glutatona reduzida e oxidada (GSH:GSSG) auxiliando na formação da ligação dissulfeto, que contribui significativamente para a estabilidade da conformação nativa da proteína, de onde foi retirada a alíquota (3) do sobrenadante, após 14 horas de incubação (temperatura ambiente) (ZHAI, et al., 2016). Por fim, a mistura foi filtrada e uma alíquota (4) foi coletada, seguindo-se para a etapa de purificação.

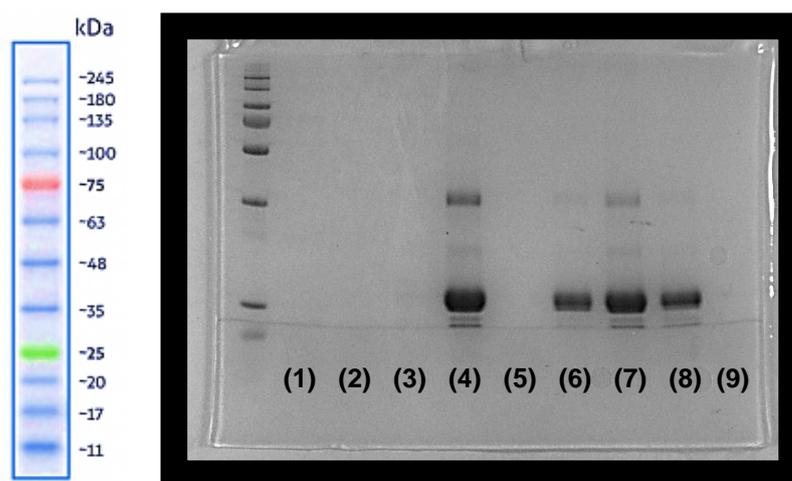
Figura 58 - Gel de eletroforese em Poliacrilamida SDS-PAGE (15 %) das etapas de desnovelamento e reenovelamento da HarmGOBP1. Etapas das alíquotas coletadas: (1) lise celular; (2) desnovelamento; (3) reenovelamento e (4) proteína alvo.



Tomando como referência o marcador de peso molecular, é possível observar a presença de intensidade na banda proteica entre 15 e 25 kDa (4), faixa de massa molecular esperada para a proteína alvo. Seguindo-se para a etapa de purificação, a proteína HarmGOBP1 fusionada à cauda de histidina foi submetida a cromatografia de afinidade a níquel. A coluna utilizada, HisGravTrap (Ni^{2+}), consiste de uma matriz sólida de agarose com grupos quelantes imobilizados carregados com íons Ni^{2+} , que permite a ligação às histidinas expostas da proteína (GE HEALTHCARE, 2007). Após ambientação da coluna com tampão de ligação contendo 25 mM de imidazol, a

proteína HarmGOBP1 foi eluída e foram coletadas alíquotas das 3 primeiras frações, fazendo-se com que a proteína ficasse ligada à coluna. Ao fim da purificação, um novo gel foi preparado com alíquotas de cada etapa (Fig. 59).

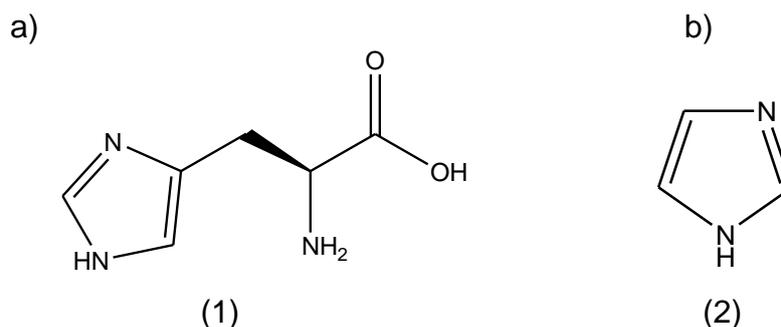
Figura 59 - Gel de eletroforese em Poliacrilamida SDS-PAGE (15 %) das etapas de purificação da HarmGOBP1. Etapas das alíquotas coletadas: (1), (2) e (3) retenção da proteína na coluna; (4) e (5) eluição da proteína; (6) e (7) clivagem; (8) proteína purificada e (9) final da etapa de purificação.



A ausência de bandas nas colunas (1), (2) e (3) na figura 33, confirma que a proteína foi retida na coluna.

Em seguida, adicionou-se nova solução do tampão de ligação contendo 500 mM de imidazol, pois o aumento da concentração de imidazol [Fig. 60 (1)] provoca competição pelos íons Ni^{2+} da resina, por conter radical semelhante ao da histidina [Fig. 60 (2)], favorecendo a liberação da proteína ligada (MALHOTRA, 2009).

Figura 60 - Moléculas com grupos similares que atuam competindo com os íons Ni^{2+} através da cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC). a) Histidina; b) Imidazol.



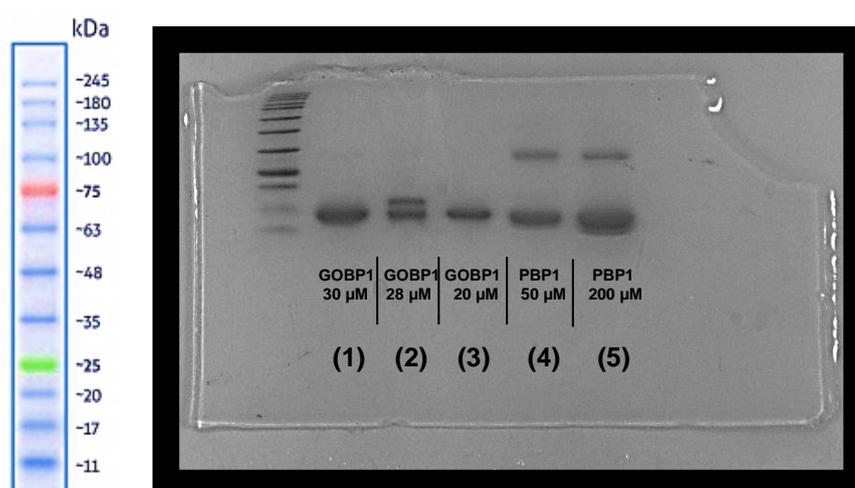
A alta concentração de imidazol levou assim, à eluição da proteína e as frações recolhidas [Figura 59 - colunas (4) e (5)] confirmaram a presença do metabólito com a faixa de massa esperada, de aproximadamente 17 kDa.

Após a purificação por meio da coluna de Ni^{2+} , foi necessário transferir a proteína a um tampão contendo CaCl_2 (tampão de clivagem), uma vez que o imidazol em alta concentração leva a inibição da clivagem da proteína (MALHOTRA, 2009). Com a ambientação do tampão de clivagem na coluna HisTrap, foram coletadas as frações (6) e (7) observadas na figura 59.

Assim, a amostra estava pronta para dar início a digestão por trombina, que foi adicionada para remoção da cauda de histidina (6xHis-tag). Tendo sido completada a clivagem, a trombina foi recuperada e armazenada. A fração (8) da figura 59 confirma que a proteína foi purificada, apresentando peso molecular esperado para essa proteína ~ 17 kDa. A coluna (9) da banda proteica indica que a proteína não estava presente na última fração coletada ao final de todo o processo.

Considerando a possibilidade de realizar os experimentos em replicatas e submeter as proteínas à complexação com uma larga gama de ligantes, foi necessário expressar as OBPs mais de uma vez. Na figura 61 estão apresentadas as bandas de cada proteína purificada.

Figura 61 - Gel de eletroforese em Poliacrilamida SDS-PAGE (15 %) das OBPs. Concentrações obtidas: HarmGOBP1 [(1) 30 μM ; (2) 28 μM ; (3) 20 μM]; HarmPBP1 [(4) 50 μM e (5) 200 μM].



Sabendo-se que as proteínas HarmGOBP1 e HarmPBP1 possuem massas 17,04 kDa e 16,49 kDa, respectivamente, era esperado que as bandas fossem reveladas no intervalo de 11 a 17 kDa, de acordo com o marcador de peso

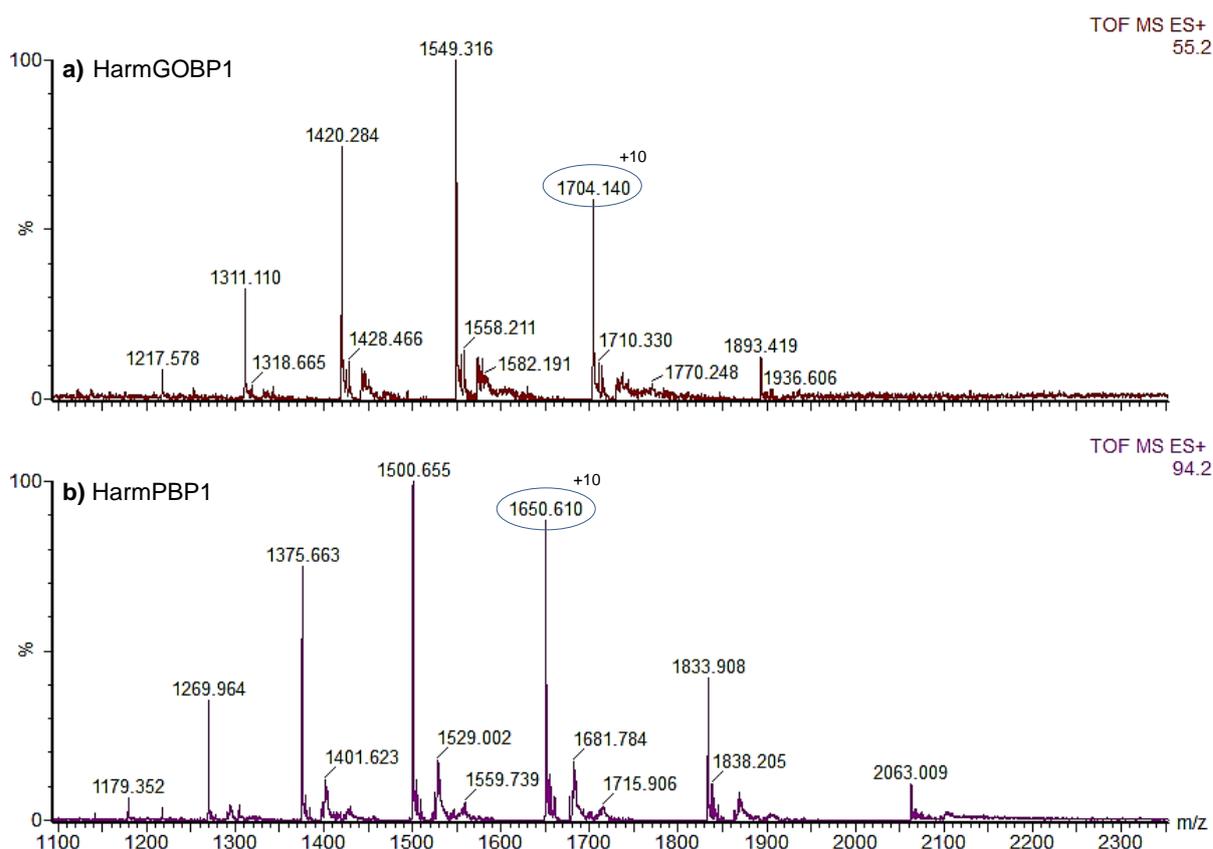
molecular de referência. Isto é o que observamos quando comparamos as bandas proteicas, evidenciando que as proteínas foram expressas e purificadas corretamente. As amostras foram analisadas por EM e estão apresentados a seguir.

3.9.1.2 Confirmação das OBPs por Espectrometria de Massas (EM)

A pureza das proteínas é essencial para que suas propriedades e atividades sejam determinadas. A confirmação das OBPs expressas por EM foi dada através da obtenção dos espectros de massas que estão apresentados na figura 62, corroborando com os resultados previamente observados por SDS-PAGE (15 %).

Figura 62 - Espectro de Massas das OBPs após digestão com a trombina.

a) HarmGOBP1; Massa ~ 17,03 kDa. b) HarmPBP1; Massa ~ 16,49 kDa.



Desta forma, as amostras purificadas presentes nas frações coletadas (de HarmGOBP1 e HarmPBP1) tiveram as concentrações das proteínas determinadas em um aparelho Nanodrop.

3.9.2 Espectrometria de massas (EM) de troca de hidrogênio deutério (HDX)

Neste trabalho, foi empregada a ionização por *Electrospray* (ESI) para a análise biomolecular. O processo bioquímico ocorreu em fase líquida e esta técnica de ESI permite a transferência de íons da solução para a fase gasosa, e análise por espectrometria de massas. O espectro de massas exibe a abundância (intensidade) relativa de cada íon com razão massa/carga (m/z) definidos. Dada a relativa facilidade com que as proteínas e peptídeos são protonadas a análise é realizada como íons carregados positivamente $[M+H]^+$ (STROOBANT, et al., 2013).

A principal vantagem do ESI em relação as outras técnicas é a necessidade de menor energia na qual a dessolvatação ocorre gradualmente (geralmente, de temperatura baixa até 80 °C) e portanto, não gera fragmentos nem forma íons a partir de moléculas neutras. Desta forma, íons gerados na fase gasosa mantêm a mesma estrutura e carga das espécies em solução (MORAES, et al., 2003).

O HDX ESI MS foi aqui empregado de forma que com o desdobramento da proteína, houve um aumento da região exposta ao solvente e, conseqüentemente, a marcação de isótopos dessa região. A molécula mantém sua marcação isotópica mesmo que retorne ao estado nativo e, por espectrometria de massas, é possível determinar a quantidade de troca entre os isótopos (^2H são substituídos por ^1H), em função das diferentes conformações (EYLES, et al., 2004).

3.9.2.1 Otimização do método

Tendo em vista que, entre as estratégias baseadas em espectrometrias, a espectrometria de massa de troca hidrogênio-deutério (HDX-EM) é um dos métodos analíticos mais robustos e promissores para o estudo da conformação e dinâmica de proteínas (DENG, et al., 2016) e sabendo que as interações proteína-ligante desempenham um papel fundamental nos processos biológicos, como sinalização celular e comunicação intracelular, o método discutido a seguir foi otimizado e aplicado para o estudo da complexação entre a proteína HarmPBP1 e o componente principal do feromônio de *H. armigera* (Z11-16:Al).

A mioglobina (Mb) foi selecionada como proteína modelo, por possuir massa de aproximadamente 16,90 kDa que é similar ao da proteína de estudo, por ser solúvel nos solventes utilizados e facilmente encontrada e disponível para compra,

além de possuir custo reduzido em relação a HarmPBP1, a qual é necessário expressar. Com isso, foram avaliados: (i) os tampões de lavagem e de eluição e *quenching*; (ii) o desnaturante; (iii) a aplicação do método com mioglobina e HarmPBP1; e em seguida, (iv) o método foi aplicado no estudo da mioglobina, da HarmPBP1 e da complexação da HarmPBP1 com o ligante (Z11-16:Al).

A razão massa/carga (m/z) das amostras foram obtidas por EM e a massa foi calculada de acordo com a equação:

$$\text{Massa} = (m/z \times z) - z$$

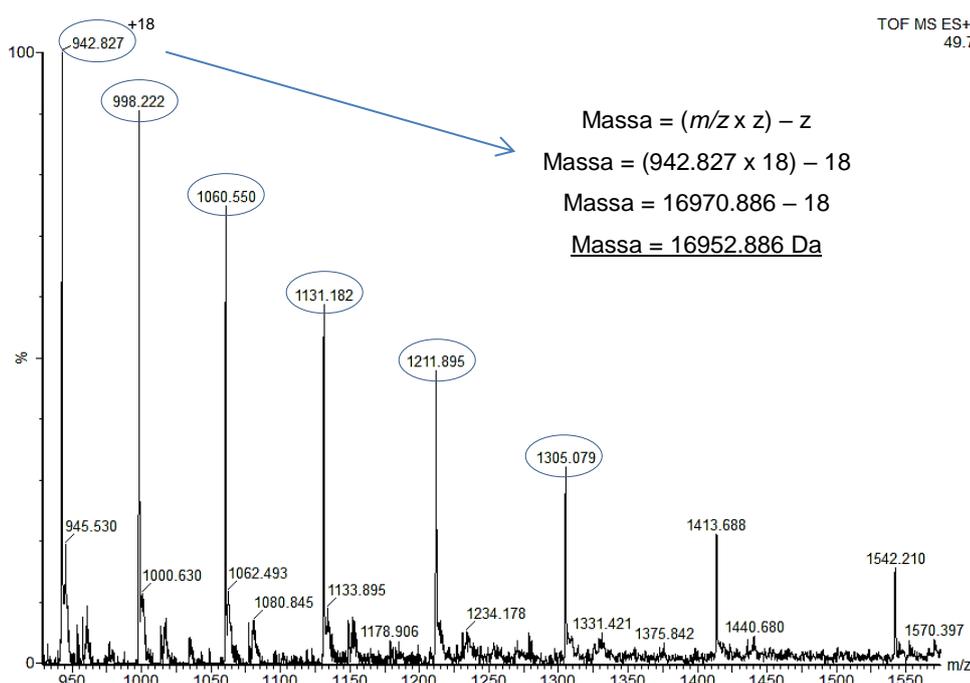
eq (2)

Fonte: adaptado de STROOBANT, et al., 2013

O peso molecular foi calculado da mesma forma para todos os espectros de massas e foi feito com os estados de carga obtidos (z) (Fig. 63). A determinação do estado de carga e o cálculo do peso molecular de dados de espectrometria de massas (EM) de ionização por *eletrospray* (ESI) de proteínas pode ser encontrado via *software* disponível *ESIprot Online* (WINKLER, 2010) (Fig.64).

O espectro de massas da Mioglobina a 5 μM , usada neste trabalho como proteína modelo (Fig. 60) ilustra o cálculo de massa encontrado, como esperado.

Figura 63 - Ampliação do Espectro de Massas da Mioglobina (mb) a 5 μM .



Em ESIprot, quanto mais valores de massas são inseridos, mais próximo do real é o valor obtido dos estados de carga e massa, com menor desvio padrão.

Figura 64 - Determinação do estado de carga e cálculo do peso molecular do espectro de massas obtido da amostra de Mioglobina a 5 μ M.

Input m/z values

m/z 1 (e.g. 1019.0):	942.827
m/z 2 (e.g. 1061.4):	998.222
m/z 3 (e.g. 1107.5):	1060.550
m/z 4 (e.g. 1157.8):	1131.182
m/z 5 (e.g. 1212.9):	1211.895
m/z 6 (e.g. 1273.5):	1305.079
m/z 7 (e.g. 1340.4):	
m/z 8 (e.g. 1414.8):	
m/z 9 (e.g. 1498.0):	
min charge (default: 1):	
max charge (default: 100):	

At least m/z 1 and m/z 2 must be provided

Clear m/z values

ESIprot Online calculation

INPUT

Charge min.: 1+

Charge max.: 100+

ESI positive mode, H⁺ ions

m/z	charge	MW [Da]	Error [Da]
942.827	18+	16952.752954438	0.076354783079296
998.222	17+	16952.648345858	-0.028253796815989
1060.550	16+	16952.681737278	0.0051376232804614
1131.182	15+	16952.619128699	-0.05747095661718
1211.895	14+	16952.426520119	-0.25007953651948
1305.079	13+	16952.930911539	0.25431188357834

Deconvoluted MW [Da]: 16952.676599655

Standard deviation [Da]: 0.16563329657773

Em HDX EM, ao comparar os níveis de captação de deutério em diferentes regiões de uma proteína, é possível obter informações sobre mudanças conformacionais e dinâmicas no sistema (OGANESYAN, et al., 2018). Assim, a taxa de troca (HDX) é determinada pela subtração da média da variação de massas obtida depois e antes da proteína exposta ao deutério e o gráfico é plotado a partir dessa comparação, de acordo com o aumento da concentração do desnaturante.

3.9.2.2 Avaliação dos tampões de lavagem e de eluição e *quenching*

Nesta primeira etapa da avaliação, foram observados a influência dos ácidos na resposta do método em função dos tampões de lavagem e de eluição, bem como o ácido utilizado na interrupção (*quenching*) da reação de troca quanto ao desnaturante e adição da proteína. Para essa avaliação, observou-se o comportamento reacional na ausência do desnaturante e na sua concentração máxima. Foram obtidos espectros para as duas condições reacionais (Figs. 65 e 66). As variações de massas estão apresentadas nas tabelas 10 e 11. Os estados de carga e a variação de massas (HDX) foram calculados como descrito no item

3.9.2.1. Na tabela 10, podemos observar a taxa de troca após a deuteração do meio, quando a proteína estava exposta a máxima concentração do desnaturante (obtido por EM, fig. 65). Nessas condições reacionais, foi observada uma mudança de massa equivalente a 17.89 Da na troca de hidrogênio-deutério.

Tabela 10 - Variação de massas da Mioglobina (mb) antes e após deuteração do meio reacional e consequente determinação da taxa de troca (HDX) nas condições estabelecidas de *quenching* com TFA a 1% e tampões de lavagem (5% MeOH + TFA) e de eluição (80% ACN + FA).

					Média	HDX Δmassa (Da)
	Carga	18	17	16	15	
	<i>m/z</i>	942.85	998.25	1060.60	1131.22	
a)	massa (Da)	16953.30	16953.25	16953.60	16953.30	16953.36
	<i>m/z</i>	945.43	1000.88	1063.29	1134.17	
b)	massa (Da)	16999.74	16997.96	16996.64	16997.55	16997.97
						44.61
	<i>m/z</i>	946.38	1001.91	1064.39	1135.46	
c)	massa (Da)	17016.84	17015.47	17014.24	17016.90	17015.86
						17.89

No entanto, observamos na tabela 11 que houve uma mudança de massa de apenas 2.30 Da na troca de hidrogênio-deutério quando a proteína estava exposta a máxima concentração do desnaturante (obtido por EM, fig. 66).

Tabela 11 - Variação de massas da Mioglobina (mb) antes e após deuteração do meio reacional e consequente determinação da taxa de troca (HDX) nas condições estabelecidas de *quenching* com FA a 1% e tampões de lavagem (5% ACN + FA) e de eluição (80% ACN + FA).

					Média	HDX Δmassa (Da)
	Carga	18	17	16	15	
	<i>m/z</i>	942.84	998.25	1060.55	1131.12	
a)	massa (Da)	16953.12	16953.25	16952.80	16951.80	16952.74
	<i>m/z</i>	944.86	1000.48	1062.73	1133.64	
b)	massa (Da)	16989.48	16991.16	16987.68	16989.60	16989.48
						36.74
	<i>m/z</i>	945.56	1000.32	1062.50	1133.84	
c)	massa (Da)	17002.08	16988.44	16984.00	16992.60	16991.78
						2.30

Figura 65 - Espectro de Massas da Mioglobina (mb) a 5 μM .

Condição reacional: a) Tampão fosfato (H_2O); b) Tampão fosfato (D_2O); c) Urea-d4 (8,55 M) + Tampão fosfato (D_2O). Com subsequente adição da mioglobina e *quenching* com TFA a 1%. Tampões de lavagem (5% MeOH + TFA) e de eluição (80% ACN + FA).

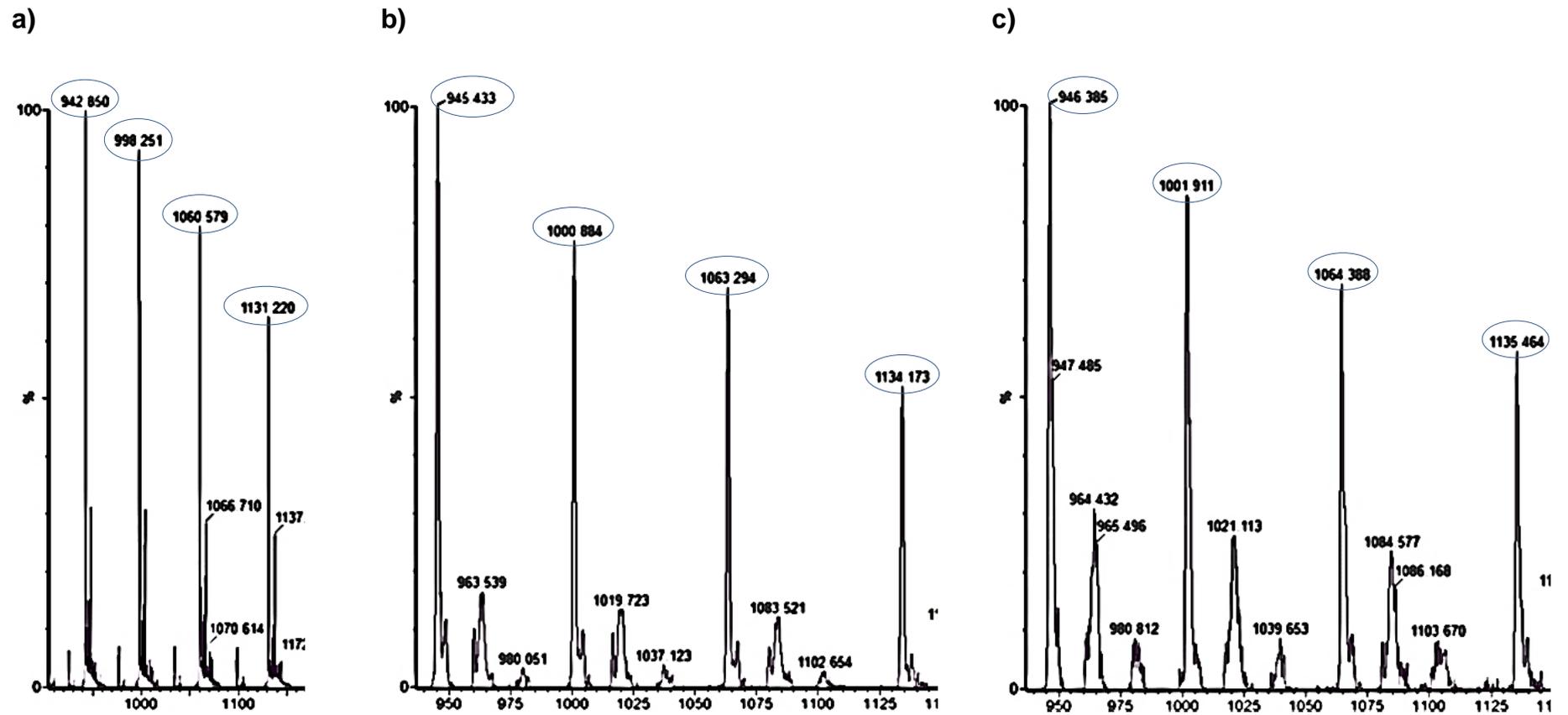
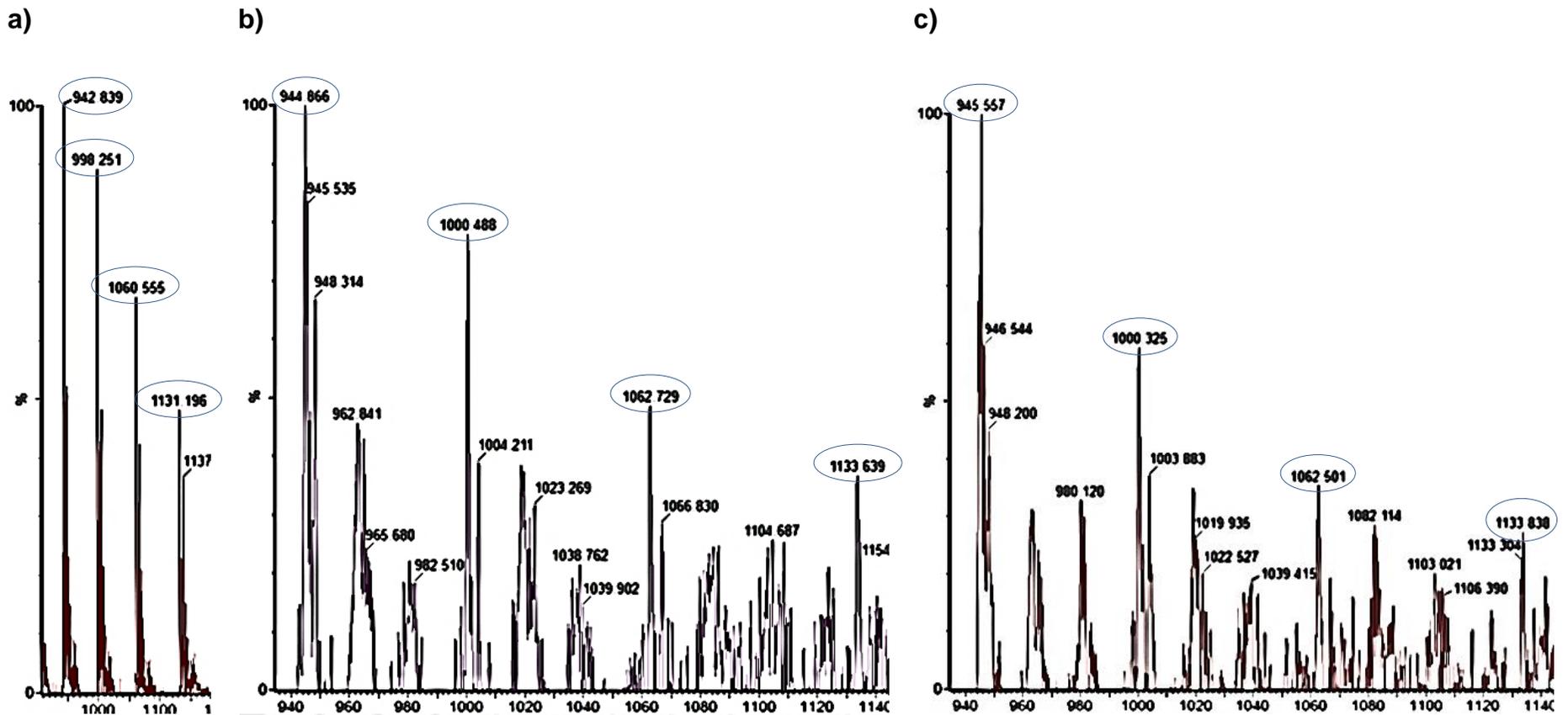


Figura 66 - Espectro de Massas da Mioglobina (mb) a 5 μ M.

Condição reacional: a) Tampão fosfato (H_2O); b) Tampão fosfato (D_2O); c) Urea-d4 (8,55 M) + Tampão fosfato (D_2O). Com subsequente adição da mioglobina e *quenching* com AF a 1%. Tampões de lavagem (5% ACN + FA) e de eluição (80% ACN + FA).



Vale ressaltar que a principal diferença entre os meios reacionais é a presença do ácido trifluoroacético (TFA). Conforme os resultados, observamos melhor qualidade dos espectros e maior taxa de troca hidrogênio-deutério, quando o TFA foi utilizado. Pela comparação com o uso do AF, podemos primeiramente identificar menor formação de adutos com o fosfato e melhor qualidade dos espectros em relação ao sinal/ruído. Isso é justificado pela adição do TFA na etapa de dessalinização (tampão de lavagem), bem como pela utilização do AF na etapa de separação (tampão de eluição).

Era esperado que o TFA, por ser um eletrólito muito forte ($pK_a < 0,5$) diminuisse a qualidade dos dados ESI EM, na presença do solvente. Entretanto o AF que é um ácido mais fraco ($pK_a > 3$) compensou a detecção por EM e permitiu mais facilmente a distinção dos analitos mal resolvidos, com base nas diferenças em suas massas pela incorporação do deutério na proteína (KALTASHOV, et al., 2005). Além disso, a taxa de troca de hidrogênio é altamente dependente do pH do ambiente. As trocas são predominantemente catalisadas por ácidos em um pH abaixo de 2,5 e por bases em um pH acima de 3. Entretanto, no intervalo 2,5 – 3 (pHmin) a taxa de troca é mais lenta, cerca de 10^{-5} vezes menor que no pH 7 (OGANESYAN, et al., 2018). O TFA por ser um ácido mais forte que o AF, pode ter atingido mais facilmente o pH ideal ~ 2,5.

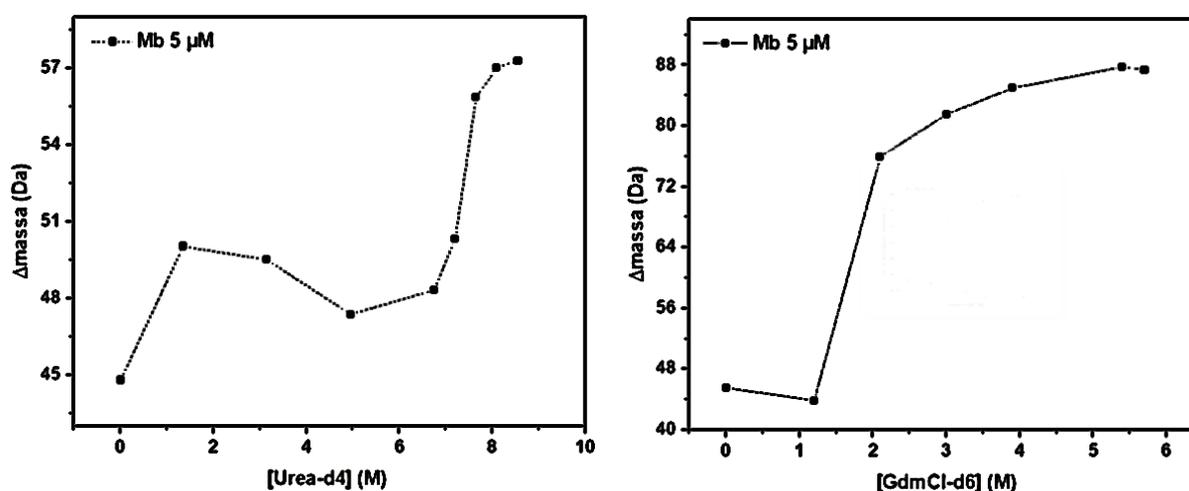
Portanto, com base nesses resultados iniciais, ficou determinado o uso dos tampões de lavagem (5% MeOH + TFA) e de eluição (80% ACN + FA) e *quenching* com TFA a 1% para os próximos experimentos.

3.9.2.3 Avaliação do desnaturante

Há anos a Ureia e/ou GdmCl têm sido usados em curvas de desnaturação de proteínas, pois é possível obter uma estimativa da estabilidade conformacional, medindo as diferenças nas estabilidades conformacionais entre os estados nativo (dobrado) e desnaturado (desdobrado). A área de superfície acessível do estado desnaturado é consideravelmente maior que a do estado nativo (PACE, 1986).

Nesta avaliação, a reação de HDX foi realizada usando os dois desnaturantes, a fim de estabelecer o mais adequado para a otimização e aplicação do método. O resultado (Fig. 67) confirma o melhor efeito desnaturante do GdmCl-d6. A variação de massas [Δ massa (Da) (HDX)] foi calculada como no item 3.9.2.1.

Figura 67 - Curvas de desnaturação da Mb em presença de Ureia-d4 e GdmCl-d6.



A curva de transição de equilíbrio da Mioglobina (Mb) foi plotada em função da taxa de troca de hidrogênio-deutério com o aumento da concentração do desnaturante. Para ambos agentes químicos, à medida que a concentração aumenta, o estado desnaturado é favorecido, mas é observado que em concentrações de Urea-d4 abaixo de 6,75 M, não é possível prever se as ligações de hidrogênio estão sendo rompidas pela reação de desdobramento da proteína em equilíbrio, na qual seria obtido acesso ao deutério. Neste caso, podemos assumir que a proteína está parcialmente “fechada”, não havendo desdobramento suficiente para promover a troca e com isso, os hidrogênios estão protegidos em algum grau pela estrutura parcialmente nativa da proteína. Além disso, não está claro se a proteína atinge um platô de equilíbrio após o início da transição de troca (6,75 M) e até a máxima concentração (8,55 M). Já quando utilizamos GdmCl-d6, é claramente observado que a desnaturação da proteína iniciou em baixa concentração (1,2 M) desse agente químico e houve um aumento acentuado da taxa de troca numa faixa curta de variação das concentrações (1,20 M – 2,10 M), como era esperado e que a partir de 3,90 M a proteína tende a atingir o equilíbrio, o que também é observado antes da transição de troca (0 M – 1,2 M).

Experimentalmente, sabe-se que o GdmCl é mais eficiente na desnaturação de proteínas que a ureia, no entanto as razões para isso não são claramente entendidas (LI, et al., 2012). Em 2010 foi reportado por HSU e colaboradores, que a ureia é um desnaturante químico não-iônico e possui aproximadamente metade da

força desnaturante do GdmCl. Várias teorias já foram apresentadas para explicar o mecanismo de desnaturação promovido pelos dois agentes químicos, no entanto, o mecanismo exato ainda é objeto de pesquisas (SIDDIQUI, et al., 2018).

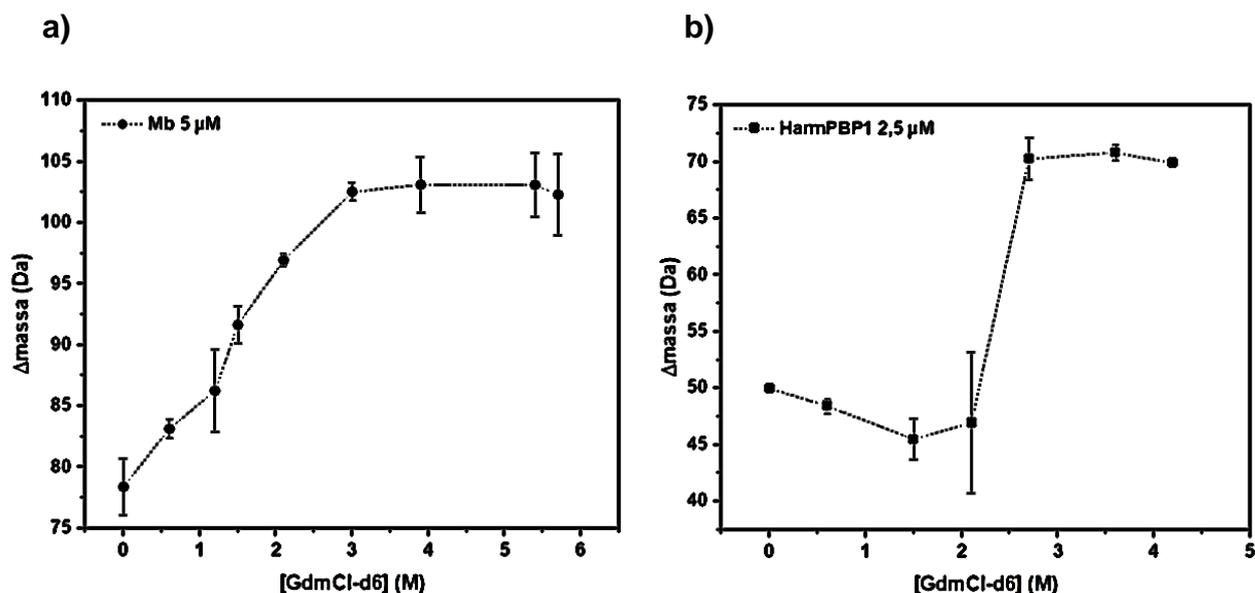
Desta forma, concordando com o previsto, o GdmCl-d6 foi selecionado para os próximos experimentos deste trabalho, tendo sido o desnaturante mais eficiente.

3.9.2.4 Aplicação do método com mioglobina e HarmPBP1

Nesta etapa do trabalho, tivemos como objetivo mensurar a precisão (repetibilidade) dos resultados de forma a exprimir a concordância entre uma série de medidas em triplicata da mioglobina (mb) e em duplicata da HarmPBP1, tendo sido os experimentos realizados no mesmo dia, utilizando a mesma instrumentação.

Na figura 68 observamos que houve diferença de perfil das curvas para as duas proteínas. A variação de massas [Δ massa (Da) (HDX)] foi calculada como descrito no item 3.9.2.1.

Figura 68 - Curvas da aplicação do método em replicatas das proteínas a) Mioglobina a 5 μ M; Faixa de concentração de GdmCl-d6 de 0,6 a 5,7 M (N = 9). b) HarmPBP1 a 2,5 μ M; Faixa de concentração de GdmCl-d6 de 0,6 a 4,2 M (N = 7).



O método apresentou melhor robustez quando foi aplicado à proteína de estudo (HarmPBP1), apesar de ter apresentado variação de erro significativa nos pontos de concentração 2,10 M e 2,70 M do desnaturante. Isto pode ser explicado

porque em 2,10 M ocorre o início da desnaturação da proteína e a taxa de troca variou em cada repetição, justificando a instabilidade da proteína. Similarmente ocorre para o ponto 2,70 M onde possivelmente ocorreu o máximo de troca HX, nessa condição reacional. A mioglobina, por sua vez, apresentou maior instabilidade no decorrer do experimento, tanto com o aumento da concentração do desnaturante quanto em relação a variação do erro nas repetições.

A utilização de dados em duplicata ou triplicata permitem uma estimativa razoável do erro dos níveis de deutério medidos. Essa estimativa de erro (desvio padrão) deve ser usada para apoiar a atribuição de significância a diferenças de troca de hidrogênio-deutério (RIU, et al., 1996; MASSON, et al., 2019). Desta forma, não buscamos realizar a validação do método, mas garantir que as medidas não foram realizadas ao acaso e pudessem ser repetidas e reproduzidas, nessas condições.

O resultado das médias e desvio padrão das curvas em replicata estão apresentados nas tabelas abaixo, para cada uma das proteínas.

Tabela 12 - Média e desvio padrão obtidos das curvas do método aplicado em replicatas das proteínas (I) Mioglobina a 5 μ M; Faixa de concentração do GdmCl-d6 de 0,6 a 5,7 M (N = 9). (II) HarmPBP1 a 2,5 μ M; Faixa de concentração de GdmCl-d6 de 0,6 a 4,2 M (N = 7).

I)

Mioglobina (Mb) 5 μ M	
Média (\bar{x})	Desvio-padrão (s)
77,08	$\pm 0,32$
83,15	$\pm 0,79$
86,26	$\pm 3,34$
91,66	$\pm 1,49$
96,94	$\pm 0,49$
102,54	$\pm 0,72$
103,12	$\pm 2,25$
103,10	$\pm 2,58$
102,31	$\pm 3,29$

II)

HarmPBP1 2,5 μ M	
Média (\bar{x})	Desvio-padrão (s)
49,98	$\pm 0,04$
48,43	$\pm 0,63$
45,49	$\pm 1,81$
46,97	$\pm 6,25$
70,27	$\pm 1,83$
70,82	$\pm 0,68$
69,89	$\pm 0,12$

Na avaliação deste trabalho, foi considerado que se os valores de cada repetição são próximos da média a variância é pequena e isso é observado de acordo com o desvio padrão exibido nas tabelas.

Questões sobre o quão reprodutíveis são as medições por HDX EM e quantas réplicas são necessárias antes que haja confiança razoável no valor medido foram abordadas por MOROCO & ENGEN (2015), pois como a HDX EM é cada vez mais usada para análises de biologia complexa envolvendo máquinas e complexos de proteínas, a replicação biológica também se torna crítica. Para MASSON e seus colaboradores (2019), se realizado adequadamente, o método HDX EM é muito reprodutível, mas reações repetidas do HDX devem ser conduzidas para avaliar o grau de variabilidade causado por fatores externos. Quando o método é adequadamente aplicado levando em consideração todos os aspectos da produção de amostras, são fornecidas informações confiáveis sobre as propriedades das funções da estrutura da proteína (MASSON, et al., 2019). Por conseguinte, foi confiado a análise em duplicata da HarmPBP1, dado a necessidade da realização de diversos ensaios até estabelecer as condições de otimização, havendo grande quantidade de consumo da proteína. E, por fim, o método foi aplicado para o estudo da complexação da HarmPBP1 com o ligante, discutido a seguir.

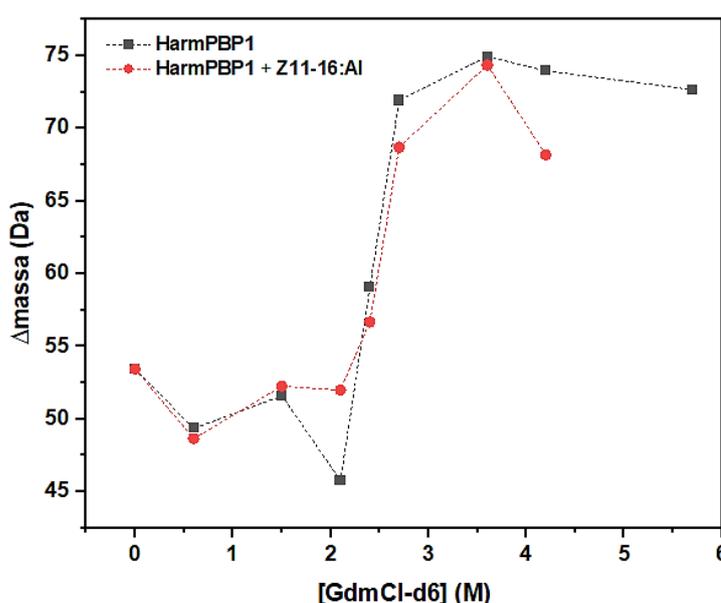
3.9.2.5 Avaliação da HarmPBP1 com o ligante *cis*-11-hexadecenal (Z11-16:Al)

A EM de massas é particularmente útil no estudo das interações proteína-ligante, devido à sua capacidade de determinar a composição do ligante e a estequiometria de ligação por medição direta da massa do complexo proteína-ligante após sua dessorção da solução, através da ionização por ESI (XIAO, et al., 2003).

O estudo por HDX das interações não covalentes proteína-ligante pode fornecer informações desses contatos intermoleculares, uma vez que a ligação ao ligante aumenta a estabilidade termodinâmica, fazendo com que o complexo proteína-ligante seja mais fortemente protegido da troca hidrogênio-deutério do que a proteína livre (KONERMANN, et al., 2010). Ademais, técnicas adicionais baseadas em EM prevê informações de interações proteína-ligante, fazendo uso da contribuição da troca H/D da proteína (CHALMERS, et al., 2011). De forma que, neste trabalho agregamos a técnica SUPREX (*stability of unpurified proteins from rates of H/D exchange*) usada para caracterizar propriedades de desdobramento/dobramento de equilíbrio de proteínas e complexo proteína-ligante, a fim de realizar medições termodinâmicas da estabilidade da HarmPBP1 e do complexo HarmPBP1- Z11-16:Al (ROULHAC, et al., 2004).

Com isso e observando a figura 69, era esperado determinar a concentração do desnaturante no ponto médio da transição ($C^{1/2}$) para calcular a energia de Gibbs (ΔG_f) da HarmPBP1, comparando-se os valores na presença e ausência do ligante e, assim, a alteração da energia livre de dobramento ($\Delta\Delta G_f$). E, a partir desses dados, a constante de dissociação (K_d) seria calculada. Entretanto, apesar da ligação ao ligante ter induzido uma redução nas taxas de deuteração na faixa de desnaturação (entre 2,4 M e 2,7 M), sugerindo que a ligação ocorreu, uma vez que sistemas ligados a ligantes tenderão a ser "mais bem dobrados" e portanto, mais resistentes às flutuações estruturais, não foi possível determinar a K_d . A variação de massas [Δ massa (Da) (HDX)] foi calculada como descrito no item 3.9.2.1.

Figura 69 - Curva da variação de massas da HarmPBP1 em presença e ausência do ligante Z11-16:Al.



Para tanto, seria necessário conduzir mais experimentos a fim de determinar o ponto médio da concentração do desnaturante e/ou reaver a performance do método em um ou mais aspectos da otimização.

É importante considerar que as diferenças na troca H/D entre a proteína livre de ligante e a proteína ligada ao ligante também podem vir de interações diretas com o ligante dentro do *pocket* da ligação ao ligante, assim como alterações na estrutura ou dinâmica proteica remota ao local de ligação (CHALMERS, et al., 2011). Recentemente, TRABJERG e colaboradores (2018) sugeriram a aplicação de

ensaios bioquímicos complementares e mutagênese para investigar as origens físicas das mudanças observadas por HDX após a formação de complexos.

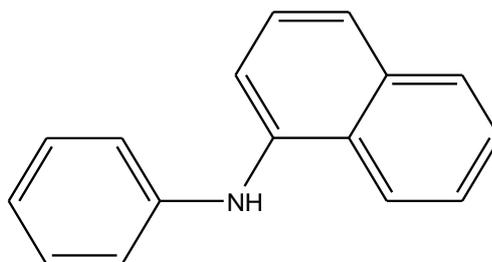
Diante dessa dificuldade, da necessidade de expressar mais HarmPBP1 e do tempo limitado, nós optamos a dar início ao estudo da proteína HarmGOBP1, visto que até o presente momento não foram relatados ligantes para essa proteína.

3.9.3 Fluorescência

Como mencionado anteriormente, pesquisadores têm relatado alta afinidade de ligação das GOBPs a metabólitos de plantas hospedeiras e a feromônios sexuais. As medidas de fluorescência têm sido o método de escolha para estudar a ligação, por ser de fácil manuseio, rápido, seguro e, quando aplicável, apresenta a vantagem única de permitir medições da ligação no equilíbrio (JING, et al., 2019).

Neste trabalho, o ensaio de ligação por fluorescência foi utilizado para medir a afinidade da HarmGOBP1 a 6 compostos voláteis. O ensaio também foi realizado com o principal componente do feromônio sexual de *H. armigera* (Z11-16:Al) e a HarmPBP1 que foi usada, para avaliar o método, uma vez que o ligante é conhecido. Esta técnica utiliza uma sonda fluorescente que, após a ligação, modifica seu espectro de emissão. O deslocamento da sonda fluorescente N-fenil-1-naftilamina (1-NPN) (Fig. 70) por odorantes é frequentemente usado com sucesso para avaliar a ligação de ligantes a OBPs de insetos (PELOSI, et al., 2006). Essa sonda é particularmente útil porque fluoresce fracamente em meio aquoso, mas se torna fortemente fluorescente em meio hidrofóbico (MARTOS, et al., 2020).

Figura 70 - Estrutura da sonda fluorescente 1-NPN.

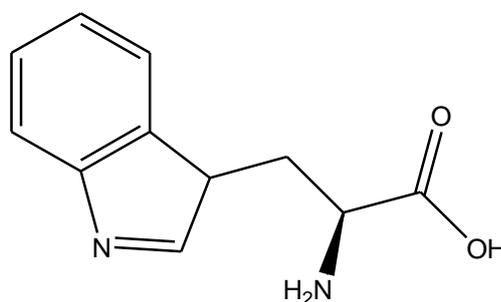


O espectro de emissão da 1-NPN passa por um deslocamento para o azul, de 480 para cerca de 395 – 410 nm, dependendo da proteína. Esse comportamento

está relacionado à flexibilidade da 1-NPN, que provavelmente sofre uma alteração conformacional associada à ligação, com rotação em torno das ligações dos anéis aromáticos ligados ao nitrogênio e, conseqüente, perda de conjugação entre os dois anéis (PELOSI, et al., 2018). Em 2012 SPINELLI e seus colaboradores demonstraram por cristalografia de raios-X do complexo entre a OBP14 de abelha e 1-NPN que a esta sonda fluorescente penetra na cavidade de ligação da proteína. A adição de odorantes, que competem com a 1-NPN pela ligação ao local específico da proteína provoca o deslocamento da sonda, portanto, a intensidade da fluorescência diminui e a constante de dissociação (K_d) pode então ser calculada a partir de um gráfico de intensidade de fluorescência *versus* concentração do ligante livre (TAYLOR, et al., 2008).

A maioria das OBPs de insetos contém aminoácidos intrinsecamente fluorescentes, como o triptofano (Fig. 71), que é encontrado nas duas proteínas de estudo HarmGOBP1 e HarmPBP1. Comumente, a fluorescência intrínseca do triptofano contido em proteínas não é afetada pela presença da 1-NPN ou outros ligantes na cavidade de ligação, indicando que o resíduo de triptofano da proteína não está próximo ao ligante (ZHOU, et al., 2004). Por outro lado, se um resíduo de triptofano estiver presente na cavidade de ligação, sua fluorescência é dissipada, dependente da concentração do ligante, compostos comumente aromáticos, capazes de absorver energia do triptofano excitado (PELOSI, et al., 2018).

Figura 71 - Estrutura do triptofano (*Trp* ou *W*) (aminoácido aromático, apolar e fluorescente).



O triptofano pode ser excitado a 280 nm e geralmente emitirá a 348 nm. Em HarmGOBP1 e HarmPBP1 foi observado um desvio para o azul (330 nm), sugerindo que o triptofano está posicionado no núcleo da proteína e que sua interação com o ligante afetou significativamente suas propriedades de fluorescência (ZHOU, et al.,

2009; PELOSI, et al., 2006). A emissão de fluorescência da HarmGOBP1 na presença de 1-NPN está apresentada na figura 73 e concorda que a ligação da 1-NPN a esta proteína reduziu a emissão intrínseca de fluorescência do triptofano a 330 nm, iniciando um novo pico de emissão a 395 nm, sinalizando que a 1-NPN ligada fica próxima ao triptofano. O aumento da fluorescência da 1-NPN a 395 nm é justificado pela transferência de energia de ressonância do triptofano (ZHOU, et al., 2009). Este comportamento também foi observado nas mesmas condições do experimento, quando foi utilizada a HarmPBP1 (Fig. 74). Foi observado também um aumento continuado da emissão em HarmGOBP1 a 395 nm, mas as razões ainda não estão claras.

A estrutura dos compostos previamente selecionados para avaliação da complexação com a HarmGOBP1 estão apresentadas na figura 72. Além do componente principal do feromônio de *H. armigera*, os compostos foram escolhidos considerando o tamanho da molécula e volatilidade; a solubilidade em solventes orgânicos; a origem e suas funções, sendo elas naturais ou não.

Figura 72 - Estruturas dos compostos selecionados para avaliação da complexação com HarmGOBP1: (1) Benzaldeído; (2) 2-Naftol; (3) Naftaleno; (4) Salicilaldeído; (5) 2-metóxi-1-naftoquinona; (6) *cis*-11-hexadecenal (Z11-16:Al).

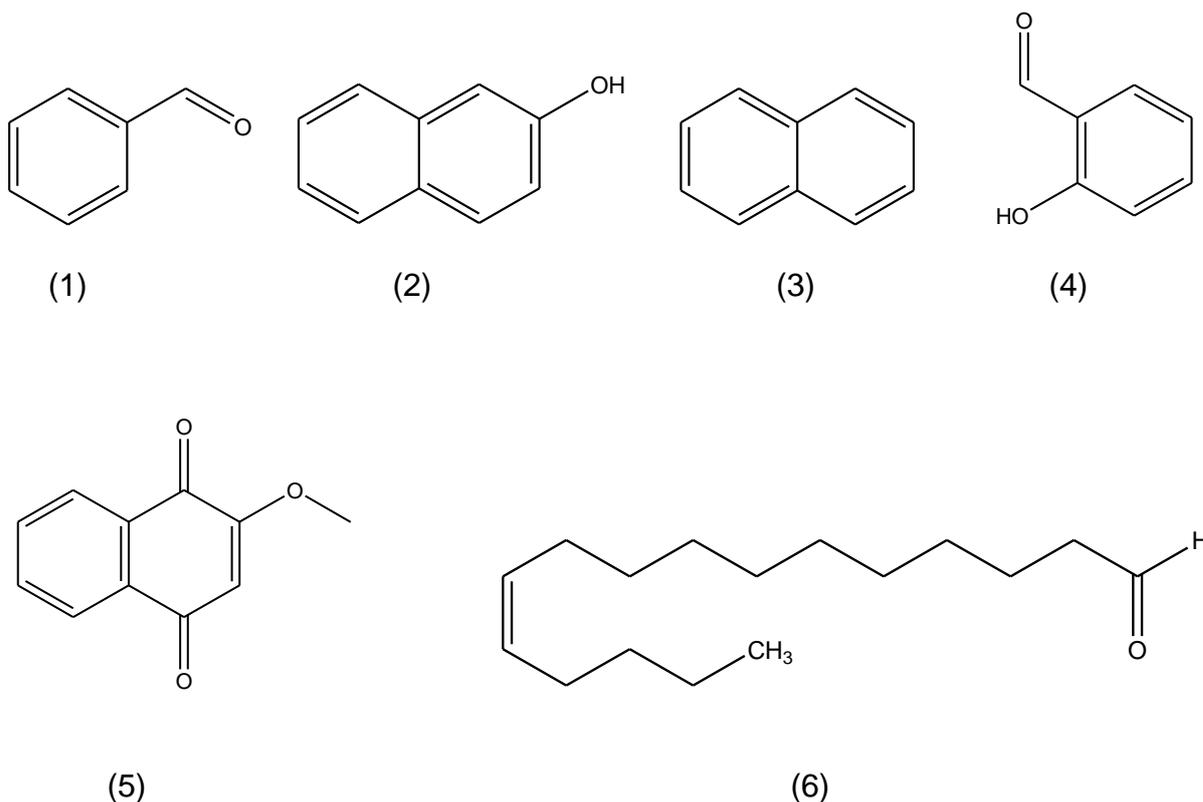
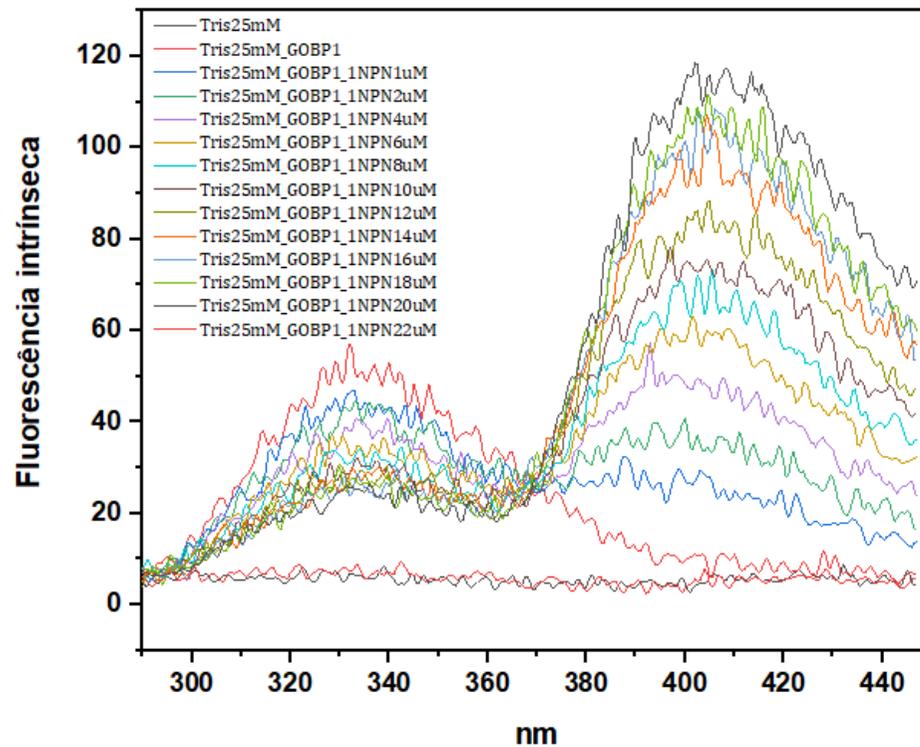


Figura 73 - Emissão de fluorescência da HarmGOBP1. A proteína (2 μM) foi excitada a 280 nm e os espectros foram registrados entre 290 nm e 450 nm. a) Espectros de emissão com gradual aumento das concentrações de 1-NPN de 0 até 22 μM . b) Gráfico do pico de emissão da HarmGOBP1 a 330 nm e 395 nm em função da concentração da 1- NPN.

a)



b)

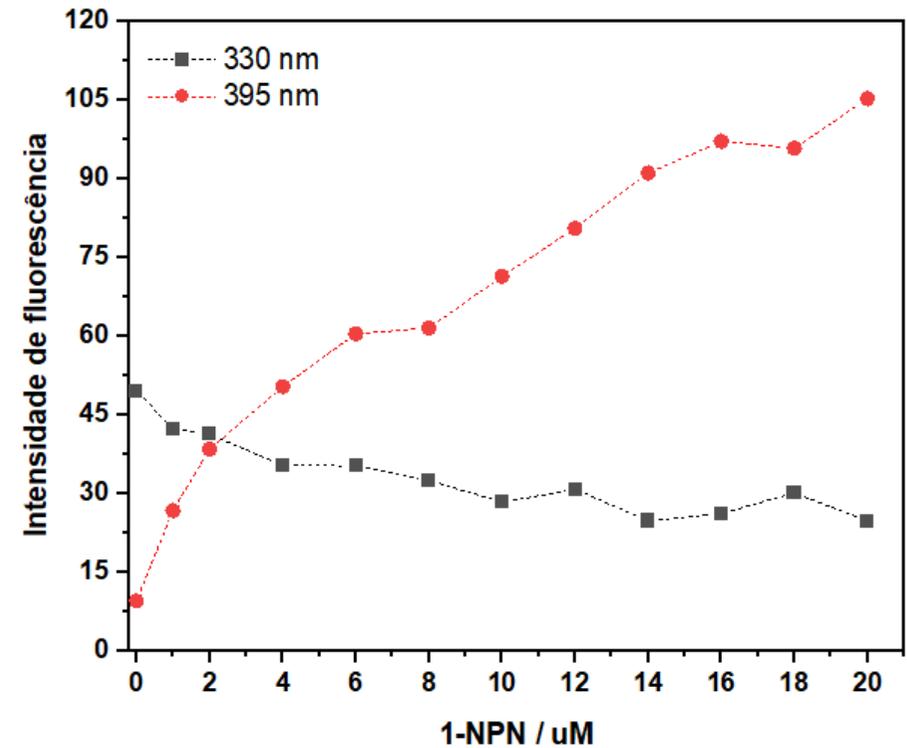
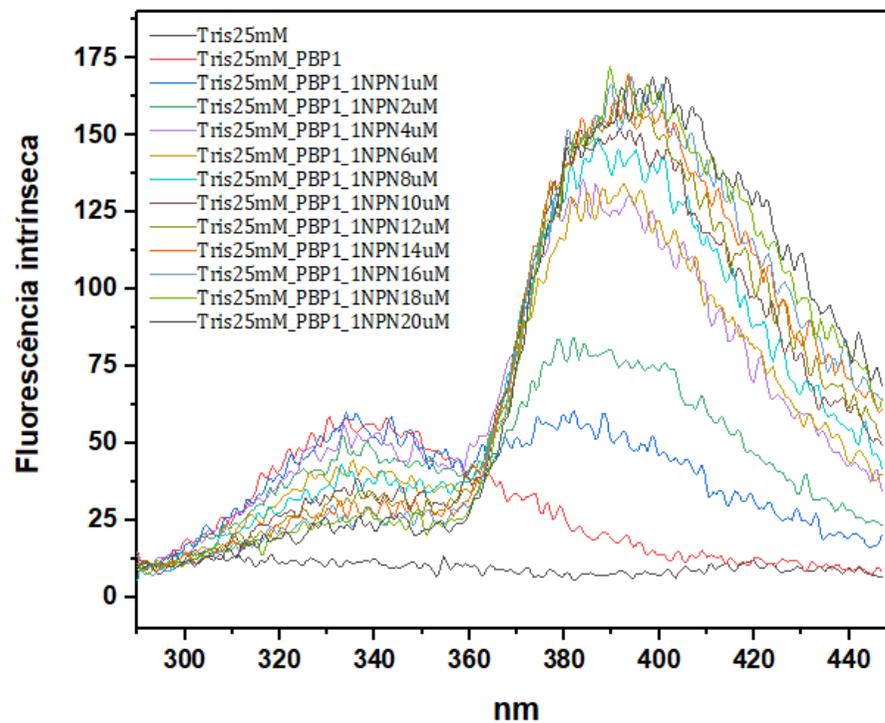
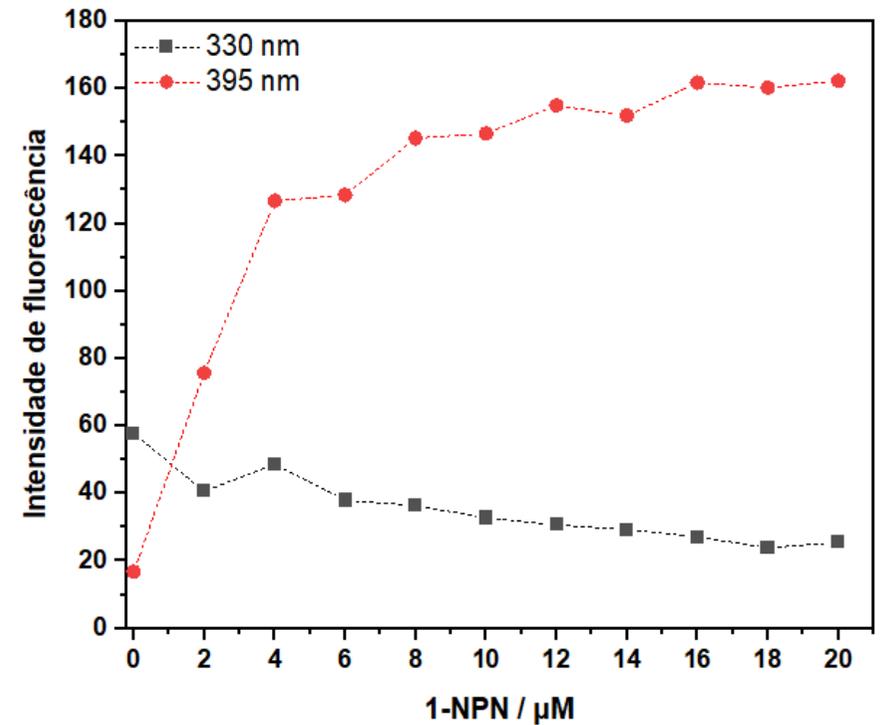


Figura 74 - Emissão de fluorescência da HarmPBP1. A proteína (2 μM) foi excitada a 280 nm e os espectros foram registrados entre 290 nm e 450 nm. a) Espectros de emissão com gradual aumento das concentrações de 1-NPN de 0 até 20 μM . b) Gráfico do pico de emissão da HarmPBP1 a 330 nm e 395 nm em função da concentração da 1-NPN.

a)



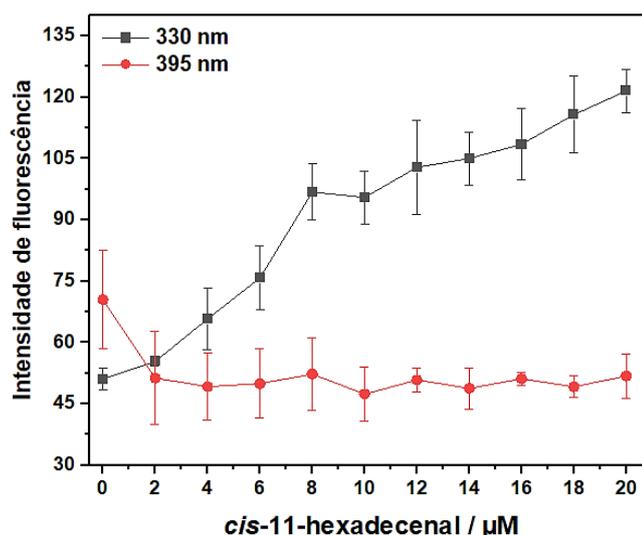
b)



Para avaliar a afinidade dos ligantes não fluorescentes nestes ensaios de ligação competitiva, as proteínas foram incubadas com a 1-NPN a 2 μM e tituladas com quantidades crescentes dos ligantes prováveis de HarmGOBP1 e o ligante da HarmPBP1. O método foi aplicado inicialmente utilizando a HarmPBP1, em virtude dessa proteína ter o ligante *cis*-11-hexadecenal conhecido.

O resultado da figura 75 confirma a complexação do ligante *cis*-11-hexadecenal a HarmPBP1, uma vez que houve a diminuição da emissão a 395 nm e consequente aumento da emissão a 330 nm, indicando o deslocamento da 1-NPN, a partir da primeira adição do ligante.

Figura 75 - Gráfico do pico de emissão a 330 nm e 395 nm da HarmPBP1 incubada com a 1-NPN a 2 μM em função da concentração do *cis*-11-hexadecenal.

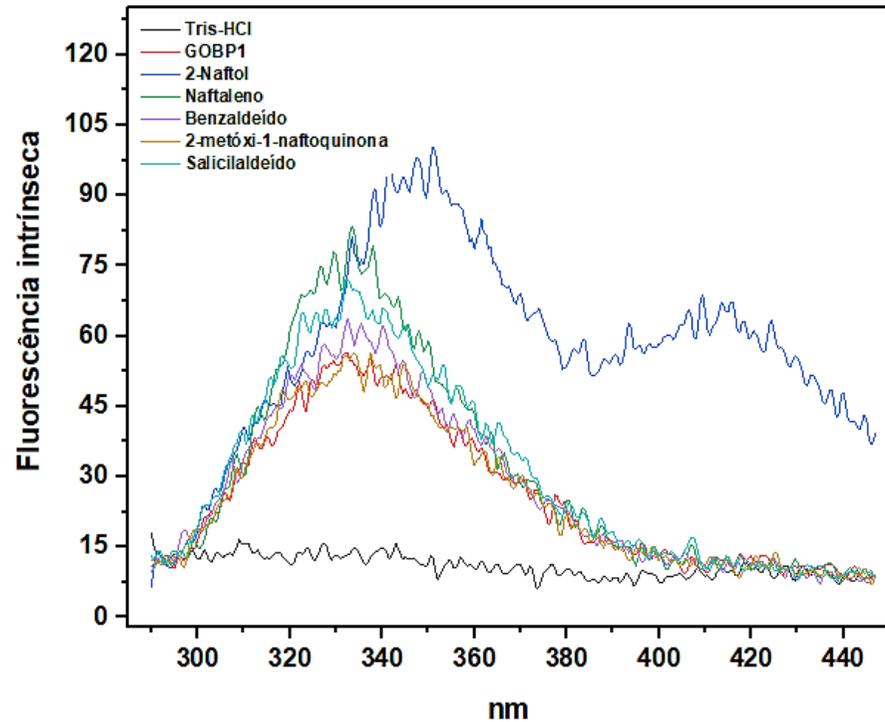


Diante desse resultado, o método foi aplicado utilizando a HarmGOBP1 com os compostos possíveis ligantes. Os compostos selecionados para avaliação da complexação com HarmGOBP1 são, em sua maioria, compostos aromáticos carbonilados e suas propriedades de fluorescência são complexas e geralmente difíceis de serem previstas. Portanto, esses compostos foram avaliados com a HarmGOBP1 sem adição da 1-NPN (Fig. 76 a).

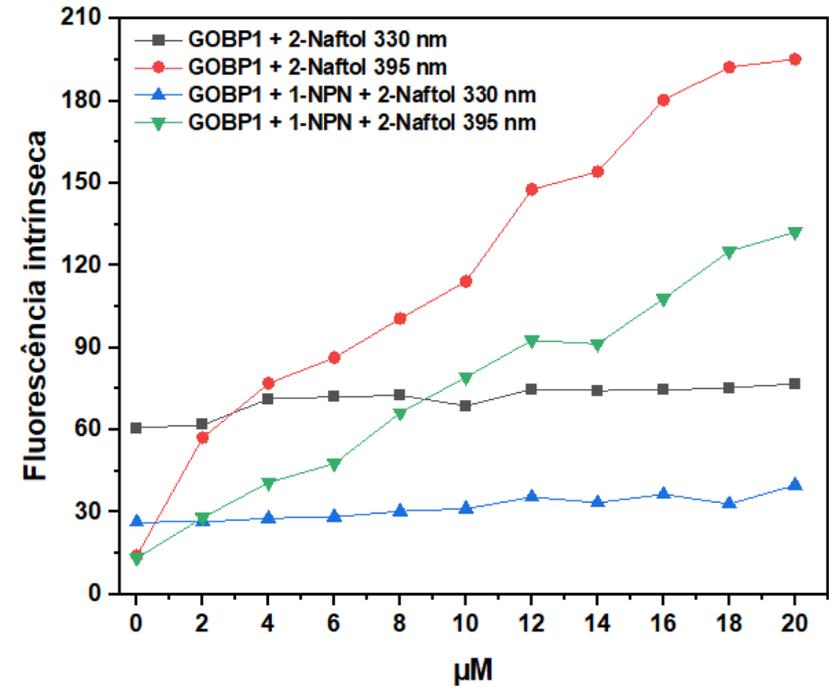
Nesta avaliação foi observado que o 2-Naftol apresentou fluorescência intrínseca (independente da adição da 1-NPN) na região de 395 nm (Fig. 76 b). Além disso, o resultado da avaliação com este composto sugere que ele não interage com o triptofano no sítio de ligação da HarmGOBP1.

Figura 76 - Emissão de fluorescência da HarmGOBP1. a) Espectros de emissão dos compostos (a 2 μ M) selecionados para avaliação da complexação com HarmGOBP1. b) Gráfico dos picos de emissão da HarmGOBP1 sem e com adição da 1-NPN e 2-Naftol (0 a 20 μ M).

a)

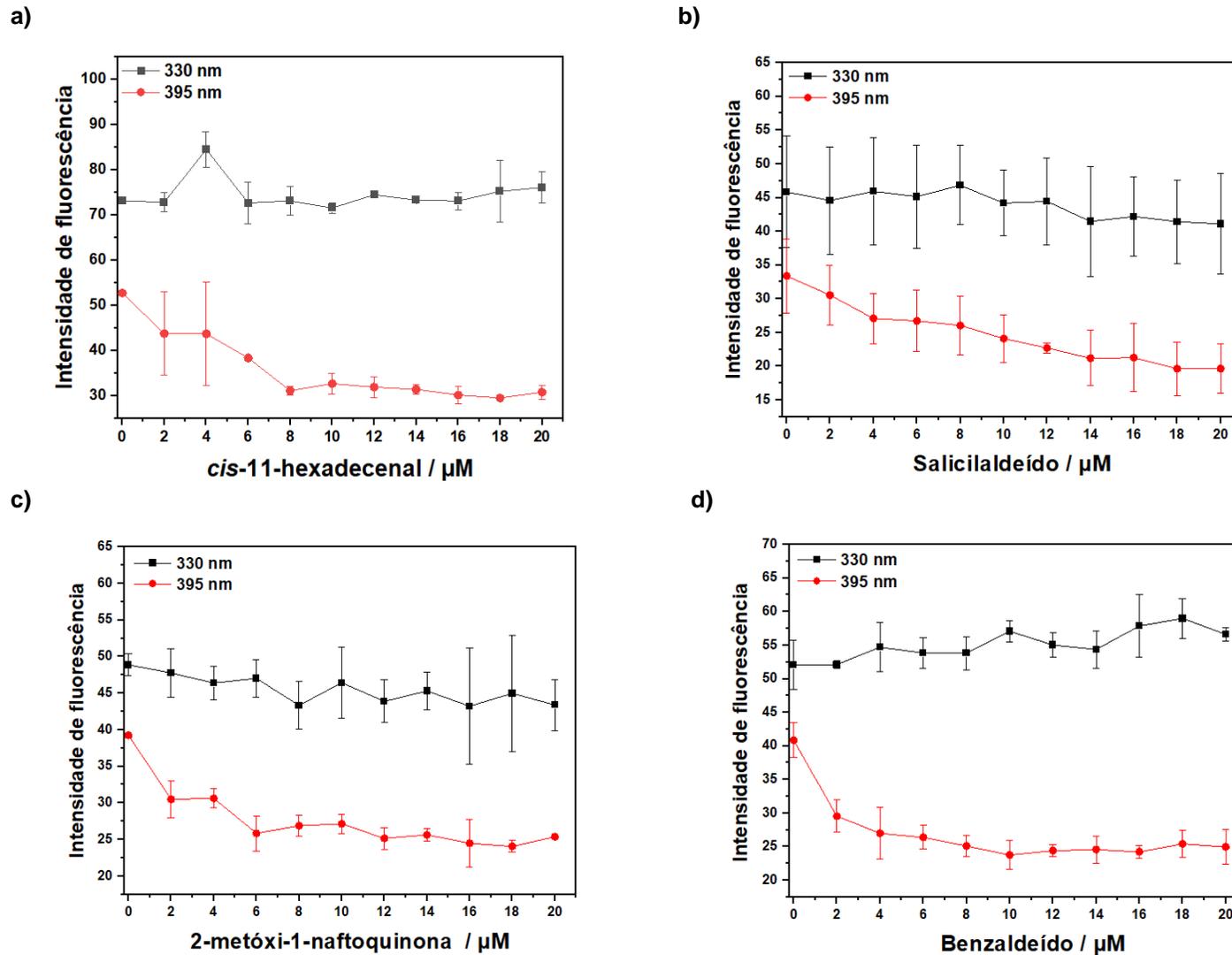


b)



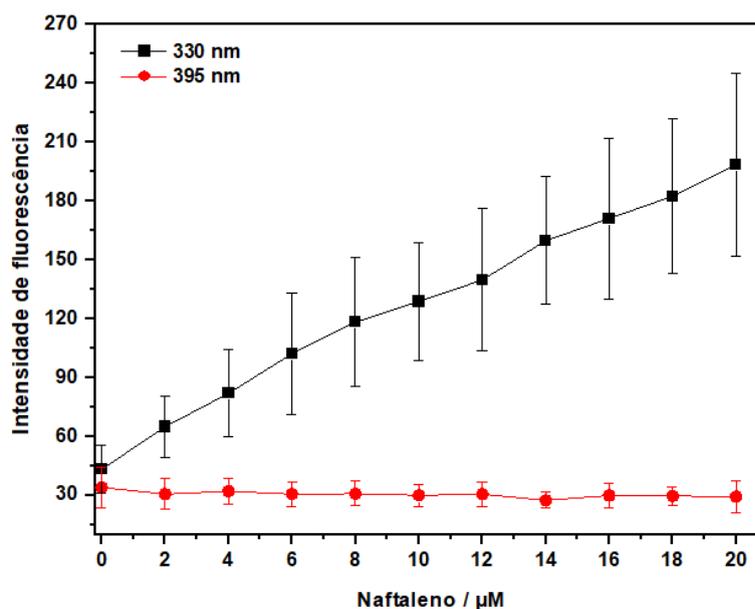
A seguir, os resultados dos quatro compostos avaliados na figura 77 apresentaram diminuição da intensidade de fluorescência a 395 nm, sugerindo que houve o deslocamento da 1-NPN. Desta forma, esses compostos estariam ligando-se mais fortemente ao interior da cavidade, sendo assim, potenciais ligantes da proteína.

Figura 77 - Gráficos do pico de emissão a 330 nm e 395 nm da HarmGOBP1 incubada com a 1-NPN a 2 μ M em função da concentração dos ligantes: a) *cis*-11-hexadecenal; b) Salicilaldeído; c) 2-metóxi-1-naftoquinona; d) Benzaldeído.



Já o Naftaleno (Fig. 78) não apresentou diminuição significativa da emissão a 395 nm e sugere emitir na mesma faixa do triptofano (330 nm).

Figura 78 - Gráfico do pico de emissão a 330 nm e 395 nm da HarmGOBP1 incubada com a 1-NPN a 2 μ M em função da concentração do Naftaleno (0 a 20 μ M).



Geralmente, a curva de ligação de 1-NPN a OBPs segue uma isoterma simples de Langmuir com uma estequiometria de 1:1, mostrada por um gráfico linear de Scatchard. Assim, são geradas curvas de extinção por fluorescência, a partir das quais podemos calcular a constante de dissociação do ligante (PELOSI, et al., 2018).

3.10 Conclusão

Os genes das proteínas ligadoras de odor HarmPBP1 e HarmGOBP1 foram expressos e as proteínas foram obtidas através de clonagem em *E. coli*, bem como foram isoladas e caracterizadas por Espectrometria de Massas. Os testes de avaliação do complexo das OBPs com os feromônios servirão como base para o aprofundamento do estudo da relação estrutura-atividade.

REFERÊNCIAS

- ÁVILA, Crébio José; VIVAN, Lúcia Madalena; TOMQUELSKI, Germison Vital. Ocorrência, aspectos biológicos, danos e estratégias de manejo de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) nos sistemas de produção agrícolas: Circular técnica. 23. ed. Dourados: **Embrapa Agropecuária Oeste**, 2013. 12 p.
- BLOMQUIST, G.J. (Ed.); VOGT, R.G. Biosynthesis and detection of pheromones and plant volatiles - introduction and overview. In: **Insect pheromone biochemistry and molecular biology**. Academic Press, USA. Elsevier. p. 3-18, 2003.
- BORGES M. et al. Identificação e avaliação do feromônio sexual de *Helicoverpa armigera* e atração cruzada entre espécies de Noctuidae representativas do Brasil. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento: n. 336. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2018.
- BRAMBILA J. Pest Alert. Old World Bollworm (*Helicoverpa armigera*). Animal and Plant Health Inspection Service Plant Protection and Quarantine Programs. APHIS 81-35-025. U.S. **Department of Agriculture** (USDA), 2018.
- BUENO, A. de F. et al (Org.). *Helicoverpa armigera*: desafios na cultura da soja. Londrina: **Embrapa Soja**, 2013. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/helicoverpa>>.
- BYERS, J.A. Simulation of mating disruption and mass trapping with competitive attraction and camouflage. **Environmental Entomology**, v. 36, n. 6, p. 1328-1338, 2014.
- CALLAHAN, F.E. et al. High level expression of “male specific” pheromone binding proteins (PBPs) in the antennae of female noctuid moths. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, n. 6, p. 507-514, 2000.
- CHANG, H. et al. Pheromone binding proteins enhance the sensitivity of olfactory receptors to sex pheromones in *Chilo suppressalis*. **Scientific Reports**, 5(1), 1-12, 2015.
- CORRÊA-FERREIRA, Beatriz Spalding; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; SOSA-GÓMEZ, D. R. Inimigos naturais de *Helicoverpa armigera* em soja. **Embrapa Soja- Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2014.
- CUNNINGHAM, J.P.; ZALUCKI, M.P.; WEST, S.A. Learning in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae): a new look at the behaviour and control of a polyphagous pest. **Bulletin of Entomological Research**, v. 89, n. 3, p. 201-207, 1999.
- DENG, B.; LENTO, C.; WILSON, D.J. Hydrogen deuterium exchange mass spectrometry in biopharmaceutical discovery and development—A review. **Analytica chimica acta**, v. 940, p. 8-20, 2016.

DONG, Kun et al. RNAi-induced electrophysiological and behavioral changes reveal two pheromone binding proteins of *Helicoverpa armigera* involved in the perception of the main sex pheromone component Z11-16: Ald. **Journal of chemical ecology**, v. 43, n. 2, p. 207-214, 2017.

ENGLANDER, S.W. et al. Mechanisms and uses of hydrogen exchange. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 6, n. 1, p. 18-23, 1996.

EYLES, S.J.; KALTASHOV, I.A. Methods to study protein dynamics and folding by mass spectrometry. **Methods**, v. 34, n. 1, p. 88-99, 2004.

FAN, J. et al. An overview of odorant-binding protein functions in insect peripheral olfactory reception. **Genet. Mol. Res**, v. 10, n. 4, p. 3056-3069, 2011.

FRAGOSO, D. B. *Helicoverpa armigera*: conhecer para combater!. Palmas: **Embrapa Pesca e Aquicultura**, 2014.

GAY, Glen. et al. Rapid modification of the pET-28 expression vector for ligation independent cloning using homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. **Plasmid**. v. 76, N, p.66-71, 2014.

GE Healthcare Bio-Sciences AB. Rapid and efficient purification and refolding of a (histidine)₆-tagged recombinant protein produced in *E. coli* as inclusion bodies. **Application note**, 18-1134-37 AC. Björkgatan, 30. 751 84 Uppsala. Sweden, 2007.

GUO, H. et al. Three pheromone-binding proteins help segregation between two *Helicoverpa* species utilizing the same pheromone components. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, n. 9, p. 708-716, 2012.

GYÖRGYI, T.K.; ROBY-SHEMKOVITZ, A.J.; LERNER, M.R. Characterization and cDNA cloning of the pheromone-binding protein from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*: a tissue-specific developmentally regulated protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 24, p. 9851-9855, 1988.

HEFTI, M.H.; DIXON, R.; VERVOORT, J. A novel purification method for histidine-tagged proteins containing a thrombin cleavage site. **Analytical biochemistry**, v. 295, n. 2, p. 180-185, 2001.

HSU, S.T.D. et al. Folding study of Venus reveals a strong ion dependence of its yellow fluorescence under mildly acidic conditions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 7, p. 4859-4869, 2010.

INÁCIO, C.G. et al. Feeding deterrence towards *Helicoverpa armigera* by *Tithonia diversifolia* tagitinin C-enriched extract. **Arabian Journal of Chemistry**, 2020.

JING, D. et al. Molecular characterization and volatile binding properties of pheromone binding proteins and general odorant binding proteins in *Conogethes pinicolalis* (Lepidoptera: Crambidae). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 146, p. 263-272, 2020.

JING, D. et al. Plays a Key Role in Sex Pheromones and Plant Volatiles Recognition in Yellow Peach Moth, *Conogethes punctiferalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Insects**, v. 10, n. 9, p. 302, 2019.

KALTASHOV, Igor A.; EYLES, Stephen J. **Mass spectrometry in biophysics: conformation and dynamics of biomolecules**. John Wiley & Sons, p. 110, 2005.

KAMARAJ, C. et al. Bio-pesticidal effects of *Trichoderma viride* formulated titanium dioxide nanoparticle and their physiological and biochemical changes on *Helicoverpa armigera* (Hub.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 149, p. 26-36, 2018.

KARCH, K.R. et al. Hydrogen-deuterium exchange coupled to top-and middle-down mass spectrometry reveals histone tail dynamics before and after nucleosome assembly. **Structure**, v. 26, n. 12, p. 1651-1663. 3. ed., 2018.

KONERMANN, L.; PAN, J.; LIU, Y.H. Hydrogen exchange mass spectrometry for studying protein structure and dynamics. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 3, p. 1224-1234, 2011.

KOTLOWSKI, C. et al. Fine discrimination of volatile compounds by graphene-immobilized odorant-binding proteins. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 256, 564-572, 2018.

LABADE, C.P. et al. Role of induced glutathione-S-transferase from *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) HaGST-8 in detoxification of pesticides. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 147, p. 612-62, 2018.

LAEMMLI, Ulrich K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LARTER, N.K.; SUN, J.S.; CARLSON, J.R. Organization and function of *Drosophila* odorant binding proteins. **Elife**, v. 5, p. 20242, 2016.

LAUTENSCHLAGER, C.; LEAL, W.S.; CLARDY, J. *Bombyx mori* Pheromone-Binding Protein Binding Nonpheromone Ligands: Implications for Pheromone Recognition. **Structure**, v. 15, n. 9, p. 1148-1154, 2007.

LI, W.; MU, Y. Dissociation of hydrophobic and charged nano particles in aqueous guanidinium chloride and urea solutions: A molecular dynamics study. **Nanoscale**, v. 4, n. 4, p. 1154-1159, 2012.

LIMA, S.C. **Níveis populacionais de *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae) e dano econômico causado em pimentão (*Capsicum annum* L., 1753) em Iranduba, Amazonas, Brasil**. 2019. 37 f. Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Entomologia) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Coordenação do Programa de Pós-Graduação, INPA, 2019.

- LIMA-MENDONÇA, A.; SANTANA, A.E.G.; NASCIMENTO, R.R. Semioquímicos de moscas das frutas do gênero *Anastrepha*. **Quím. Nova** v. 37, p. 293-301, 2014.
- LIN, Z. et al. Pattern recognition receptors from lepidopteran insects and their biological functions. **Developmental & Comparative Immunology**. v. 108, July, 103688, 2020.
- LIU, Y.L. et al. Unique function of a chemosensory protein in the proboscis of two *Helicoverpa* species. **Journal of Experimental Biology**, 217(10), 1821-1826, 2014.
- LORENZO, M. G. MELO, A. C. A. MARA. Olfacção e Comportamento. In: **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**. Rio de Janeiro: INCT-EM: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular - INCTEM, 2012.
- MALHOTRA, A. Tagging for protein expression. In: **Methods in enzymology**, v. 463, pp. 239-258. 2009.
- MALIK, M.F.; RAHMAN, D.; ALI, L. Pheromone technology for the cotton control of *H. armigera* in Okra. **Asian Jour. Of Planta Sciences**, v.2., n.5, p.409-411, 2003.
- MANZI, L. et al. Carbene footprinting accurately maps binding sites in protein–ligand and protein–protein interactions. **Nature communications**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2016.
- MARQUES, L. Benzoilureias: mecanismo de ação e características dos inseticidas. **Elevagro**. 17 de julho de 2018. Disponível em: <<https://elevagro.com/materiais-didaticos/benzoiluriais/>>. Acesso em: 24 de abril de 2020.
- MARTOS, A. et al. Novel High-Throughput Assay for Polysorbate Quantification in Biopharmaceutical Products by Using the Fluorescent Dye Dil. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 109, n. 1, p. 646-655, 2020.
- MASSON, G.R. et al. Recommendations for performing, interpreting and reporting hydrogen deuterium exchange mass spectrometry (HDX-MS) experiments. **Nature Methods**, v. 16, n. 7, p. 595-602, 2019.
- MASSON, G.R.; JENKINS, M.L.; BURKE, J.E. An overview of hydrogen deuterium exchange mass spectrometry (HDX-MS) in drug discovery. **Expert opinion on drug discovery**, v. 12, n. 10, p. 981-994, 2017.
- MENDES L.G. 5 tecnologias para controlar a “*Helicoverpa armigera*” eficientemente. **Lavoura 10**. 11 de maio de 2018. Disponível em: <<https://blog.aegro.com.br/helicoverpa-armigera/>>. Acesso em: 03 abr. 2020
- MORAES, M.C.B.; LAGO, C.L. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray" aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. **Química nova**, v. 26, n. 4, p. 556-563, 2003.
- MOROCCO, J.A.; ENGEN, J.R. Replication in bioanalytical studies with HDX MS: aim as high as possible. **Bioanalysis**, v. 7, n. 9, p. 1065-1067, 2015.

OGANESYAN, I.; LENTO, C.; WILSON, D.J. Contemporary hydrogen deuterium exchange mass spectrometry. **Methods**, v. 144, p. 27-42, 2018.

PACE, C.N. Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. **Enzyme Structure Part L**, 266–280, 1986.

PELOSI, P. et al. Soluble proteins in insect chemical communication. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 63, n. 14, p. 1658-1676, 2006.

PELOSI, P.; ZHU, J.; KNOLL, W. Odorant-binding proteins as sensing elements for odour monitoring. **Sensors**, v. 18, n. 10, p. 3248, 2018.

PERNOLLET, J. C.; BRIAND, L. Structural recognition between odorants, olfactory-binding proteins and olfactory receptors, primary events in odor coding. In: TAYLOR, A.J.; ROBERTS, D.D. (Ed.). **Flavour Perception**. Blackwell Publishing: Oxford, England, 2008, Chapter 4.

POPHOF, B. Moth pheromone binding proteins contribute to the excitation of olfactory receptor cells. **Naturwissenschaften**, v. 89, n. 11, p. 515-518, 2002.

POWELL, K.D.; FITZGERALD, M.C. Measurements of protein stability by H/D exchange and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using picomoles of material. **Analytical chemistry**, v. 73, n. 14, p. 3300-3304, 2001.

QIU, L. et al. Identification and phylogenetics of *Spodoptera frugiperda* chemosensory proteins based on antennal transcriptome data. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**, p. 100680, 2020.

REDHAIR, M.; CLOUSER, A.F.; ATKINS, W.M. Hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry of membrane proteins in lipid nanodiscs. **Chemistry and physics of lipids** **220**, 14–22, 2019.

RIU, J.; RIUS, F.X. Assessing the accuracy of analytical methods using linear regression with errors in both axes. **Analytical chemistry**, v. 68, n. 11, p. 1851-1857, 1996.

ROULHAC, P.L. et al. SUPREX (stability of unpurified proteins from rates of H/D exchange) analysis of the thermodynamics of synergistic anion binding by ferric-binding protein (FbpA), a bacterial transferrin. **Biochemistry**, v. 43, n. 50, p. 15767-15774, 2004.

SAIKHEDKAR, N.S. et al. Tripeptides derived from reactive centre loop of potato type II protease inhibitors preferentially inhibit midgut proteases of *Helicoverpa armigera*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 95, p. 17-25, 2018.

SIDDIQUI, M.F.; BANO, B. Insight into the functional and structural transition of garlic phytochemical induced by urea and guanidine hydrochloride: A comparative

biophysical study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 20-29, 2018.

SINGH, H.; VERMA, D.; BARDIAUX, B. Single-site phosphorylation within the His-tag sequence attached to a recombinant protein. **Analytical Biochemistry**, v. 570, p. 62-64, 2019.

SOSA-GÓMEZ, D.R. et al. Timeline and geographical distribution of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera, Noctuidae: Heliothinae) in Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 60, n. 1, p. 101-104, 2016.

SOWOLE, M.A.; KONERMANN, L. Effects of protein–ligand interactions on hydrogen/deuterium exchange kinetics: canonical and noncanonical scenarios. **Analytical chemistry**, v. 86, n. 13, p. 6715-6722, 2014.

SPINELLI, S. et al. Crystal structure of *Apis mellifera* OBP14, a C-minus odorant-binding protein, and its complexes with odorant molecules. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, n. 1, p. 41-50, 2012.

STROOBANT, V.; HOFFMANN E. **Mass Spectrometry: Principles and Applications**, 3. Ed. ISBN: 978-1-118-68194-7. p. 46-54, 2013.

SUZANA, C.S. et al. Desempenho de larvas de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes fontes alimentares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 45, n. 4, p. 480-485, 2015.

TIAN K. et al. CYP6B6 is involved in esfenvalerate detoxification in the polyphagous lepidopteran pest, *Helicoverpa armigera*. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 138, 51–56, 2017.

TRABJERG, E.; NAZARI, Z.E.; RAND, K.D. Conformational analysis of complex protein states by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry (HDX-MS): challenges and emerging solutions. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 106, p. 125-138, 2018.

TRAN, D.T. et al. Slow histidine H/D exchange protocol for thermodynamic analysis of protein folding and stability using mass spectrometry. **Analytical chemistry**, v. 84, n. 3, p. 1653-1660, 2012.

VOGT, R.G. et al. A comparative study of odorant binding protein genes: differential expression of the PBP1-GOBP2 gene cluster in *Manduca sexta* (Lepidoptera) and the organization of OBP genes in *Drosophila melanogaster* (Diptera). **Journal of Experimental Biology**, v. 205, n. 6, p. 719-744, 2002.

VOGT, R.G.; GROßE-WILD, E.; ZHOU, JING-JIANG. The Lepidoptera Odorant Binding Protein gene family: Gene gain and loss within the GOBP/PBP complex of moths and butterflies. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 62, p. 142-153, 2015.

VOGT, R.G.; PRESTWICH, G.D.; LERNER, M.R. Odorant-binding-protein subfamilies associate with distinct classes of olfactory receptor neurons in insects. **Journal of neurobiology**, v. 22, n. 1, p. 74-84, 1991.

VOGT, Richard G.; RIDDIFORD, Lynn M. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. **Nature**, v. 293, n. 5828, p. 161-163, 1981.

WINKLER, Robert. ESIprot: a universal tool for charge state determination and molecular weight calculation of proteins from electrospray ionization mass spectrometry data. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 24, n. 3, p. 285-294, 2010.

XIAO, H.; KALTASHOV, I.A.; EYLES, S.J. Indirect assessment of small hydrophobic ligand binding to a model protein using a combination of ESI MS and HDX/ESI MS. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 14, n. 5, p. 506-515, 2003.

XU, Ya-Long et al. Large-scale identification of odorant-binding proteins and chemosensory proteins from expressed sequence tags in insects. **BMC genomics**, v. 10, n. 1, p. 632, 2009.

ZHAI, Lu et al. A rapid method for refolding cell surface receptors and ligands. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-9, 2016.

ZHANG, J.; WALKER, W.B.; WANG, G. Pheromone reception in moths: from molecules to behaviors. In: **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. Academic Press. p. 109-128, 2015.

ZHANG, T. et al. Characterization of three pheromone-binding proteins (PBPs) of *Helicoverpa armigera* (Hübner) and their binding properties. **Journal of Insect Physiology** 58, 941-948, 2012.

ZHANG, T. et al. Construction and analysis of cDNA libraries from the antennae of male and female cotton bollworms *Helicoverpa armigera* (Hübner) and expression analysis of putative odorant-binding protein genes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 407, n. 2, p. 393-399, 2011.

ZHANG, Xiao-Qing et al. Different binding properties of two general-odorant binding proteins in *Athetis lepigone* with sex pheromones, host plant volatiles and insecticides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 2020.

ZHANG, Y. et al. Deep sequencing of antennal transcriptome from *Callosobruchus chinensis* to characterize odorant binding protein and chemosensory protein genes. **Journal of Stored Products Research** 74, 13-21, 2017.

ZHOU, JING-JIANG. Odorant-Binding Proteins in Insects. **Vitamins & Hormones**, v. 83, p. 241-272, 2010.

**4 PRODUTO VEGETAL PARA O CONTROLE DE LARVAS DO *Aedes aegypti*
(LINNAEUS, 1762) (DIPTERA: CULICIDAE)**

4.1 Introdução

A família Annonaceae compreende plantas dicotiledôneas com distribuição tropical em todo o mundo e possui 2.440 espécies, sendo 385 no Brasil (LOBÃO, et al., 2018). Desta família, têm sido obtidos vários tipos estruturais de alcalóides da isoquinolina e acetogeninas, que englobam uma vasta gama de propriedades biológicas, incluindo atividades citotóxicas, imunossupressoras, pesticidas, antiparasitárias e antimicrobianas, além do seu potencial para inibir células resistentes a medicamentos (PIMENTA, L. et al., 2014).

A *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae), também conhecida por 'araticum', 'marolo' ou 'pinha-do-cerrado', é uma árvore frutífera nativa do Cerrado brasileiro, amplamente distribuída por todo o bioma (ARRUDA, et al., 2019). Seus frutos apresentam aroma e sabor característicos e podem ser consumidos *in natura* ou na forma de sucos, licores, sorvetes e geleias, de fácil digestibilidade e alto valor nutritivo, com elevados teores de açúcares, proteínas, vitaminas e sais minerais (PIMENTA, A. et al., 2014). Estudos recentes demonstraram diversas atividades biológicas de extratos de diferentes partes (frutos, casca, sementes e folhas) da *Annona crassiflora* Mart., tais como, atividade moluscicida, larvicida, antimutagênica, antimalárica, antibacteriana e antiproliferativa (PRADO, et al., 2020).

As acetogeninas (ACGs) são os principais compostos identificados no gênero *Annona* e são substâncias naturalmente bioativas. O esqueleto comum das ACGs é caracterizado por um ácido graxo C₃₂ ou C₃₄ não ramificado que termina em uma γ -lactona. Várias funções oxigenadas, como hidroxilas, cetonas, epóxidos, tetra-hidrofuranos (THF) e tetra-hidropiranos (THP), podem estar presentes, assim como ligações duplas e/ou triplas. A partir disso, vários tipos de ACGs foram caracterizados, baseando-se na natureza dos grupos funcionais presentes (LI, et al., 2008). As ACGs constituem uma classe de produtos naturais promissora como protótipos de agentes inseticidas, podendo ser extraídas de sementes, cascas, galhos e raízes de plantas da família Annonaceae. Quando utilizadas contra insetos, as ACGs atuam nas mitocôndrias, inibindo a NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) e provocando, assim, a morte destes organismos (KRINSKI, et al., 2014).

O *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) é o principal vetor competente de flavivírus, sendo o mosquito transmissor da dengue, zika, chikungunya e da febre amarela urbana (AMARASINGHE, et al., 2020).

O Brasil apresentou em 2015 os níveis mais altos de casos de dengue. Aproximadamente 1,5 milhão de pessoas foram infectadas pelo vírus. No ano seguinte, a transmissão do vírus zika, que está relacionado a doenças como microcefalia de recém-nascidos e síndrome de Guillain-Barré, ocasionou grandes impactos no sistema de saúde no mundo (DE SOUZA, et al., 2020). De acordo com a mais recente atualização epidemiológica da Organização Pan-Americana Saúde (OPAS), países e territórios das Américas notificaram mais de 3 milhões de casos de dengue em 2019. Atualmente, a vacina existente não é totalmente efetiva e não existe tratamento específico para infecção viral transmitida pelos mosquitos. A medida mais efetiva de prevenção e combate ao vírus é o controle do vetor. Geralmente, o controle é realizado fazendo-se o uso de organofosforados e piretróides, que são tóxicos ao meio ambiente, e que, quando utilizado com grande frequência e altas dosagens, provocam a resistência do mosquito (DE SOUZA, et al., 2019). Um esforço muito grande têm sido realizado para combinar inseticidas e odorantes de fontes derivadas de plantas (metabólitos secundários) e mamíferos, a fim de desenvolver métodos de controle alternativo aos inseticidas sintéticos (OMONDI, et al., 2019). Os inseticidas vegetais apresentam moléculas biodegradáveis, menos nocivos aos organismos não-alvo, provocam o retardamento do surgimento de resistência e não geram resíduos em alimentos. Essas características são fundamentais para a necessidade de novas substâncias para o controle de pragas. Diversos pesquisadores já relataram a ação inseticida de produtos naturais, preparados a partir de constituintes vegetais, de diferentes espécies e partes de plantas, tais como extratos e óleos essenciais (DE MORAIS, et al., 2016).

Neste trabalho, nosso objetivo foi realizar a elucidação estrutural do princípio ativo contido no extrato alcoólico da casca da raiz da *Annona crassiflora* Mart., que apresentou atividade sobre as larvas do mosquito *A. aegypti*.

4.2 Experimental

4.2.1 Coleta e identificação da *Annona crassiflora* Mart.

A planta foi coletada no dia 01 de maio de 2002, em Planaltina, no Estado de Goiás, identificada pelo botânico Dr. José Elias de Paula e cadastrada no Sisgen sob nº A5B6CC8. Uma exsicata [(JEP 3364(UB)] foi depositada no herbário da Universidade de Brasília.

4.2.2 Reagentes e soluções

Os solventes utilizados na preparação dos extratos, frações e purificações de plantas foram obtidos comercialmente e são de grau analítico de pureza. As soluções foram preparadas com água destilada.

A solução de anisaldeído foi preparada homogeneizando-se em 141 mL de água destilada, 3 mL de anisaldeído, 150 mL de ácido acético glacial e 6 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4). A solução de ácido fosfomolibdico foi preparada pela dissolução de 2,5 g deste em etanol, completando-se o volume até 100 mL de solução. A solução ácida de sulfato cérico foi preparada dissolvendo-se 2,1 g desse composto em uma solução de 21 mL de H_2SO_4 em 20 mL de água destilada. Após completa dissolução, avolumou-se a solução com água destilada até atingir 300 mL. O reagente de Dragendorff foi preparado pela dissolução de 5 g de subnitrito de bismuto em 50 mL de água destilada, seguindo-se da adição de 12 mL de ácido clorídrico, sob agitação e foi adicionado lentamente, 25 g de Iodeto de potássio, ainda sob agitação.

Após a dissolução, o volume foi completado com água destilada para 100 mL. O reagente Dragendorff adaptado (reagente de pulverização de cromatoplacas) foi preparado em um balão de 100 mL, pela adição de 25 mL da solução do reagente Dragendorff previamente descrito, com 18 mL de ácido acético glacial, completando-se o volume com água destilada (MATOS, 1997).

O Reagente de Keddes (ácido dinitrobenzóico a 10% e KOH 2 N em MeOH) é específico para as ACGs, e uma reação positiva produz uma cor rosa / magenta.

4.2.3 Materiais e métodos

A remoção dos solventes das frações e extratos foi realizada em um aparelho rotatório (Buchi, Flamil – Suíça) à pressão reduzida. As soluções de pequeno volume foram concentradas em capela com exaustor à temperatura ambiente. Dessecadores foram utilizados abrigar as amostras em baixo teor de umidade. Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro Perkin Elmer FT 1600 (Perkin Elmerço, Palo Alto CA, USA), em pastilha de KBr (Merk, Darmetada Alemanha). Os espectros na região do Ultravioleta (UV) das amostras em solução metanólica a 1 % foram obtidos utilizando-se espectrofotômetro Perkin Elmer Lambda (Perkin Elmerço, Palo Alto CA, USA). Os espectros de RMN foram obtidos utilizando equipamento Bruker Avance 600 (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C) localizado no Núcleo de Análises e Pesquisa em Ressonância Magnética Nuclear (NAPRMN) da UFAL.

4.2.3.1 Métodos cromatográficos

As colunas cromatográficas foram preparadas utilizando suporte gel de sílica G 60 (70-230 Merck), gel de sílica com 10% de hidróxido de potássio e gel de sílica ativada ou sephadex LH-20 (Pharmacia Uppsala, Suíça), dependendo da fração da amostra e a quantidade de sílica utilizada foi de 20 a 30 vezes a quantidade de material da amostra a ser purificada. As Cromatografias em Camada Delgada (CCD) foram preparadas utilizando-se placas de gel de sílica PF₂₅₄ da Merck (Darmetada Alemanha), tipo AL TLC 20x20 cm.

O critério de pureza adotado para as substâncias isoladas foi a observação de única mancha em CCD em diferentes sistemas de eluentes.

4.2.3.2 Reveladores

As cromatoplasmas foram reveladas por irradiação com luz na região do UV com comprimento de onda (λ) de 254 a 366 nm e inseridas em seguida, em uma cuba com vapor de iodo, subsequentemente borrifadas com solução ácida de sulfato

cérico ou anisaldeído, ou ácido fosfomolibídico e, em seguida, aquecidas em estufa à 100 °C, por 10 minutos ou por borrifação com solução de Dragendorff, sem aquecimento posterior.

4.2.3.3 Obtenção dos extratos da casca da raiz da *Annona crassiflora* Mart.

Foram triturados 7000 g da casca da raiz da *A. crassiflora* e extraídos a frio, utilizando-se etanol a 90 %. O extrato etanólico da casca da raiz (ACCR) foi obtido por remoção do solvente em aparelho rotatório à pressão reduzida, dispondo-se assim, de 603 g do extrato etanólico bruto. Este extrato foi submetido a um processo de partição líquido-líquido, com solventes de polaridade crescente e quatro frações foram obtidas: em hexano (Hex) (ACC-1; 6,94 g), clorofórmio (CHCl₃) (ACCR-2; 285,54 g), acetato de etila (AcOEt) (ACCR-3; 2,97 g) e hidroalcoólica (ACCR-4; 4,25 g). As frações foram testadas quanto à atividade larvicida. De acordo com os resultados dos bioensaios, a fração clorofórmica foi selecionada para o seguimento do trabalho. O isolamento foi guiado pelo ensaio da atividade larvicida sobre o mosquito *A. aegypti*. O extrato bruto da raiz da *A. crassiflora* foi submetido ao teste de prospecção fitoquímica, de acordo com MATOS (1997).

4.2.4 Prospecção fitoquímica do extrato bruto da raiz da *A. crassiflora*

4.2.4.1 Teste para fenóis e taninos

Os extratos foram separados em diferentes tubos de ensaio e em seguida, reuniram-se três gotas de solução alcoólica de cloreto de ferro (III) (FeCl₃). Agitou-se observando se haveria variação na coloração e/ou formação de precipitado escuro abundante. A reação foi comparada a um teste do branco, que continha apenas água e FeCl₃.

- A coloração variando entre azul e vermelho é indicativo de fenóis, quando o teste do branco for negativo.

- A formação de um precipitado azul escuro indica a presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis). A cor verde indica a presença de taninos flobabênicos (taninos condensados ou catéquicos).

4.2.4.2 Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonoides

Foram separados três tubos, numerando-os de 1 a 3. O primeiro tubo foi acidulado pela adição de ácido clorídrico (HCl) a pH 3, o segundo e o terceiro foram alcalinizados pela adição de hidróxido de sódio (NaOH) a pH 8,5 e pH 11, respectivamente. A observação de qualquer mudança na coloração das soluções foram interpretadas como descritas abaixo.

Constituintes	Coloração no meio		
	pH 3	pH 8,5	pH 11
Antocianinas e antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul-púrpura
Flavonas, flavonóis e xantonas	-	-	Amarela
Chalconas e auronas	Vermelha	-	Verm-púrpura
Flavanonóis	-	-	Verm-laranja

4.2.4.3 Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavononas

Foram separados dois tubos. O primeiro tubo foi acidulado pela adição de HCl, a pH 1-3 e o segundo foi alcalinizado pela adição de NaOH a pH 11. Os tubos foram cuidadosamente aquecidos e foram observadas mudanças na coloração, pela comparação do branco analítico. A observação de qualquer mudança na coloração das soluções foi interpretada como descritas abaixo.

Constituintes	Coloração no meio	
	pH 1-3	pH 11
Leucoantocianidinas	Vermelha	-
Catequinas (taninos catéquicos)	Pardo-amarelada	-
Flavononas	-	Verm laranja

4.2.4.4 Teste para flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas

Foram adicionados alguns miligramas de magnésio granulado e 0,5 mL de HCl concentrado em um tubo contendo o extrato. Aguardou-se o final da efervescência observada na reação e observou-se a mudança na coloração da mistura (meio ácido). Comparou-se a mudança na coloração com as soluções em meio ácido dos testes 4.3.2.2 e 4.3.2.3. O aparecimento da cor vermelha foi indicativo da presença de flavonóis, flavanonas, flavanonóis e/ou xantonas, livres ou seus heterosídeos.

4.2.4.5 Teste para antraquinonas, antronas e cumarinas

Em um pedaço de papel de filtro não fluorescente, foram feitas duas aplicações das soluções testes dos extratos de aproximadamente 1,5 mm de diâmetro utilizando-se um capilar de vidro. Aplicou-se uma gota de solução de hidróxido de potássio (KOH) a 1 M, sobre uma das manchas. Em seguida, as manchas foram parcialmente cobertas com um cartão opaco não fluorescente e expostas a ação da luz UV, por aproximadamente 2-3 minutos. Removeu-se a cobertura, ainda sob a ação da luz UV e observou-se a ocorrência da mudança na fluorescência da mancha em meio alcalino (pH 11).

- A fluorescência azulada, forte, visível na metade não encoberta da mancha alcalinizada indicou a presença de cumarina.
- A cor vermelha indica antraquinona e a cor amarela indica antrona.

4.2.4.6 Teste para alcaloides

Uma amostra do extrato bruto da raiz da *A. crassiflora* foi separada em um tubo, solubilizados com metanol (MeOH) e cromatografada por CCD. O reagente de Dragendorff foi utilizado para revelar o cromatograma após a eluição. O aparecimento de mancha laranja sugere a presença de alcaloides.

4.2.4.7 Teste para esteroides e triterpenóides Liebermann-Buchard

Foram adicionados 10 mL de uma solução etanólica do extrato bruto em um béquer e deixou-se secar em banho-maria. Ao resíduo seco foi adicionado aproximadamente 1,5 mL de CHCl_3 . Filtrou-se a solução em um pequeno funil fechado com uma bolinha de algodão, coberta com miligramas de sulfato de sódio anidro, para um tubo de ensaio seco. Adicionou-se 1 mL de anidrido acético e agitou-se suavemente. Em seguida, adicionou-se três gotas de H_2SO_4 concentrado e agitou-se novamente, observando a coloração. A cor azul seguida de verde permanente indica a presença de esteroides livres. A cor parda para avermelhada indica triterpenóides pentacíclicos livres.

4.2.5 Filtração em gel de sílica da fração em clorofórmio (ACCR-2; 280 g)

A fração foi filtrada em gel de sílica, com solventes em ordem crescente de polaridade e foram obtidas cinco frações (Tabela 13).

Tabela 13 - Cinco frações obtidas da fração em clorofórmio (ACCR-2).

Solvente	Amostra	Massa
Hex/ CHCl_3 1:1	ACCR-2.1	110 g
CHCl_3	ACCR-2.2	50 g
AcOEt	ACCR-2.3	72,12 g
AcOEt/MeOH 1:1	ACCR-2.4	16,74 g
Metanol (MeOH)	ACCR-2.5	20 g

A fração Hex/ CHCl_3 1:1 (ACCR-2.1; 110 g) além de ter sido a de maior quantidade de amostra obtida, também foi a que apresentou melhor atividade biológica, e por isso, foi selecionada para o estudo da atividade larvicida e de toxicidade.

4.2.6 Filtração em gel de sílica da fração Hex/CHCl₃ 1:1 (ACCR-2.1; 109 g)

A fração foi filtrada sob vácuo e forneceu nove novas frações (Tabela 14).

Tabela 14 - Nove frações obtidas da fração Hex/CHCl₃ 1:1 (ACCR-2.1; 110 g).

Solvente	Amostra	Massa
Hexano	ACCR-2.1.1	4,23 g
Hex/AcOEt 5 %	ACCR-2.1.2	10,02 g
Hex/AcOEt 10 %	ACCR-2.1.3	24 g
Hex/AcOEt 20 %	ACCR-2.1.4	19,10 g
Hex/AcOEt 30 %	ACCR-2.1.5	15,56 g
Hex/AcOEt 1:1	ACCR-2.1.6	7,510 g
AcOEt	ACCR-2.1.7	9,32 g
AcOEt/MeOH 5 %	ACCR-2.1.8	4,32 g
AcOEt/MeOH 20 %	ACCR-2.1.9	7 g

A fração Hex/AcOEt 10 % 1:1 (ACCR-2.1.3) apresentou melhor separação em CCD e foi submetida a filtração a vácuo, fornecendo as onze frações apresentadas na tabela 15.

Tabela 15 - Onze frações obtidas da fração Hex/AcOEt 10 % 1:1 (ACCR-2.1.3).

Solvente	Massa
Hexano	0,50 g
Hex/AcOEt 2,5 %	1 g
Hex/AcOEt 5 %	1,70 g
Hex/AcOEt 7,5 %	1,50 g
Hex/AcOEt 10 %	1,32 g
Hex/AcOEt 15 %	2,70 g
Hex/AcOEt 25 %	1,67 g
Hex/AcOEt 1:1	4 g
AcOEt	2,04 g
AcOEt/MeOH 5 %	1,42 g

4.2.7 Bioensaios larvicida

Os ovos para criação do *A. aegypti* foram mantidos em condições de laboratório a temperatura ambiente ($25 - 27^{\circ}\text{C} \pm 2$). A colônia foi iniciada a partir da eclosão dos ovos em água desclorada, também à temperatura ambiente. A água da torneira desclorada foi obtida por filtração através de um filtro de carvão, seguido de ar borbulhante e aquecimento por 48 horas. As larvas foram mantidas em bacias com água desclorada (diariamente substituídas) e alimentadas com ração para gato.

No teste preliminar em duplicata as larvas foram separadas em ecdise do 3º para o 4º ínstar. Foram utilizadas 10 larvas, colocadas em um recipiente contendo água desclorada, ajustando-se o volume final para 100 mL com a solução estoque do extrato bruto da casca da raiz, necessária para uma concentração final de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para estabelecer os valores das concentrações letais (CL) de extratos em ppm suficientes para matar 10, 50 e 90 % das larvas, diluições de 10 vezes da solução estoque de extrato foram realizadas, respectivamente, dentro de 48 horas. As soluções dos materiais a serem testados foram preparadas nas concentrações iniciais de 500 ppm, pela solubilização em água com dimetilsulfóxido (DMSO) a 1 %. As larvas eram consideradas mortas quando não respondiam aos estímulos ou quando não conseguiam chegar à superfície (WORLD HEALTH ORGANISATION, 1981). A leitura e contagem do total de larvas (mortas e vivas) foram efetuadas em 0, 24 e 48 horas. O controle negativo foi realizado pelo tratamento das larvas com água desclorada ou com 1% de DMSO em água desclorada. O controle positivo foi realizado pelo tratamento $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Temefos (larvicida organofosfato usado para tratar a água infestada de insetos transmissores de doenças) em água desclorada. Este bioensaio foi descrito por DE OMENA, et al. (2007).

- Bioensaio para determinação da toxicidade em *Artemia salina*

Este bioensaio foi realizado utilizando-se larvas do crustáceo *Artemia salina*, como guia para o isolamento da substância bioativa, por ser organismo-alvo indicador de atividade biológica. Com este teste é possível detectar uma grande variedade de substâncias bioativas que podem estar presentes no extrato. Larvas de

A. salina com 48 horas após a eclosão, em estágio de nauplius, foram utilizadas neste bioensaio. Uma solução estoque a 3000 ppm foi preparada adicionando-se 15 mg do extrato em 5 mL de água do mar a 1 % de DMSO. A solução foi diluída em concentrações de 1000, 100, 10 e 1 ppm. Entre 15 a 20 crustáceos foram testados em duplicata, na cuba-teste, para cada diluição. A importância deste ensaio está em realiza-lo juntamente a outro bioensaio biológico (CEPLEANU, 1993).

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Avaliação da atividade larvicida do extrato etanólico da casca da raiz da *A. crassiflora* frente as larvas do *A. aegypti* e da *A. salina*

O extrato etanólico apresentou $CL_{50} < 200 \mu\text{g mL}^{-1}$ frente as larvas do *A. aegypti*. Foram determinados valores de CL_{10} , CL_{50} e CL_{90} iguais a 0,09 ppm, 0,71 ppm e 5,12 ppm, respectivamente, frente as larvas do 4º instar do mosquito *A. aegypti* (DE OMENA, et al., 2007). Dos bioensaios com as larvas da *A. salina* foram determinados valores de CL_{10} , CL_{50} e CL_{90} iguais a 0,09 ppm, 0,19 ppm e 0,40 ppm, respectivamente (DOS SANTOS, et al., 2002).

Esses valores podem ser comparados ao do extrato da raiz rotenona (*Derris* spp.: Fabaceae) que contém o composto flavonoidico de ação inseticida e pesticida com CL_{50} de $8,54 \mu\text{g mL}^{-1}$ (DE OMENA, et al., 2007).

Os bioensaios da atividade biológica foram realizados frente as larvas do mosquito *A. aegypti* e as larvas da *A. salina*. Foram considerados ativos os extratos que apresentavam no mínimo 40% de mortalidade frente as larvas, em concentração de 500 ppm.

4.3.2 Avaliação da toxicidade

Esta avaliação foi feita para os extratos obtidos da partição líquido-líquido da casca da raiz da *A. crassiflora*, descritos no item 4.3.1.

O extrato em clorofórmio (ACCR-2) apresentou maior percentual de mortalidade em concentrações de 1000, 100 e 10 ppm (100 %), além de ter sido observado 95 % de mortalidade em concentrações de 1 ppm (Tabela 16).

Tabela 16 - Atividade larvicida frente a *A. salina* do extrato bruto e frações da partição da casca da raiz da *A. crassiflora*.

Extrato	% de larvas mortas			
	Concentração (ppm)			
	1000	100	10	1
ACCR	100 %	100 %	100 %	100 %
ACCR-1	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo
ACCR-2	100 %	100 %	100 %	95 %
ACCR-3	100 %	100 %	60 %	Inativo
ACCR-4	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo

4.3.3 Avaliação da atividade larvicida frente ao *A. aegypti*

Como observado no teste de toxicidade para a *A. salina* (Tabela 16), o extrato em clorofórmio (ACCR-2) foi o mais ativo. Este dado foi também observado para o *A. aegypti*, tendo sido este extrato o de maior atividade, com percentual de mortalidade de 100 % nas concentrações de 500 e 100 ppm, em menos de 24 horas. Além disso, na concentração de 25 ppm, obteve-se percentuais de mortalidade de 95 % após 24 horas e de 100 % após 48 horas (Tabela 17).

Tabela 17 - Atividade larvicida frente as larvas do *A. aegypti* do extrato bruto e frações da partição da casca da raiz da *A. crassiflora*.

Extrato	Concentração (ppm)	% de larvas mortas	
		Até 24 horas	48 horas
ACCR	500	100 %	100 %
ACCR-1	500	Inativo	Inativo
ACCR-2	500 / 100	100 %	-
	25	95 %	100 %
ACCR-3	500	85 %	100 %
	100	75 %	100 %
	50	40 %	90 %
ACCR-4	500	Inativo	Inativo

Esta fração mais ativa (ACCR-2) foi então selecionada para avaliação dos experimentos posteriores.

4.3.4 Avaliação da atividade larvicida da fração Hex/CHCl₃; ACCR-2, frente ao *A. aegypti*

Das cinco frações (descritas no item 4.3.4) provenientes da filtração do extrato em clorofórmio (ACCR-2), as frações ACCR-2.2, ACCR-2.4 e ACCR-2.5 apresentaram baixo percentual de mortalidade a 500 ppm e foram consideradas inativas. A fração ACCR-2.3 (AcOEt) apresentou percentual de mortalidade de 100 % em menos de 24 horas, na concentração de 500 ppm. Entretanto, no bioensaio de atividade a fração ACCR-2.1 apresentou percentual de mortalidade em todas as concentrações testadas, frente a *A. salina* (Tabela 18).

Tabela 18 - Atividade larvicida da fração Hex/CHCl₃; ACCR-2, frente a *A. salina*.

Extrato	% de larvas mortas			
	Concentração (ppm)			
	1000	100	10	1
ACCR-2.1	100 %	100 %	100 %	100 %

Esta fração também apresentou maior percentual de mortalidade no bioensaio da atividade larvicida frente ao *A. aegypti*, em concentrações de 500, 100 e 25 ppm (Tabela 19).

Tabela 19 - Atividade larvicida da fração Hex/CHCl₃; ACCR-2, frente ao *A. aegypti*.

Extrato	Concentração (ppm)	% de larvas mortas	
		Até 24 horas	48 horas
ACCR-2.1	500	100 %	
	100	100 %	
	25	45 %	70 %

De acordo com esses resultados, seguiu-se com a purificação da fração do extrato ACCR-2.1.

4.3.5 Biensaíios da fração Hex/CHCl₃; ACCR-2.1

4.3.5.1 Atividade de toxicidade e larvicida

A fração Hex/CHCl₃; ACCR-2.1 foi submetida a filtração em gel de sílica e das frações obtidas, a fração ACCR-2.1.3 apresentou 100 % de mortalidade em todas as concentrações testadas, frente a *A. salina* (Tabela 20) e frente ao *A. aegypti*, na concentração de 500 ppm.

Tabela 20 - Atividade larvicida das frações da filtração Hex/CHCl₃; ACCR-2.1, frente a *A. salina*.

Extrato	% de larvas mortas			
	Concentração (ppm)			
	1000	100	10	1
ACCR-2.1.1	100 %	75 %	54,54 %	Inativo
ACCR-2.1.2	100 %	100 %	100 %	100 %
ACCR-2.1.3	100 %	100 %	100 %	100 %
ACCR-2.1.8	100 %	100 %	95 %	14,15 %

Não foi possível testar as frações ACCR-2.1.4, ACCR-2.1.5, ACCR-2.1.6, ACCR-2.1.7 e ACCR-2.1.9

Tabela 21 - Atividade larvicida frente ao *A. aegypti* das nove frações obtidas da filtração da fração Hex/CHCl₃; ACCR-2.1.

Extrato	Concentração (ppm)	% de larvas mortas
		Até 24 horas
ACCR-2.1.2	500	100 %
ACCR-2.1.3	500	100 %
ACCR-2.1.4	500	100 %
ACCR-2.1.5	500	100 %
ACCR-2.1.6	500	100 %
ACCR-2.1.7	500	100 %

Não foi possível realizar o teste com as frações: ACCR-2.1.1, ACCR-2.1.8 e ACCR-2.1.9

Com isso, a fração ACCR-2.1.3 (Hex/CHCl₃) foi submetida a uma nova filtração, que resultou em onze frações (descritas no item 4.3.4). As frações foram submetidas a cromatografia em coluna em gel de sílica, mas apenas seis frações continham quantidade suficientes para dar continuidade aos experimentos. Com estas seis frações foram realizados bioensaio de toxicidade frente a *A. salina*, apresentados na tabela 22.

Tabela 22 - Atividade larvicida das frações obtidas da filtração ACCR-2.1.3 (Hex/CHCl₃), frente a *A. salina*.

Extrato	% de larvas mortas			
	Concentração (ppm)			
	1000	100	10	1
Hex/AcOEt 2,5 %	89,25 %	39,13 %	24 %	9,5 %
Hex/AcOEt 5 %	100 %	95 %	6,6 %	Inativo
Hex/AcOEt 7,5 %	100 %	95 %	19,35 %	8 %
Hex/AcOEt 10 %	100 %	100 %	79,4 %	16 %
Hex/AcOEt 15 %	100 %	100 %	100 %	17,94 %
Hex/ AcOEt 25 %	100 %	100 %	100 %	80,77 %

As frações foram recromatografadas e agrupadas de acordo com os resultados em CCD. Das frações Hex/AcOEt 2,5; 7,5; 15 e 25 % obtiveram-se misturas complexas e não foi possível purifica-las. Além disso, geraram quantidades muito pequenas de amostra.

Os compostos provenientes das frações Hex/AcOEt 5 e 10 % foram purificados e submetidos a um teste de coloração, usando o reagente Keddes, esta técnica é bem estabelecida para identificar ACGs em extratos de folhas, sementes e outras estruturas vegetais, por cromatografia em camada fina. O reagente Keddes reage com o grupo funcional γ -lactona- β -insaturado, comumente encontrada em ACGs de anonáceas (HERNÁNDEZ, et al., 2015). A reação testou positivo para o composto da fração Hex/AcOEt 10 %, caracterizado por um composto de aspecto oleoso (1,32 g) e cor amarelada, que foi incorporado em gel de sílica e cromatografado em coluna, utilizando-se como eluente hex/AcOEt. Foram coletadas frações de 10 mL e estas, foram agrupadas de acordo com os resultados em CDD (Tabela 23).

Tabela 23 - Frações obtidas por CCD da fração Hex/AcOEt 10 %.

Grupos	Frações	Massa
I	1 – 5	0,04 g
II	6 – 10	0,05 g
III	13 – 17	0,446 g
IV	18 – 22	0,35 g
V	23 – 31	0,32 g

As frações dos grupos I e II não possuíam quantidade suficiente para continuidade do trabalho. As frações dos grupos IV e V também eram misturas complexas e não foi possível purificar. As frações do grupo III, foram recromatografadas e foi obtido um composto pastoso de ponto de fusão 40 °C, denominado **ANCR-2 (BRAC)**, contendo a acetogenina, pelo teste de Keddes.

4.3.6 Prospecção fitoquímica da espécie *A. crassiflora*

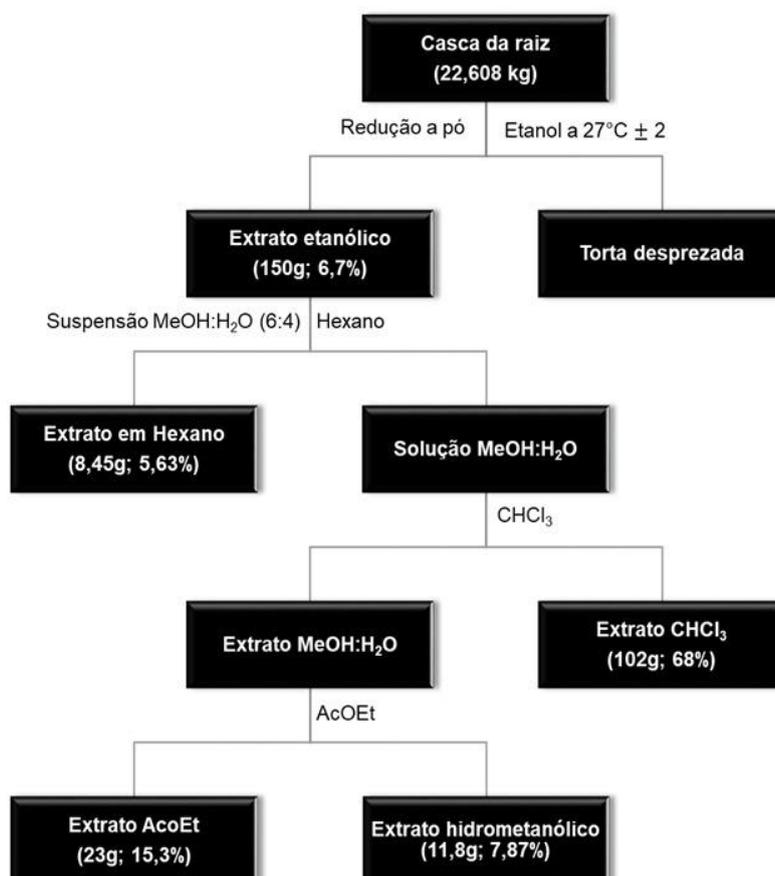
O processo de isolamento dos constituintes dos extratos selecionados da *A. crassiflora* foi guiado pelos bioensaios da atividade e toxicidade. Complementarmente, o teste de prospecção foi realizado como base e orientação deste processo (Tabela 24). Vale ressaltar que a presença de um constituinte pode mascarar a coloração indicativa pela presença de outro constituinte.

Tabela 24 - Prospecção fitoquímica dos extratos de da casca da raiz da *A. crassiflora*.

POSITIVO	NEGATIVO
	Antocianinas
Fenóis	Antocianidinas
Taninos	Leucoantocianidinas
Flavonóides	Catequinas
Estereóides	Flavononas
Triterpenos	Flavonóis
Alcalóides	Flavanonas
Cumarinas	Flavanonóis
	xantonas
	Quinona

O fluxograma apresentado na figura 79 resume as etapas do processo de obtenção da acetogenina de estudo.

Figura 79 - Fluxograma do processo de obtenção da acetogenina de estudo.

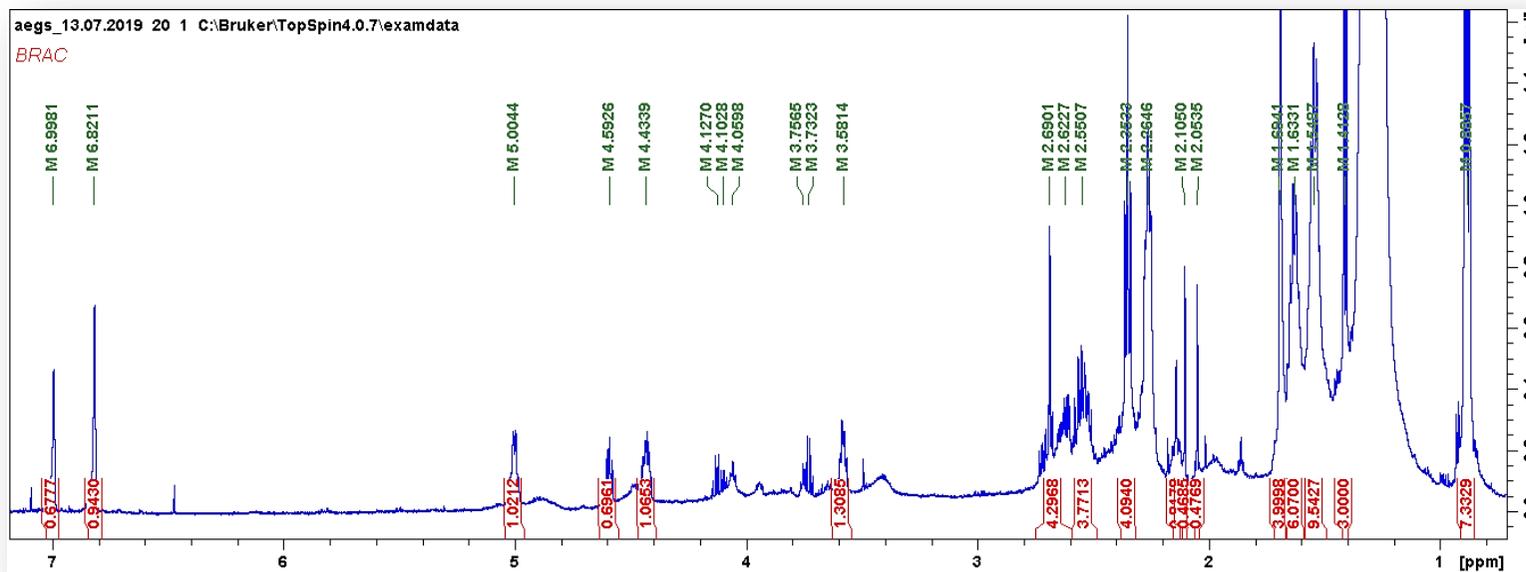


Do extrato AcoEt (25g; 15,3%) foi obtida a acetogenina **ANCR-2** (BRAC).

4.3.7 Identificação parcial da estrutural da amostra BRAC

A análise do espectro de RMN ^1H (Fig. 80) para a amostra BRAC permitiu a observação de um duplete em δ 1,41 referente a um grupo metila; um quarteto em δ 5,00 característico de dupla ligação; seguido dos deslocamentos químicos em δ 7,00 e δ 6,82. A identificação desses sinais permitiu confirmar a presença do anel γ -lactona- α,β -insaturada.

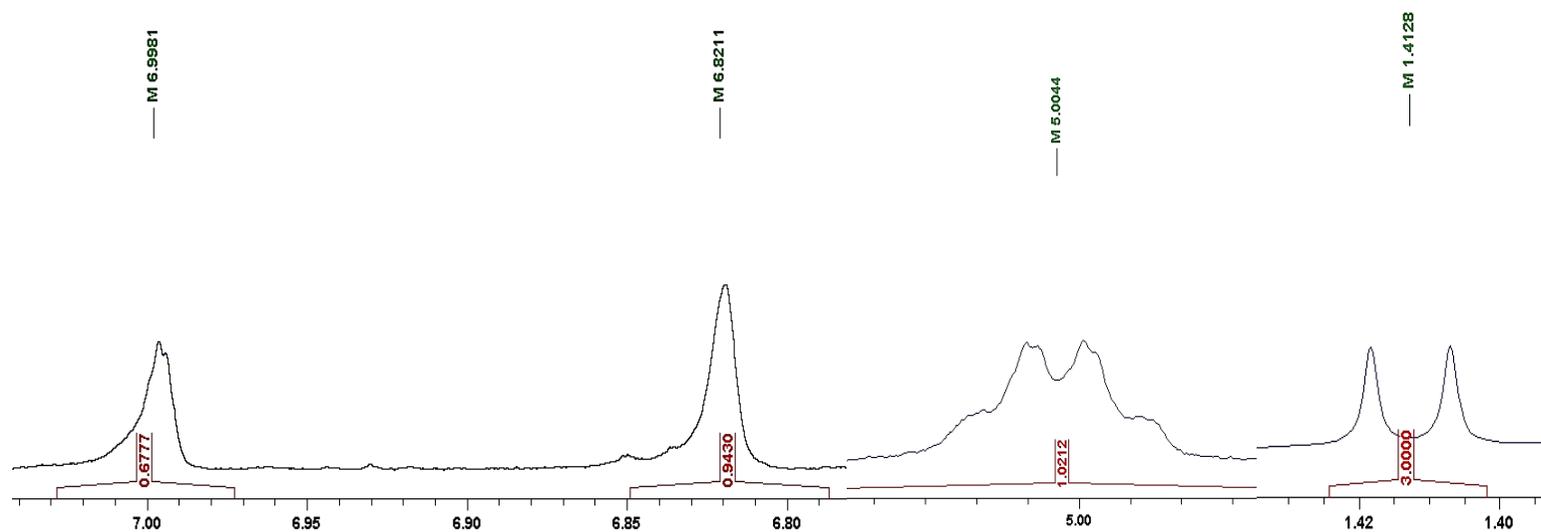
Figura 80 - Espectro de RMN ^1H , em CDCl_3 , para a amostra BRAC.



Fonte: Autora, 2020

As regiões do espectro, na qual aparecem os sinais característicos do anel γ -lactona α,β -insaturada, foram ampliadas e estão dispostas na Figura 81.

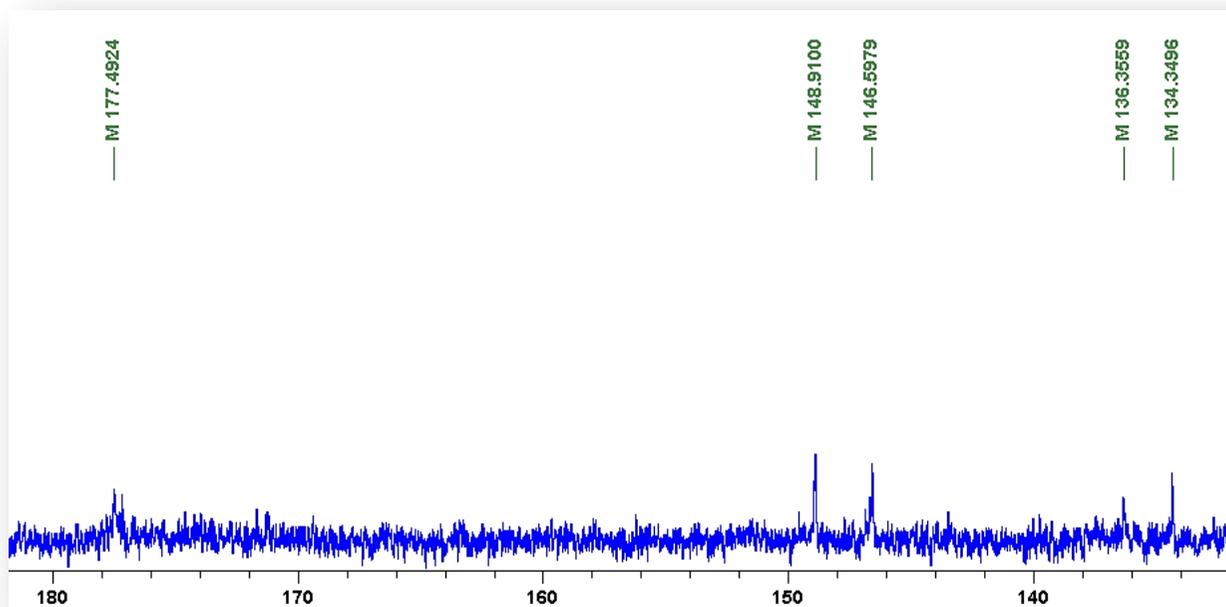
Figura 81 - Ampliação das regiões do espectro de RMN ^1H de BRAC, em CDCl_3 , onde estão os sinais que confirmam o anel γ -lactona α,β -insaturado.



Fonte: Autora, 2020

Na análise do espectro de RMN ^{13}C é possível observar sinais referentes aos carbonos característicos do anel γ -lactona α,β -insaturada em δ 19,20 referente ao grupo metila ligado ao anel; em δ 134,20; δ 148,91 e δ 177,49 como apresentado na figura 82.

Figura 82 - Ampliação das regiões do espectro de RMN ^{13}C de BRAC, em CDCl_3 que evidenciam a presença do anel γ -lactona α,β -insaturada.

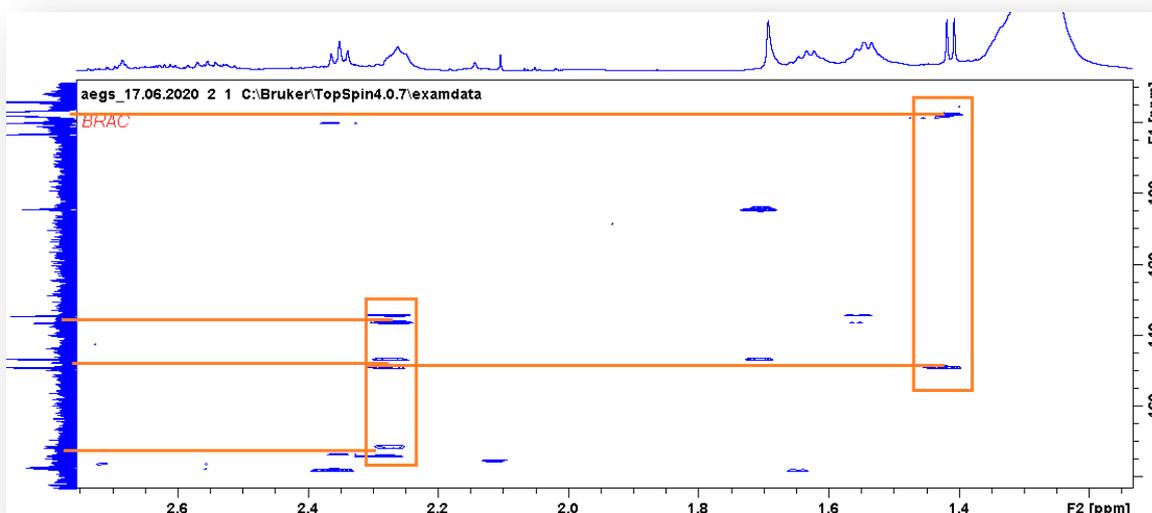


Fonte: Autora, 2020

Para confirmar a atribuição dos sinais do anel γ -lactona α,β -insaturada (Fig. 84), foram realizados os experimentos HSQC e HMBC.

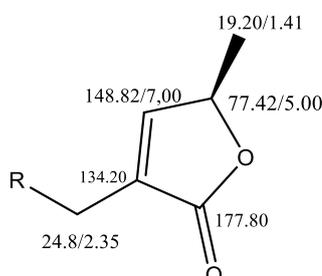
Conforme a figura 83, observou-se o acoplamento a longa distância dos hidrogênios da metila em δ 1,41 com os carbonos em δ 77,42 e δ 148,82; e o acoplamento dos hidrogênios metilênicos em δ 2,26 com o carbono olefínico em δ 148,82 e como carbono carbonílico em δ 177,49.

Figura 83 - Região do espectro HMBC da amostras BRAC, em CDCl_3 , mostrando os acoplamentos a longa distância entre os hidrogênios do grupo metila e grupo metilênico com os demais carbonos do anel da lactona.



Fonte: Autora, 2020

Figura 84 - Subunidade anel γ -lactona α,β -insaturada na qual estão dispostas as atribuições dos sinais de hidrogênio característicos desse grupo.

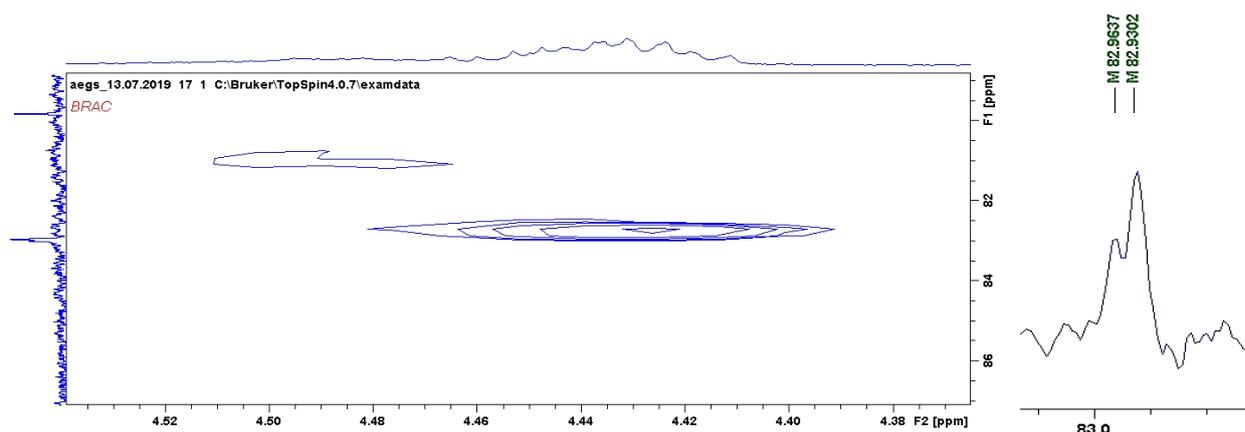


Fonte: Autora, 2020

O THF é uma das unidades comuns em acetogeninas, e com o objetivo de identificá-la foi realizada uma análise parcial no espectro de RMN ^{13}C . Os Sinais

característicos de THF foram observados em δ 82,96 e δ 82,93 no RMN ^{13}C (Figura 85). Com o objetivo de confirmar a presença do THF, foi analisado o experimento HSQC que mostrou o acoplamento do carbono em δ 82,96 com o hidrogênio em δ 4,44 identificado como um multipeto no espectro de RMN ^1H .

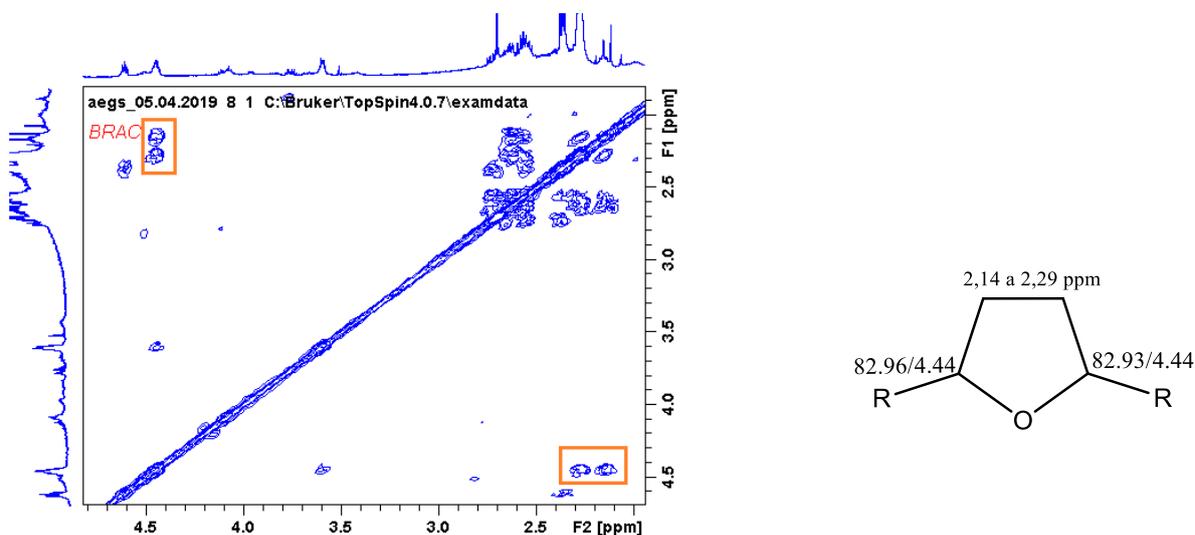
Figura 85 - Ampliação das regiões dos espectros de HSQC e RMN ^{13}C da amostra BRAC, em CDCl_3 , mostrando a correlação direta entre os carbonos e hidrogênios do THF.



Fonte: Autora, 2020

O experimento COSY (Fig. 86) resultou no acoplamento entre o hidrogênio em δ 4,44 com os hidrogênio sem δ 2,29 e δ 2,14 confirmando de maneira inequívoca a presença da subunidade THF.

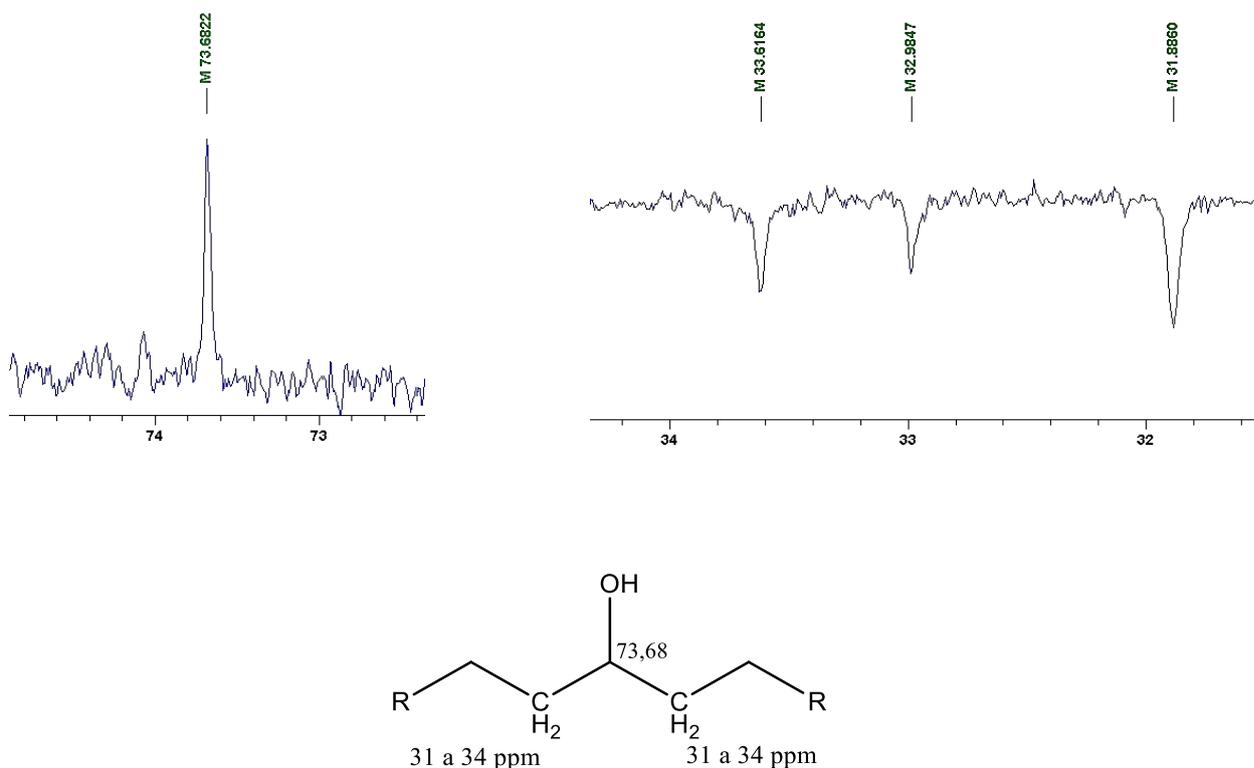
Figura 86 - Região do espectro COSY, em CDCl_3 , onde destaca-se em laranja os acoplamentos entre os hidrogênios metínicos com os hidrogênios metilênicos do anel THF.



Fonte: Autora, 2020

Outra região no espectro DEPT 135 ^{13}C foi observado três sinais de deslocamento químico em 31,88; 32,98 e 33,61 (Fig. 87). Estes carbonos metilênicos são da cadeia alifática (CH_2), adjacentes a carbonos ligados a grupos OH, que foi identificado em 73,68 indicando que a acetogenina contém uma hidroxila.

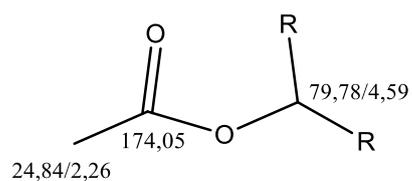
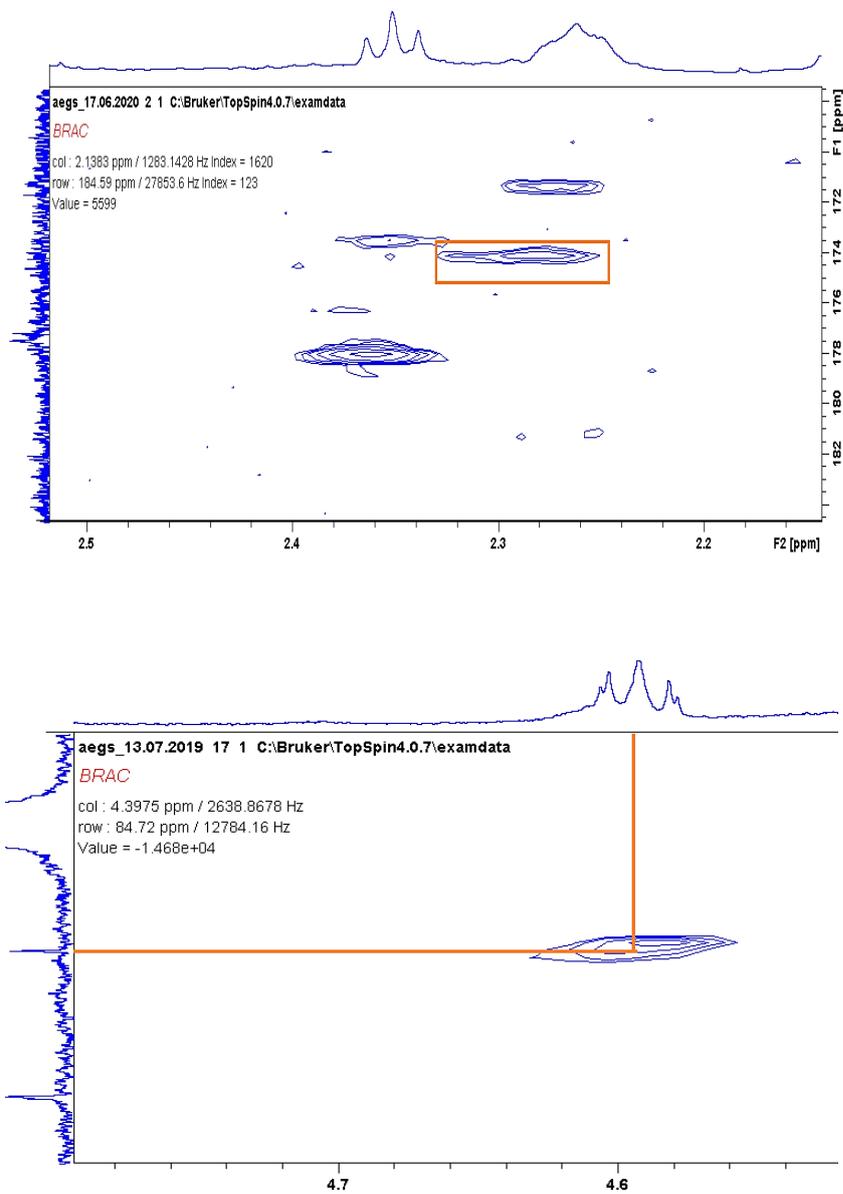
Figura 87 - Região do espectro DEPT135, em CDCl_3 , onde destaca-se os três carbonos metilênicos e o carbono metínico ligado ao grupo hidroxila do fragmento da acetogenina presente na amostra BRAC.



Fonte: Autora, 2020

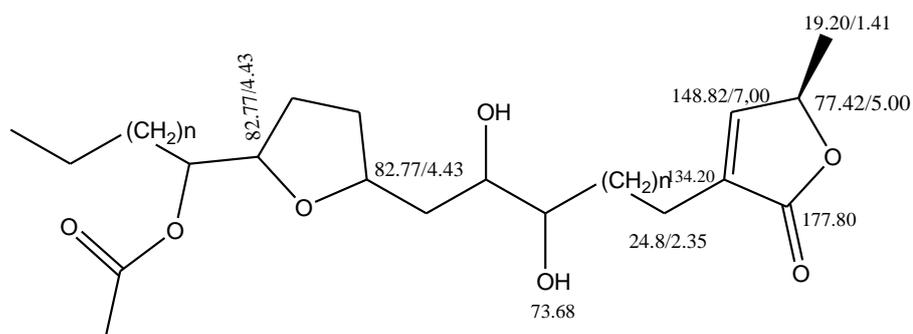
Na análise parcial do espectro DEPT135 foi observado uma metila em 24,82, sendo o hidrogênio em 2,26 referente a mesma. Ao analisar o espectro HMBC observou-se que esse hidrogênio está acoplado a um carbono carbonílico em 174,05. O experimento HSQC confirma a presença do hidrogênio em 4,59 ligado ao carbono em 79,66 referente ao carbono metínico ligado a oxigênio, caracterizando a presença de um grupo acetóxi na acetogenina da amostra BRAC (Figura 88).

Figura 88 - Região dos espectros (a) HMBC e (b) HSQC, em CDCl_3 , onde destaca-se os sinais característicos de um grupo acetoxi provavelmente presente na amostra BRAC.



Com isso, uma estrutura parcial foi proposta para a amostra obtida e analisada (Fig. 89).

Figura 89 - Estrutura parcial proposta para a acetogenina isolada.



Fonte: Autora, 2020

4.4 Conclusão

Para dar sequência a essa análise, a amostra **ANCR-2** (BRAC) deverá ser submetida a análise de RMN pela técnica de difusão – DOSY com o objetivo de obter os espectros dos componentes da mistura. Posteriormente faremos as análises por espectroscopia de massas para a definição da estrutura.

REFERÊNCIAS

- AMARASINGHE, L. D. et al. Comparative study on larvicidal activity of green synthesized silver nanoparticles and *Annona glabra* (Annonaceae) aqueous extract to control *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Heliyon**, v. 6, n. 6, p. 4322, 2020.
- ARRUDA, H.S.; PASTORE, G.M. Araticum (*Annona crassiflora* Mart.) as a source of nutrients and bioactive compounds for food and non-food purposes: A comprehensive review. **Food Research International**. v. 123, p. 450–480, 2019.
- CEPLEANU, F. **Validation Application of Trees Bench-Top Biossays for Screening of Crude Plant Extracts and Subsequente Activity-Guided Isolation**. These de Doctoral. Universidade de Lousane – Faculté des Sciences – Institut Pharmacognosy and Phytochemistry – Suíça, 1993.
- DE MORAIS, L.A.S.; MARINHO-PRADO, J.S. Plantas com Atividade Inseticida. In: HALFELD-VIEIRA, B. de A. et al. **Defensivos Agrícolas Naturais: Uso e Perspectivas**. Brasília, DF: Embrapa. Cap. 19. p. 542-593, 2016.
- DE OMENA, M. C. et al. Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. **Bioresource Technology**, v. 98, n 13, p. 2549-2556, 2007.
- DE SOUZA, L.M. et al. Curcumin in Formulations against *Aedes aegypti*: Mode of action, Photolarvicidal and ovicidal activity. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, p. 101840, 2020.
- DE SOUZA, M.A. et al. Adulticide and repellent activity of essential oils against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) – A review. **South African Journal of Botany**. v. 124, p. 160-165, 2019.
- DOS SANTOS, A.F.; SANT'ANA, A.E.G. Toxicity of Some Species of *Annona* Toward *Artemia salina* Leach and *Biomphalaria glabrata* Say. In: **Natural Products in the New Millennium: Prospects and Industrial Application**. Springer, Dordrecht. p. 263-270, 2002.
- HERNÁNDEZ, G.L. et al. Histochemical detection of acetogenins and storage molecules in the endosperm of *Annona macrophyllata* Donn Sm. seeds. **European Journal of Histochemistry: EJH**, v. 59, n. 3, 2015.
- KRINSKI, D.; MASSAROLI, A.; MACHADO, M. Potencial inseticida de plantas da família Annonaceae. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. spe1, p. 225-242, 2014.
- LI, N., SHI, Z., TANG, Y., CHEN, J., & LI, X. Recent progress on the total synthesis of acetogenins from Annonaceae. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 4, p. 48, 2008.
- LOBÃO, A.Q.; DE CARVALHO J.L.; DE MELLO-SILVA, R. Check-list das Annonaceae do estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. **Iheringia. Série Botânica.**, v. 73, p. 123-126, 2018.

MATOS, F.J. de A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. edições UFC, 1997.

OMONDI, Wyckliff P. et al. Differential response to plant-and human-derived odorants in field surveillance of the dengue vector, *Aedes aegypti*. **Acta Tropica**, v. 200, p. 105163, 2019.

PIMENTA, A.C. et al. Caracterização de plantas e de frutos de araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart.) nativos no Cerrado Matogrossense. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 36(4), 892-899, 2014.

PIMENTA, Lúcia Pinheiro Santos et al. *In vivo* antimalarial efficacy of acetogenins, alkaloids and flavonoids enriched fractions from *Annona crassiflora* Mart. **Natural Product Research**, v. 28, n. 16, p. 1254-1259, 2014.

PRADO, L.G. et al. Antioxidant, antiproliferative and healing properties of Araticum (*Annona crassiflora* Mart.) peel and seed. **Food Research International**. FRIN 109168, 2020.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O trabalho com a *Erinnyis ello* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Sphingidae) precisa da realização de mais experimentos para confirmar a atividade dos compostos obtidos, realizar a identificação de outros compostos EAG ativos, fazer testes a campo utilizando esses compostos em iscas atrativas. A obtenção do feromônio será importante para o manejo e controle dessa praga, que possui um ciclo biológico de aproximadamente 30 dias, fazendo com que possa haver 12 gerações por ano, o que indica um grande potencial de dano da praga.

Os resultados obtidos com as OBPs deverão contribuir para construção de um método de controle mais seletivo e eficiente, o que poderá proporcionar uma redução drástica do uso de inseticidas para o controle dessa praga. Novas moléculas deverão ser testadas como ligantes para a GOPB1.

As acetogeninas, de forma geral, são muito ativas e já existem formulações comerciais para o seu uso, inclusive na agricultura orgânica. A acetogenina **ANCR-2** (BRAC), estudada neste trabalho poderá se tornar um produto para o controle das larvas do mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). Essa molécula precisa ter a sua estrutura confirmada.