

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

CAMILA PEREIRA DE LIMA CHICUTA

ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA LECTINA DAS
SEMENTES DE *Crotalaria stipularia* (DESV., 1814) (FARBALES: FABACEAE) E
SUA AVALIAÇÃO INSETICIDA CONTRA *Cerconota anonella* (SEPP., 1830)
(LEPIDOPTERA: OECOPHORIDAE)

Maceió

2025

CAMILA PEREIRA DE LIMA CHICUTA

ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA LECTINA DAS
SEMENTES DE *Crotalaria stipularia* (DESV., 1814) (FARBALES: FABACEAE) E
SUA AVALIAÇÃO INSETICIDA CONTRA *Cerconota anonella* (SEPP., 1830)
(LEPIDOPTERA: OECOPHORIDAE)

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

Orientador: Prof. Dr. Francis Soares Gomes

Maceió

2025

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

Bibliotecária: Girlaine da Silva Santos – CRB-4 – 1127

C533i Chicuta, Camila Pereira de Lima.

Isolamento, purificação e caracterização de uma lectina das sementes de *crotalaria stipularia* (desv., 1814) (farbales: fabaceae) e sua avaliação inseticida contra *cerconota anonella* (sepp., 1830) (lepidoptera: oecophoridae) / Camila Pereira de Lima Chicuta. – 2025.

102 f.: il.

Orientador: Francis Soares Gomes.

Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2025.

Bibliografia: f. 82- 101.

Apêndices: f. 101-102.

1. Praga - controle. 2. Bioinseticida. 3. Hemaglutinação. 4. *cerconota anonella*. 5. *Lepidoptera*. 6. *Crotalaria stipularia*. I. Título.

CDU: 54: 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@iqb.ufal.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese da Doutoranda Camila Pereira de Lima Chicuta intitulada: **“ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA LECTINA DAS SEMENTES DE *Crotalaria stipularia* (DESV., 1814) (FARBALES: FABACEAE) E SUA AVALIAÇÃO INSETICIDA CONTRA *Cerconota anonella* (SEPP., 1830) (LEPIDOPTERA: OECOPHORIDAE)”**, apresentada, em sessão aberta, ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 24 de fevereiro de 2025, às 9h, por meio de *videoconferência*.

Maceió, 24 de fevereiro de 2025.

Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
gov.br FRANCIS SOARES GOMES
Data: 27/02/2025 11:10:15-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Francis Soares Gomes
Orientador – (PPGQB/ UFAL)

Documento assinado digitalmente
gov.br FABIANE CAXICO DE ABREU GALDINO
Data: 26/02/2025 16:55:34-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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

Documento assinado digitalmente
gov.br RUTH RUFINO DO NASCIMENTO
Data: 26/02/2025 15:22:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Ruth Rufino do Nascimento
(PPGQB/UFAL)

Documento assinado digitalmente
gov.br JOHNNATAN DUARTE DE FREITAS
Data: 24/02/2025 11:51:31-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Johnnatan Duarte de Freitas
(IFAL)

Documento assinado digitalmente
gov.br ADRIANA DE LIMA MENDONÇA
Data: 24/02/2025 13:20:55-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Adriana Lima Mendonça
(UNIT/AL)

Aos meus pais, Cláudia e Silvestre e ao meu
esposo Wellington pelo amor e incentivo.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ser meu guia, por me sustentar e por ter colocado pessoas em meu caminho, com as quais dividi tristezas, alegrias e aprendi a ser melhor.

À minha mãe, Cláudia Pereira de Lima Chicuta, pelo amor incondicional dedicado a mim e a nossa família.

Ao meu pai Silvestre Alves Chicuta, por ser meu exemplo, de pessoa trabalhadora, correta, que sempre se sacrificou por nossa família, para honrar seus compromissos.

Ao meu esposo, Wellington Gomes dos Santos, pelo incentivo, amor e carinho dedicados à nossa família.

Aos meus avós, Roselita Pereira de Lima e José Gomes de Lima (*in memorie*), pelo amor e carinho dedicados não só a mim, mas a todos os netos e bisnetos, sem eles tudo seria mais difícil.

À minha sobrinha, Mariana Santos Chicuta, por espalhar alegria e leveza aos meus dias.

À minha tia e prima, Cléa Pereira de Lima e Larissa Pereira de Lima, pelos bons momentos que passamos juntas.

Ao meu orientador, Professor Dr. Francis Soares Gomes, que desde o mestrado me orienta com dedicação, sendo sempre muito atencioso e educado, não só comigo, mas com todos a sua volta.

À Professora Ruth Rufino do Nascimento, por ser minha orientadora na graduação e pelo exemplo de mulher pesquisadora que dedicou e ainda dedica sua vida a pesquisa, você me inspira.

Ao Joubert pela ajuda com as coletas de insetos e pelos momentos de descontração, sem você esse trabalho não teria sido possível.

Aos professores parceiros do Laboratório de Bioquímica e Biotecnologia de Proteínas, professora Edma Miranda e Hugo Juarez, pela convivência amigável e pelos ensinamentos.

À Marta Ângelo, pelo apoio e carinho que teve comigo durante a realização deste trabalho, muitos dos experimentos só foram possíveis graças a você, obrigada.

À Jeanny Christine, pela ajuda em etapas deste trabalho, serei eternamente grata a você e a Orlando do IFAL, obrigada.

À Janaína Kívia, parceira da época do mestrado, pela amizade, e mesmo de longe me inspirou na realização deste trabalho.

À Andréa Carla, pela amizade, pelo incentivo que me fez dar início ao doutorado, pela ajuda na realização das etapas deste trabalho, e sobretudo pelo crescimento que pude obter pela convivência com você, obrigada por tudo.

Aos amigos, Cláudio William, Cledson Barros e Josiel por serem pessoas tão prestativas, ensinando sempre a todos os alunos novos do laboratório como se deve, com paciência e cordialidade, vocês me ensinaram muito, sobretudo a ser uma pessoa melhor.

A todos do Laboratório de Fisiologia de Insetos, Professor Luciano Aparecido Meirelles Grillo, por abrir as portas do laboratório onde foi realizado grande parte deste trabalho.

Aos meus amigos, Anyelly Gomes, Cristiane Canuto, Everton Lopes, Fernanda Regina, Monique Lira, Regivaldo Melo, Thaynara Cecília, pela amizade sincera e pelos momentos únicos de muita risada.

A todos do Laboratório de Bioquímica e Biotecnologia de Proteínas, Monizy, Stella, Marta, Rose, pela convivência.

Aos colegas do laboratório de Ecologia Química, Luana Lima Ferreira, Nathaly Costa Aquino, Raphael de Farias Tavares, Andreza Heloiza, Claudinete da Silva, Jéssica de Lima, Rafael Tavares, Rita de Cássia e Maxdouglass, com os quais convivi na graduação e aprendi muito.

À Universidade Federal de Alagoas, onde vivi os melhores e mais difíceis momentos da minha vida, por ser um espaço público e democrático, onde pude desenvolver meu pensamento crítico, científico, político e social.

Ao Instituto de Química e Biotecnologia e ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, pela oportunidade de realização do mestrado e doutorado.

À FAPEAL e a Capes pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

À toda minha família, pelo exemplo de pessoas honestas que lutam para conseguirem seus objetivos.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente, contribuíram para a minha contínua formação não só profissional, mas principalmente pessoal.

“É necessário sempre acreditar que o sonho é possível
Que o céu é o limite e você, truta, é imbatível
Que o tempo ruim vai passar, é só uma fase
Que o sofrimento alimenta mais a sua coragem
Que a sua família precisa de você
Lado a lado se ganhar, pra te apoiar se perder...”

Trecho de “A Vida é Desafio”, Canção de Racionais MC's

RESUMO

A broca do fruto, *Cerconota anonella* (Sepp., 1830) (Lepidoptera:Oecophoridae), é uma importante praga dos cultivos de pinha e graviola, que causa danos expressivos a essas culturas. Para controlar esta praga, utiliza-se, principalmente, agrotóxicos. Entretanto, a resistência adquirida por insetos e a elevada toxicidade desses compostos sobre o ambiente e organismos não-alvos têm levado a um aumento na busca por produtos naturais isentos de toxicidade e efetivos no controle de insetos praga. Extratos e lectinas (proteínas ou glicoproteínas que reconhecem carboidratos e aglutinam células) isoladas de plantas têm apresentado atividade inseticida e, por esse motivo, têm sido bastante estudados. Dentre elas, *Crotalaria stipularia*, pertencente à família Fabaceae, apresenta ampla distribuição em ambientes de Mata Atlântica sendo importante na alimentação bovina. Assim, o presente estudo objetivou isolar, purificar e caracterizar a lectina das sementes de *Crotalaria stipularia* e avaliar a atividade inseticida dessa proteína no extrato e na fração concentrada de proteínas das sementes contra os insetos adultos de *Cerconota anonella*. Para tanto, foi preparado o extrato bruto em Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 das sementes da planta, seguido de precipitação salina com sulfato de amônio e eletroforese SDS-PAGE. Posteriormente, extrato e fração foram quantificados pelo método de Bradford e avaliados quanto sua atividade hemaglutinante. A fração de maior atividade hemaglutinante foi então submetida a uma cromatografia de afinidade em matriz de quitina. Em seguida, foram preparadas soluções de diferentes concentrações para o extrato (90, 45, 30 µg de proteína/mL de dieta), para a fração (30, 15, 10 µg de proteína/mL de dieta) e para lectina (10, 5, 3 µg de proteína/mL de dieta). Então, extrato, fração e lectina foram avaliados quanto à atividade inseticida, deterência alimentar, parâmetros nutricionais e quanto aos efeitos do extrato, fração e lectina no perfil bioquímico apresentado pelos insetos ao fim dos 7 dias de ensaio. Além disso, os metabólitos secundários presentes no extrato foram determinados qualitativamente através da análise de composição fenólica e por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). O extrato também foi submetido a uma avaliação ecotoxicológica frente a *Lactuca sativa*. A lectina de *C. stipularia* foi isolada e visualizada sua pureza em gel de eletroforese (SDS-PAGE). Apresentou-se termicamente estável, mantendo a AH até 50°C e mantendo 50% de sua AH até 100 °C; manteve sua AH frente a valores de pH ácidos a neutro e não variou sua AH mediante a EDTA e íons divalentes (cátions Mn^{2+} e Ca^{2+}). A análise fitoquímica mostrou que o teor de fenóis no extrato aquoso das sementes secas de *C. stipularia* foi de 7,05 µg EAG/g da amostra bruta, enquanto que através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi possível identificar o composto ácido clorogênico (2,8642 mg/kg) e o siringaldeído (0,2763 mg/kg). A análise de ecotoxicidade do extrato frente a *L.sativa* (alfaca) mostrou ausência de toxicidade. Os resultados com os bioensaios mostram que todos os tratamentos (extrato, fração e lectina das sementes de *C. stipularia*) possuem atividade inseticida contra *C. anonella* e ambos afetaram nos parâmetros nutricionais (taxa relativa de ganho de biomassa, taxa de consumo relativo e eficiência de conversão do alimento ingerido) dos insetos testados e equivalentemente, as taxas de proteínas, glicose, colesterol e triglicerídeos também foram alteradas, revelando que os tratamentos (tanto, extrato, fração e lectina) interferiram no metabolismo dos insetos. Desta forma, sementes de *C. stipularia* são um biomaterial com potencial para ser utilizado no controle de *Cerconota anonella*.

Palavras-chaves: controle de praga, hemaglutinação, bioinseticida.

ABSTRACT

The fruit borer, *Cerconota anonella* (Sepp., 1830) (Lepidoptera: Oecophoridae), is an important pest of sugar apple and graviola crops, causing significant damage to these crops. To control this pest, pesticides are used mainly. However, the resistance acquired by insects and the high toxicity of these compounds on the environment and non-target organisms led to an increase in the search for natural products free of toxicity and effective in controlling insect pests. Extracts and lectins (proteins or glycoproteins that recognize carbohydrates and agglutinate cells) from plants have shown insecticidal activity and, for this reason, have been extensively studied. Among them, *Crotalaria stipularia*, belonging to the Fabaceae family, is widely distributed in Atlantic Forest environments and is important in cattle feeding. Thus, the present study aimed to isolate, purify and characterize the lectin from *Crotalaria stipularia* seeds and to evaluate the insecticidal activity of this extract protein and the seed protein protein against adults of *Cerconota anonella*. For this purpose, the crude extract of the plant seeds was prepared in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, followed by saline precipitation with ammonium sulfate and SDS-PAGE electrophoresis. Subsequently, extract, collection and were quantified by the Bradford method and evaluated for their hemagglutinating activity. The fraction with the highest hemagglutinating activity was then maintained for affinity chromatography on a chitin matrix. Then, solutions of different concentrations were prepared for the extract (90, 45, 30 µg of protein/mL of diet), for absorption (30, 15, 10 µg of protein/mL of diet) and for lectin (10, 5, 3 µg of protein/ml of diet). Then, the insecticidal activity of the extract, extraction and lectin, the food deterrence, the nutritional parameters of the treated insects, and the effects of the extract, extraction and lectin on the biochemical profile presented by the insects at the end of the 7 days of trial were evaluated. In addition, the secondary metabolites presented in the extract were qualitatively determined through phenolic composition analysis and High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The extract was also submitted to an ecotoxicological evaluation against *Lactuca sativa*. The lectin of *C. stipularia* was isolated and its purity visualized in gel electrophoresis (SDS-PAGE). It was presented thermally maintaining the HA at 50°C and maintaining up to 50% of its HA up to 100 °C, it maintained its HA in the face of pHs susceptible to neutral and did not vary its HA by EDTA and divalent ions (Mn^{2+} and Ca^{2+} cations). The phytochemical analysis showed that the phenolic content in the aqueous extract of dry seeds of *C. stipularia* was 7.05 µg EAG/g of the crude sample, while through high performance liquid chromatography (HPLC) it was possible to identify the compound chlorogenic acid (2,8642 mg/kg) and syringaldehyde (0,2763 mg/kg). The extract was also submitted to an ecotoxicity analysis against *L.sativa* (lettuce) where its non-toxicity was proven. The results with the bioassays show that all treatments (extract, rotation and lectin from the seeds of *C. stipularia*) present insecticidal activity against *C. anonella* and both affected in the nutritional parameters (relative rate of biomass gain, relative consumption rate and efficiency of conversion of the ingested food) of the insects tested and equivalent, the rates of proteins, glucose, cholesterol and triglycerides were also transformed, revealing that the treatments (both, extract, and lectin) are in the metabolism of the insects. Thus, *C. stipularia* seeds are a biomaterial with potential to be used in the control of *Cerconota anonella*

Keywords: pest control, hemagglutination, bioinsecticide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Maiores Produtores de Frutas do Mundo	19
Figura 2 – (a) Graviola; (b) pinha e (c) fruta-da-condessa	20
Figura 3 – (A) Danos causados à graviola pela broca dos frutos (B) Fezes depositadas pela praga	21
Figura 4 – (A) Insetos adultos de <i>C. anonella</i> e (B) Inseto no período larval, denominado lagarta.	22
Figura 5 – Controle cultural através do ensacamento dos frutos	23
Figura 6 – Esquema representando a aglutinação de eritrócitos promovida por lectinas. (A) Rede de aglutinação formada pela ligação de uma lectina aos carboidratos da superfície dos eritrócitos, e vista a olho nu no teste na placa de hemaglutinação (C). (B) Inibição da formação da rede de aglutinação por carboidratos livres e visto a olho nu pela precipitação dos eritrócitos na placa de hemaglutinação (D)	27
Figura 7 – Representação das principais estruturas e moléculas como possíveis alvos para a ligação de lectina em insetos.	31
Figura 8 – <i>Crotalaria stipularia</i>	38
Figura 9 – Distribuição da <i>C. stipularia</i> no território brasileiro	38
Figura 10 – Sementes secas de <i>C. stipularia</i> sendo retiradas de parte da planta.	40
Figura 11 – Coleta de frutos de <i>Annona muricata</i> (graviola) infestados por <i>Cerconota anonella</i> .	41
Figura 12 – Esquema demonstrativo do armazenamento dos frutos de graviola coletados no campo para posteriormente adquirir os insetos adultos de <i>Cerconota anonella</i> .	41
Figura 13 – Semente secas de <i>C. stipularia</i>	41
Figura 14 – Placa de microtitulação	43
Figura 15 – Mostra do teste de atividade hemaglutinante	43
Figura 16 – Cromatografia líquida em coluna de quitina	46
Figura 17 – Gráfico de cromatografia de afinidade com coluna de quitina	54
Figura 18 – Gel de eletroforese SDS-PAGE 10%.	56
Figura 19 – Efeito da temperatura na AH	57
Figura 20 – Efeito do pH na AH	58

Figura 21 – Efeito de íons na AH	58
Figura 22 – Curva com a mistura de padrões: 1-ácido gálico, 2- catecol, 3- catequina, 4- ácido clorogênico, 5- ácido cafeico, 6-catequina, 7- Siringaldeído, 8- Ácido cumárico, 9- Cumarina, 10- Rutina, 11- Miricetina, 12- Quercetina (A). Curva com os compostos identificados: 4- ácido clorogênico e 7- Siringaldeído.	62
Figura 23 – Média do crescimento da raiz (A) média do crescimento da parte aérea (B) e média da germinação (C) de <i>L. sativa</i> exposta a diferentes concentrações de extrato aquoso das sementes de <i>C. stipularia</i> .	64
Figura 24 – Sobrevivência dos insetos adultos de <i>C. anonella</i> tratados com diferentes concentrações de extrato das sementes de <i>C. stipularia</i> expressos pela curva de Kaplan-Meier.	65
Figura 25 – Índice de deterência dos insetos adultos de <i>C. anonella</i> tratados com diferentes concentrações de extrato das sementes de <i>C. stipularia</i>	66
Figura 26 – Taxa de consumo relativo (A), taxa de crescimento relativo (B) e eficiência em conversão do alimento ingerido (C) dos insetos adultos de <i>C. anonella</i> tratados com diferentes concentrações de extrato das sementes de <i>C. stipularia</i> .	68
Figura 27 – Perfil bioquímico do abdômen de adultos de <i>C. anonella</i> mantidos em dietas artificiais preparadas em Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (controle) ou com extrato sementes de <i>C. stipularia</i> em diferentes concentrações. (A) Proteínas totais em mg/mL; (B) glicose em mg/ mg de proteína (C) colesterol em mg/mg de proteína; (D) triglicerídeos em mg/ mg de proteína.	69
Figura 28 – Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de adultos de <i>C. anonella</i> mantidas em dieta artificial com diferentes doses da fração proteica (0-20%) das sementes de <i>C. stipularia</i> .	71
Figura 29 – Índice de deterência dos insetos adultos de <i>C. anonella</i> tratados com diferentes concentrações da fração 0-20% das sementes de <i>C. stipularia</i>	72
Figura 30 – Parâmetros nutricionais dos insetos adultos de <i>C. anonella</i> tratados com a fração 0-20% de <i>C. stipularia</i> . Taxa de consumo relativo (A), taxa de crescimento relativo (B) e eficiência em conversão do alimento ingerido (C).	73
Figura 31 – Perfil bioquímico do abdômen de adultos de <i>C. anonella</i> mantidos em dietas artificiais preparadas em Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (controle) ou com	

a fração 0-20% das sementes de <i>C. stipularia</i> em diferentes concentrações. (A) Proteínas totais em mg/mL; (B) glicose em mg/ mg de proteína (C) colesterol em mg/mg de proteína; (D) triglicerídeos em mg/ mg de proteína.	74
Figura 32 – Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de adultos de <i>C. anonella</i> mantidas em dieta artificial com diferentes doses da lectina das sementes de <i>C. stipularia</i> .	75
Figura 33 – Índice de deterência dos insetos adultos de <i>C. anonella</i> tratados com diferentes concentrações da lectina das sementes de <i>C. stipularia</i>	76
Figura 34 – Parâmetros nutricionais dos insetos adultos de <i>C. anonella</i> tratados com a lectina de <i>C. stipularia</i> . Taxa de consumo relativo (A), taxa de crescimento relativo (B) e eficiência em conversão do alimento ingerido (C).	77
Figura 35 – Perfil bioquímico do abdômen de adultos de <i>C. anonella</i> mantidos em dietas artificiais preparadas em Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (controle) ou a lectina das sementes de <i>C. stipularia</i> em diferentes concentrações. (A) Proteínas totais em mg/mL; (B) glicose em mg/ mg de proteína (C) colesterol em mg/mg de proteína; (D) triglicerídeos em mg/ mg de proteína.	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lectinas de origem vegetal e seus mecanismos de ação, em alguns insetos.	30
Tabela 2 – Levantamento dos Municípios que aderiram à distribuição da Crotalaria como forma de controle do Aedes até março de 2016	36
Tabela 3 – Precipitação salina	44
Tabela 4 – Tratamentos testados nos bioensaios	50
Tabela 5 – Fracionamento Salino do Extrato, Quantificação Proteica e Atividade Hemaglutinante	52
Tabela 6 – Teste de inibição com carboidratos	53
Tabela 7 - Purificação da proteína das sementes de <i>C. stipularia</i>	55
Tabela 8 – Padrões utilizados na análise	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH – Atividade hemaglutinante

AHE – Atividade hemaglutinante específica

FAO – Organizações das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

IMA – Instituto do Meio Ambiente

LAMP – Laboratório de Metabolômica e Proteômica

LEQ – Laboratório de Ecologia Química

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Min- Minuto

MIP – Manejo integrado de pragas

mL - Mililitro

pH – Potencial hidrogeniônico

SDS-PAGE – gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecil- sulfato de sódio (SDS)

UFAL – Universidade Federal de Alagoas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 A Fruticultura Brasileira.....	19
2.1.1 Cultura das anonáceas.....	20
2.2 <i>Cerconota anonella</i>	21
2.2.1 Métodos de controle da broca-do-fruto das anonáceas e manejo integrado de pragas (MIP).....	22
2.3 Potencial Inseticida de Extratos de Plantas.....	24
2.4 Compostos com Atividade Inseticida.....	25
2.4.1 Metabólitos secundários.....	25
2.4.2 Metabólitos primários – proteínas de plantas.....	26
2.4.2.1 Lectinas: isolamento, purificação e funções biológicas.....	27
2.4.2.1.1 Atividade inseticida de lectinas e mecanismos de ação.....	29
2.5 <i>Crotalaria stipularia</i>.....	36
3. OBJETIVO.....	39
3.1 Objetivo Geral.....	39
3.2 Objetivos Específicos.....	39
4. METODOLOGIA.....	40
4.1 Material Biológico.....	40
4.1.1 Identificação da espécie de planta e obtenção das sementes de <i>C.</i> <i>stipularia</i>	40
4.1.2 Insetos de <i>Cerconota anonella</i>	40
4.2 Experimentos para a Purificação e Caracterização da Lectina das Sementes Secas de <i>Crotalaria stipularia</i>.....	42
4.2.1 Preparo do extrato bruto das sementes de <i>Crotalaria stipularia</i>	42
4.2.2 Atividade hemaglutinante.....	42
4.2.3 Determinação da concentração de proteínas.....	43
4.2.4 Teste de inibição a carboidratos.....	44
4.2.5 Precipitação com sulfato de amônio (NH ₄) ₂ SO ₄ a partir do extrato da <i>C. stipularia</i>	44
4.2.6 Cromatografia por afinidade.....	45
4.2.7 Eletroforese SDS-PAGE.....	46

4.2.8 Avaliação do efeito da temperatura e do pH na AH.....	46
4.2.9 Avaliação do efeito do EDTA e de íons divalentes sobre AH.....	47
4.3 Análises Fitoquímicas Feitas a partir do Extrato das Sementes Secas de <i>C. stipularia</i>.....	47
4.3.1 Determinação do conteúdo fenólico total.....	47
4.3.2 Perfil fitoquímico por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)..	48
4.4 Ensaio de Ecotoxicidade Frente a <i>Lactuca salitva</i>.....	49
4.5 Bioensaios.....	49
4.6 Aspectos Nutricionais.....	50
4.7 Efeitos de <i>C. stipularia</i> Sobre o Perfil Bioquímico de <i>C. anonella</i>.....	50
4.8 Análises Estatísticas.....	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	52
5.1 Extração e Fracionamento Salino das Sementes de <i>C. Stipularia</i>	52
5.2 Teste de Inibição a Carboidratos e Glicoproteína com Extrato das Sementes de <i>C. Stipularia</i>	53
5.3 Purificação da Lectina das Sementes de <i>C. stipularia</i>	54
5.4 Eletroforese SDS-PAGE.....	55
5.5 Efeito da Temperatura na AH em Amostras da Lectina de <i>C. stipularia</i>	56
5.6 Efeito do pH na AH em Amostras da Lectina de <i>C. stipularia</i>	57
5.7 Efeito do EDTA e Íons Divalentes na AH.....	58
5.8 Resultados das Análises Fitoquímicas Feitas a partir do Extrato das Sementes Secas de <i>C. stipularia</i>	59
5.8.1 Conteúdo fenólico total.....	59
5.8.2 Perfil fitoquímico obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	60
5.9 Resultado da Avaliação de Toxicidade Frente a <i>L. sativa</i>	63
5.10 Resultados dos Bioensaios com o Extrato das Sementes de <i>C. stipularia</i>	65
5.11 Resultados dos Bioensaios com a Fração 20% das sementes de <i>C. stipularia</i> sobre os insetos adultos de <i>C. anonella</i>	71
5.12 Resultados dos Bioensaios com a lectina das sementes de <i>C. stipularia</i> sobre os insetos adultos de <i>C. anonella</i>	75

6. CONCLUSÕES.....	81
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	83
REFERÊNCIAS.....	84
APÊNDICE.....	103

1. INTRODUÇÃO

A broca do fruto das anonáceas, *Cerconota anonella* Sepp. 1830 (Lepidoptera: Oecophoridae), pode ser encontrada em diversos países da América Latina. No Brasil, encontra-se bastante disseminada, ocorrendo em todas as regiões brasileiras e atacando principalmente frutos de pinha (*Annona squamosa*) e graviola (*Annona muricata*), frutos os quais tem maior produção nos estados da Bahia e Alagoas. Quando atacados por este inseto, os frutos apresentam apodrecimento da polpa e, a parte atacada torna-se endurecida e enegrecida, reduzindo seu valor comercial, ou mesmo, tornando-os impróprios para a comercialização ou para o processamento industrial. Além de depreciar a qualidade do fruto, a praga *C. anonella* facilita a entrada de vários organismos oportunistas no interior do fruto, além de afetar as flores e os botões florais impedindo assim, a reprodução dos frutos (BRAGA-SOBRINHO, 2010).

Para controlar a ação de *C. anonella*, sobre as espécies de *Annona*, vários métodos vem sendo empregados, tais como: o ensacamento dos frutos, o uso de armadilhas luminosas e a aplicação de diferentes inseticidas (mesmo não havendo registros de agrotóxicos para a cultura) (BITTENCOURT; SOBRINHO; PEREIRA, 2007; LEMOS, 2014). Esses métodos, entretanto, demandam custos com mão de obra e são pouco eficientes no controle da *C. anonella*, fazendo-se necessário a utilização de alternativas que minimizem os efeitos adversos. Além disso, o uso indiscriminado de pesticidas tem originado o desaparecimento de algumas espécies de insetos úteis, aparecimento de novas pragas e a seleção de indivíduos resistentes assim como diversas doenças em humanos estarem sendo associadas ao contato com agrotóxicos (FLORES et al., 2004).

Visto a necessidade de se investigar outros métodos de controle para serem utilizados no manejo dessa praga, uma variedade de compostos vegetais, dentre eles metabólitos secundários e primários, estão sendo descobertos possuindo os seguintes efeitos: repelente, inibidor de alimentação, regulador de crescimento e atividade ovicida/larvicida (MACEDO et al., 2007; COELHO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011). Dentro do metabolismo primário das plantas as lectinas, proteínas ou glicoproteínas que se ligam a carboidratos, tem sido bastante descritas como tendo um papel fisiológico importante na defesa contra microorganismos e insetos (NAPOLEÃO et al., 2011; CAMAROTI et al., 2017; PROCÓPIO et al., 2017). Essas lectinas de plantas apresentaram efeito entomotóxico em insetos de diversas ordens, causando perturbações nutricionais, acarretando no atraso no desenvolvimento das larvas, bem como redução do

peso e sobrevivência dos adultos emergentes (COELHO et al., 2007; MACEDO et al., 2007; PROCÓPIO et al., 2015; AGRA-NETO et al. 2014; NAPOLEÃO et al., 2013; LIMA et al, 2020).

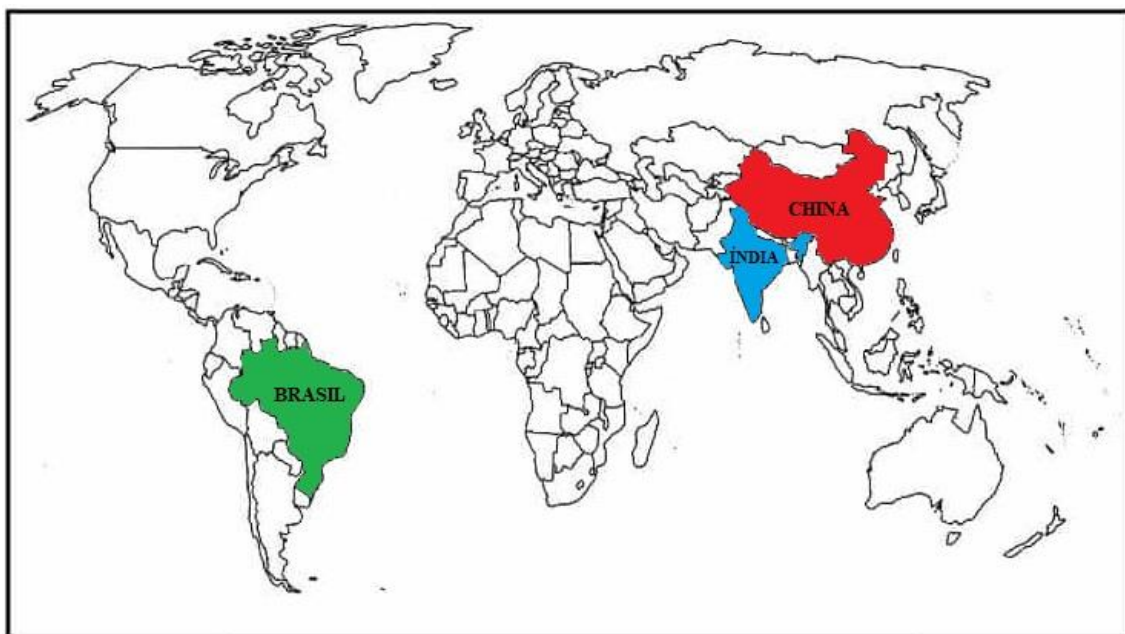
A planta a ser investigada neste trabalho é a *Crotalaria stipularia* (Desv. 1814) (Farbales: Fabaceae). Ela é uma espécie de planta amplamente distribuída na mata Atlântica brasileira. Para diferentes espécies do gênero *Crotalaria*, diversos são os usos citados, porém pouco se sabe sobre a constituição dos metabólitos primários e secundários e atividades biológicas da espécie *C. stipularia*, assim a presente investigação objetiva, de maneira geral, isolar, purificar e caracterizar a lectina das sementes de *C. stipularia* e avaliar a atividade inseticida dessa proteína do extrato e da fração concentrada de proteínas das sementes em insetos adultos de *C. anonella*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Fruticultura Brasileira

Dentro de um país a fruticultura desempenha um papel socioeconômico importante, pois contribui com utilização de grande mão de obra, ou seja, gera empregos, geração de agroindústrias e diminuição da quantidade de importações (FACHINELLO et al., 2008; AQUINO, 2019). O Brasil se destaca neste setor graças a diversidade climática, de solos e condições ecológicas que favorecem a variedade de culturas produzidas o colocando junto com a China e a Índia, como maiores produtores de frutas do mundo. (TREICHEL et al., 2016; KIST et al., 2022).

Figura 1 – Maiores Produtores de Frutas do Mundo



Fonte: autor, 2023. Adaptado de Mapa do Brasil Preto e Branco, 2023.

Em 2020, foram produzidas no Brasil 41.293 milhões de toneladas de frutas, o que gerou uma receita de 49,8 bilhões de reais. As regiões brasileiras com as maiores produções são respectivamente, a saber: Sudeste, Nordeste, Sul, Norte e Centro-Oeste. (KIST et al., 2022).

Desde o início da pandemia do coronavírus, em 2020, as frutas estão entre os alimentos saudáveis que os consumidores mais valorizaram. O aumento da demanda é positivo para a fruticultura brasileira que continua registrando produções e exportações expressivas. O sabor exótico e a qualidade das frutas são características fundamentais para a conquista do paladar estrangeiro e essa conquista vem se confirmando pelos

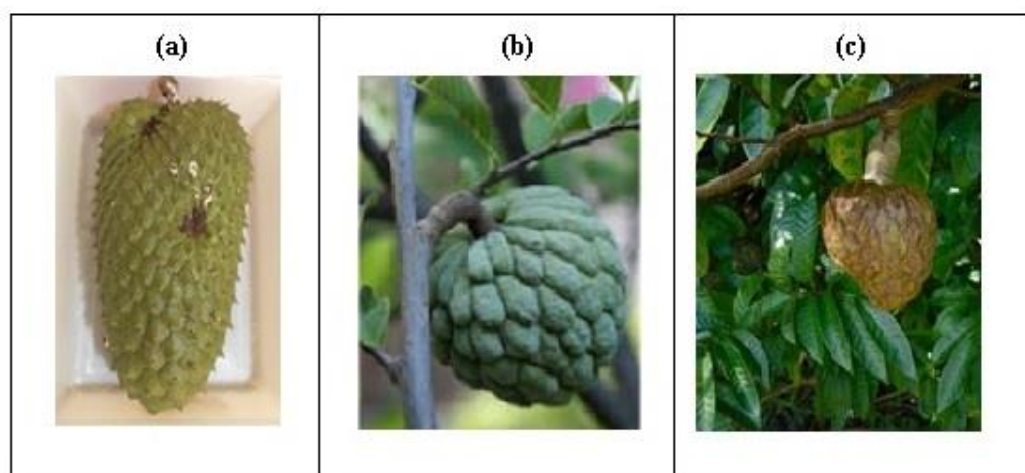
números mais recentes que divulgam que a fruticultura brasileira conseguiu lucrar com exportação mais de US\$ 1 bilhão em 2021 e produzir o terceiro maior volume do mundo. O País exportou 1,217 milhão de toneladas de frutas em 2021, com 18% de aumento em relação ao ano anterior (KIST et al., 2022).

2.1.1. A cultura das anonáceas

A família Annonaceae, também descrita como anonácea, é composta aproximadamente de 120 gêneros e possui cerca de 2.300 espécies, as quais estão classificadas em quatro subfamílias: Ambavioideae, Anaxagoreoideae, Annonoideae e Malmeoideae. No Brasil, estão representadas todas as subfamílias da atual classificação, onde ocorrem 386 espécies, distribuídas em 29 gêneros (MAAS et al., 2015).

Dos 120 gêneros descritos 3 recebem destaque, já que são os únicos com plantas frutíferas, são eles: *Rollinia* sp, *Albernonoa* sp e *Annona* sp. No gênero *Rollinia*, as principais espécies cultivadas são: *Rollinia silvatica* (araticum-do-mato) (A.St.-Hil.), *Rollinia mucosa* (biribá) (Jacq.) e *Rollinia exalbida* (araticum ou quaresma) (Vell.). No gênero *Albernonoa* tem-se: *Albernonoa purpuracea* (marolo), *Albernonoa lanceolata* (pindaíba) (Manica, 1994) e no gênero *Annona*, as principais espécies cultivadas nas regiões tropicais são: *Annona muricata* (graviola) L., *Annona squamosa* (pinha) L., e *Annona reticulata* (fruta-da-condessa) L. No Brasil, apenas as espécies do gênero *Annona* são cultivadas comercialmente, sendo as mais importantes a graviola (Figura 2a), para indústria de suco e polpa, a pinha (Figura 2b) e a fruta-da-condessa (Figura 2c), para consumo in natura (MOSCA et al., 2006).

Figura 2- (a) Graviola; (b) pinha e (c) fruta-da-condessa



A demanda por pinha e graviola surgir a partir de 1980, onde somente alguns estados do Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará e Pernambuco) e Sudeste (São Paulo) possuíam uma significativa produção de pinha. Somente na década seguinte, a graviola despontou nos mesmos estados nordestinos como uma alternativa interessante para a agroindústria de polpas congeladas e de outros produtos industrializados. Seu cultivo expandiu-se então para outras regiões do Brasil e passou a ser uma opção promissora para pequenos produtores. No entanto os dois frutos sofrem ataques de diversas pragas de difícil controle, dentre elas destacam-se: podridão-de-raízes, cancro depressivo, antracnose, podridão-seca-dos-frutos, entre outras. As broca-do-tronco (*Cratosomos bombina* (Fabr.) (Coleoptera: curculionidae)), broca-do-coleto (*Hellipus catagraphus* (Coleoptera:Curculionidae)), broca-da-semente (*Bephratelloides pomorum* (Hymenoptera: Eurytomidae)) e a broca-do-fruto (*Cerconota anonella* (Sepp, 1830) (Lepidoptera, Oecophoridae)) são as pragas que causam maiores danos à cultura de pinha e graviola (SOBRINHO et al., 2011) (LEMOS, 2014).

2.2 *Cerconota anonella*

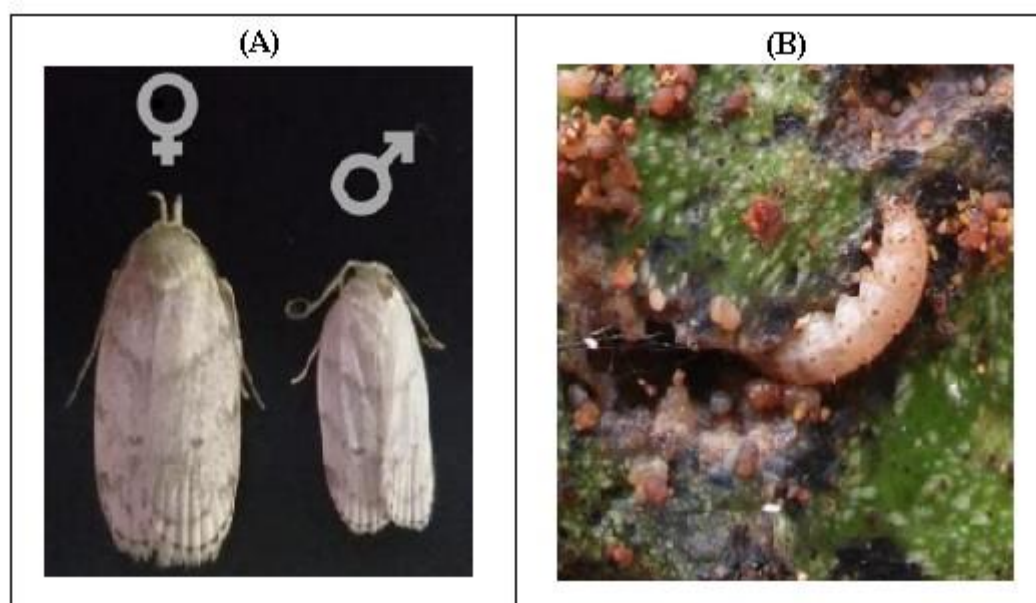
Vulgarmente conhecida como a broca-do-fruto, *Cerconota anonella*, é considerada uma das pragas mais importantes da cultura de anonáceas, devido aos danos causados ao fruto (Figura 3), danificando a polpa, e consequentemente, inviabilizando seu comércio ou reduzindo o seu valor comercial para o consumo *in natura* ou para o processamento industrial (SOBRINHO, et al. 1998).

Figura 3 – (A) Danos causados à graviola pela broca dos frutos (B) Fezes depositadas pela praga



O adulto de *C. anonella* é uma mariposa (possui hábitos noturnos), que mede aproximadamente 25 mm de envergadura alar e 10 mm de comprimento quando fêmea. Os machos são relativamente menores, com 20 mm de envergadura e 8 mm de comprimento (Figura 4A). As asas apresentam coloração branco acinzentado cintilante, com listras assimétricas e curvas pratas e marrons. Os ovos possuem uma variação de cor do esverdeado a amarelado, que podem ser postos sobre os frutos e flores em diferentes estágios. A larva (Figura 4B) pode chegar a medir 22mm de comprimento no último instar e sua coloração varia do branco rosado ao marrom (GALLO et al., 2002; BITTENCOURT, et al. 2007; BOTTON et al., 2011).

Figura 4 – (A) Insetos adultos de *C. anonella* e (B) Inseto no período larval, denominado lagarta.



Fonte: Autor, 2023. Adaptado de Tavares , 2021.

2.2.1 Métodos de controle da broca-do-fruto das anonáceas e manejo integrado de pragas (MIP)

Diante dos danos causados pela broca-do-fruto, as culturas de pinha e graviola enfrentam dificuldades no controle da praga, sendo assim, torna-se necessária a busca por novos resultados de pesquisas, além de experiências de sucesso em pomares comerciais. Com o objetivo de controlar a ação de *C. anonella*, três métodos de controle podem ser empregados, a saber: controle cultural, controle biológico e controle químico (FREITAS et al., 2013; TAVARES, 2021).

Uma das táticas de controle cultural consiste na remoção dos frutos atacados pela broca-do-fruto com posterior enterrio dos mesmos. O ensacamento (Figura 5), também protege os frutos do ataque da broca-do-fruto assim como utilizado no controle da broca-da-sementes. (BROGLIO-MICHELETTI, et al., 2001; LEITE et al., 2012; PEREIRA et al., 2009) Brito et al. 2011 relataram que a tática de ensacamento resultou em frutos de graviola com melhor qualidade, menos injúrias, indicando possibilidade de retorno financeiro aos produtores (GALDINO; RAGA, 2019). A utilização do ensacamento é uma técnica bastante antiga, mas com o surgimento dos inseticidas e o custo elevado da técnica de proteger os frutos com os invólucros devido à mão de obra, fez com que o produtor substituísse a prática do ensacamento pelo uso dos agrotóxicos (SILVA, 2013).

Figura 5 – Controle cultural através do ensacamento dos frutos



Fonte: Galdino; Raga, 2019.

Já o controle biológico é um processo natural que constitui o controle de populações da praga com o uso de inimigos naturais. No estado de Alagoas, foram registrados alguns himenópteros atuando como parasitoides de *C. anonella*, a saber: *Apanteles* sp. e *Rhysipolis* sp. (Hymenoptera: Braconidae) e *Xiphosomella* sp. (Hymenoptera: Ichneumonidae) (MICHELETTI & BERTI-FILHO, 2000), embora o controle biológico destaque-se como um método seguro, permanente e econômico, algumas desvantagens podem ser observadas com o emprego deste método. O controle biológico pode levar muito tempo para ser colocado em prática, em decorrência das pesquisas e de outros processos de implementação, além de que, os resultados de uso do

controle biológico não são tão rápidos como àqueles onde são utilizados os controles químicos (SILVA & BATISTA, 2016).

Em relação ao controle químico até o momento não há registro de produtos para o controle das brocas-do-fruto especificamente. Porém, apesar de não haver nenhum princípio ativo registrado no Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, muitos autores recomendam produtos organossintéticos utilizados em outras culturas para o controle de diversas pragas (MELO, 2006). Contudo, apesar de sua eficácia e ação rápida, o uso de produtos químicos vem sendo reduzido, pois, na maioria das vezes, ocasionam o desenvolvimento de populações resistentes do inseto, o aparecimento de novas pragas, ocorrência de desequilíbrio biológico e além do seu alto custo, causam grandes efeitos prejudiciais ao homem, a outros animais e ao meio ambiente. Sendo assim, faz-se necessário à busca de alternativas que minimizem os efeitos adversos dos inseticidas sintéticos (SILVA; BATISTA, 2016).

Pelo exposto fica evidente a necessidade de investigar diferentes métodos de controle que possam isoladamente ou em conjunto ajudar no manejo da praga em estudo dentro do que prega o manejo integrado de pragas (MIP), que é definido como “uso de táticas de controle, isoladamente ou associadas harmoniosamente, numa estratégia baseada em análises de custo/benefício, que levam em conta o interesse e/ou o impacto sobre os produtores, sociedade e o ambiente” (KOGAN, 1998).

Estudos com extratos, óleos essenciais e compostos voláteis envolvidos na comunicação inseto-inseto e inseto-planta hospedeira, tem se mostrado promissores com diversas classes de insetos e podem contribuir para o manejo integrado desta praga (LIMA et al., 2019; TAVARES et al., 2021).

2.3 Potencial Inseticida de Extratos de Plantas

A biodiversidade vegetal presente em diversos países resulta em uma grande variedade de fitocompostos que têm sido usados para controlar vetores e pragas de produtos agrícolas e armazenados (KRISHNAPPA et al., 2020; EMBRAPA; 2020). Segundo a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) 70% da produção agrícola é armazenada por agricultores para diferentes fins (LORINI et al, 2015) e cerca de 30% a 40% dessa produção é perdida pela deterioração causada por insetos pragas (EMBRAPA, 2016; FAO, 2018).

As substâncias com potencial inseticida podem ser obtidas a partir de moagem de partes de plantas e posterior extração com solventes orgânicos ou aquosos (MACIEL et al., 2010). O uso de extratos de plantas com atividade alelopática, uma vez dispersa no ambiente, pode atuar inibindo a ação de insetos herbívoros seja por inibir a alimentação, reduzir a oviposição, por prejudicar o crescimento larval, ou por atrair polinizadores ou inimigos naturais (MAZHAWIDZA et al., 2017; CAMAROTI et al., 2018; SANTOS, et al., 2018; CERDA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2020). Extratos vegetais também possuem moléculas com ampla diversidade química, tornando-se uma importante fonte para obtenção de produtos com alto valor biotecnológico (LIMA, 2020).

Os extratos de plantas com potencial inseticidas são cada vez mais explorados por ser de fácil obtenção e manuseio, fazendo parte das ferramentas no plano de medidas voltadas a redução do uso de agrotóxicos, presente no manejo integrado de pragas (MIP), que tem como objetivo a otimização do controle de insetos de modo sustentável e economicamente eficaz, reduzindo o uso de agrotóxicos e buscando obter um equilíbrio entre interesse econômicos, ambientais e para saúde (EMBRAPA, 2016), propondo a associação harmoniosa de técnicas biológica, química, cultural e genética (BRAGA; SOBRINHO et al., 2007).

2.4 Compostos com Atividade Inseticida

Em coevolução, plantas e insetos, que vivem juntos há mais de 350 milhões de anos, desenvolveram estratégias para evitar o ataque e os sistemas de defesa de um contra o outro. Essa corrida evolutiva entre plantas e insetos resultou no desenvolvimento do sistema de defesa nas plantas, que tem a capacidade de reconhecer moléculas não-próprias ou sinais de células danificadas, assim como os animais, e ativa a resposta imune das plantas contra os herbívoros. Para combater o ataque de herbívoros, as plantas produzem estruturas morfológicas especializadas ou metabólitos secundários e primários como as proteínas que têm efeitos tóxicos, repelentes e/ou antinutricionais sobre os herbívoros (WAR et al., 2012).

2.4.1 Metabólitos secundários

Os metabólitos secundários têm importantes funções ecológicas nas plantas, a saber: protegem as plantas contra herbívoros e patógenos; servem como atrativos (aroma, cor, sabor) para polinizadores; e funcionam como agentes de competição entre plantas e de simbiose entre plantas e microrganismos. Metabólitos secundários nas plantas podem

ser divididos em três grupos distintos quimicamente: terpenos, compostos fenólicos e alcaloides (SINGH; KAUR, 2018).

Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico e ácido mevalônico. Os alcaloides são provenientes de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico e de aminoácidos alifáticos. Os terpenos são produzidos a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou da rota do metileritritol fosfato - MEP (no cloroplasto) (SANTOS, 2007). Flavonoides, taninos e ligninas fazem parte dos compostos fenólicos; óleos essenciais, saponinas, carotenoides e a maioria dos fitoreguladores são terpenos; nicotina, cafeína e vincristina são alguns exemplos de alcaloides (TAIZ; ZEIGER, 1998).

A análise fitoquímica possibilita identificar os grupos de metabólitos secundários relevantes em diferentes amostras (FERREIRA et al., 2014) contribuindo para elucidação dos mecanismos de ação e aplicação de extratos vegetais nas mais diferentes áreas.

2.4.2 Metabólitos primários - proteínas de plantas

Ecologicamente, na interação inseto-planta, a inter-relação entre os dois é importante para a sobrevivência de ambos. Os insetos sempre procuram uma planta hospedeira saudável que possa fornecer-lhes comida e possa ser adequada para acasalamento, oviposição e também forneça comida para seus descendentes. As necessidades nutricionais dos insetos são semelhantes às de outros animais, e qualquer desequilíbrio na digestão e utilização de proteínas vegetais resulta em efeitos drásticos na fisiologia dos insetos. A alteração da expressão gênica sob estresse, incluindo o ataque de inseto, leva a mudanças qualitativas e quantitativas nas proteínas, que por sua vez desempenham um papel importante na transdução de sinal e defesa das plantas (PAIVA et al. 2012a).

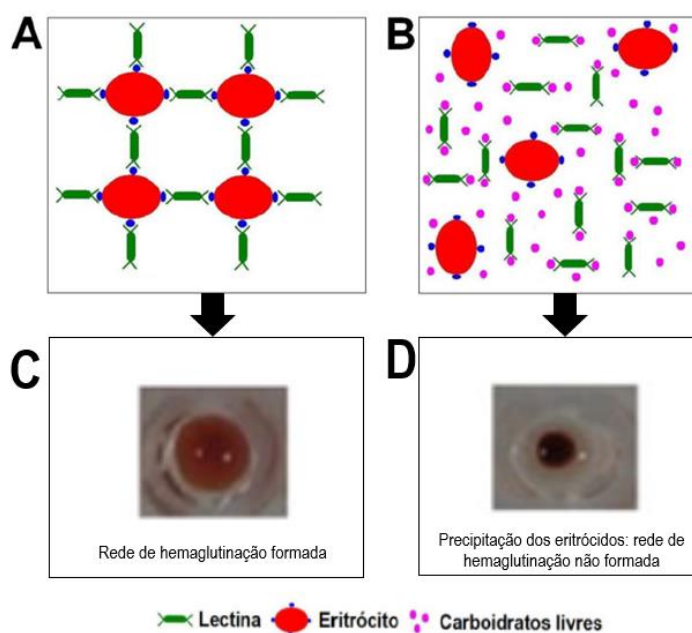
Dentre as proteínas descritas na literatura como participantes da defesa das plantas destacam-se os inibidores de proteases e as lectinas. Os inibidores de proteases (IPs) cobrem uma das classes de proteínas defensivas mais abundantes nas plantas. A maior concentração de IPs ocorre em órgãos de armazenamento, como sementes e tubérculos, possuindo de 1 a 10% de suas proteínas totais na forma de IPs, que inibem diferentes tipos de enzimas e desempenham um papel importante na defesa das plantas

contra a herbivoria de insetos (NAPOLEÃO et al., 2018). Já as lectinas, objetos de estudo deste trabalho, serão minuciosamente detalhadas a seguir.

2.4.2.1 Lectinas: isolamento, purificação e funções biológicas

As lectinas são consideradas um grupo heterogêneo de proteínas oligoméricas que variam em suas estruturas, entre os sítios de ligação a carboidratos, tamanho e organização molecular (CAMACHO, 2007). Estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em seres unicelulares (IMBERT et al., 2004), animais (MOURA et al., 2006) e vegetais (LEITE et al., 2005). Em vegetais, as lectinas são frequentemente isoladas de sementes, principalmente das leguminosas (FERNANDES et al., 2011) como também de raízes (SOUZA et al., 2011), folhas (SILVA, et al, 2010), tubérculos (KAUR et al., 2006), cerne (SÁ et al., 2008), casca (COSTA et al, 2018) e sementes (SANTOS, et al., 2012). Esta ampla distribuição reflete uma multiplicidade de funções biológicas, que estão relacionadas à sua habilidade de reconhecer carboidratos e glicoconjugados na superfície celular, o que lhes confere a capacidade de aglutinar células, como eritrócitos por exemplo (Figura 6).

Figura 6 – Esquema representando a aglutinação de eritrócitos promovida por lectinas. (A) Rede de aglutinação formada pela ligação de uma lectina aos carboidratos da superfície dos eritrócitos, e vista a olho nu no teste na placa de hemaglutinação (C). (B) Inibição da formação da rede de aglutinação por carboidratos livres e vista a olho nu pela precipitação dos eritrócitos na placa de hemaglutinação (D).



Fonte: Paiva et al., 2011.

Devido à capacidade de ligação das lectinas, estas podem interagir com um ou mais tipos de carboidratos, de forma reversível, fornecendo grande estabilidade as ligações, que podem ser por diversas forças como: ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas (LANNOO; VAN DAMME, 2010). Existem diversas formas de extração de lectinas onde inicialmente é preparado o extrato bruto, através de uma solução de extração, normalmente soluções tamponantes de variadas faixas de pH, com a finalidade de solubilizar as moléculas oriundas do material de partida. Preparações de extratos brutos também podem fazer uso de soluções salinas, a exemplo do extrato bruto de folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da praia) e *Myracrodruon urundeuva* (Fr. All.) (Sapindales: Anacardiaceae) (GOMES et al., 2013, NAPOLEÃO et al., 2013). Extratos aquosos também são descritos na literatura como solução de extração de lectinas (COELHO et al., 2009). Preparações ricas em lectina podem ser obtidas com o fracionamento proteico. O fracionamento salino é a técnica mais empregada em etapas de concentração de proteínas, uma vez que a adição de sal, a exemplo do sulfato de amônio ($\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$), remove a camada de solvatação que envolve a molécula sem danificar a estrutura molecular, dificultando a sua miscibilidade no meio aquoso. Logo com a remoção da camada de solvatação há um aumento nas interações entre proteínas do meio aquoso, permitindo a formação de um denso complexo de proteínas, provocando assim a precipitação dessas proteínas e ressuspensão em volume menor, promovendo sua concentração (PROCÓPIO et al., 2017).

A precipitação salina pode preceder o processo de purificação de alta resolução, como a cromatografia (NELSON, COX, 2014), na qual a separação diferencial da amostra é realizada utilizando-se uma fase móvel e uma estacionária, que pode depender da carga líquida (cromatografia de troca iônica), do tamanho molecular da proteína (cromatografia em gel de filtração) ou ainda através da afinidade a diferentes compostos (cromatografia por afinidade), técnica essa mais utilizada para purificação de lectina (NELSON; COX, 2014, QU et al., 2012).

Diversas importâncias biológicas têm sido atribuídas as lectinas. Nas plantas, têm-se observado ação defensora contra microrganismos patogênicos e insetos, bem como participação em mecanismos de nodulação, estocagem e mobilização de proteínas e carboidratos de reserva além do alongamento da parede celular (KENNEDY et al., 1995; HIRSCH, 1999; ISIDRO et al., 2001; CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002; PAES et al., 2002; LIMPENS & BISSELING, 2003). Além destas outras inúmeras atividades, muitas aplicações biológicas são encontradas como o reconhecimento, diferenciação e

determinação de tipos celulares (DANGUY et al., 1998; FUNK; THOMPSON, 1998), isolamento e análise estrutural de oligossacarídeos e glicoconjugados (ENDO, 1996; HAYUNGA; SUMMER, 1986; XIE et al., 2009; YAMASHITA; OHKURA, 2014), envolvimento no processo de cicatrização (GONZÁLEZ et al., 2014), atividade antiproliferativa (SILVA et al., 2014), anti-inflamatória (LEITE et al., 2012), anti-parasitária (CASTANHEIRA et al., 2015), antitumoral (ZHANG et al., 2015), antimutagênico e antioxidante (FRASSINETTI et al., 2015), imunomoduladora (PRASANNA; VENKATESH, 2015), antifúngica (CHIKALOVETS et al., 2015), antibacteriana (CARVALHO et al., 2015), antiviral (GORDTS et al., 2015) e inseticida (NAPOLEÃO et al., 2013).

Lectinas têm apresentado atividade entomotóxica sobre os mais variados grupos de insetos, pertencentes às Ordens Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Homoptera, Hymenoptera, Isoptera, Lepidoptera e Neuroptera (PAIVA et al., 2011). Geralmente elas resistem à degradação proteolítica no trato digestivo dos insetos e interagem com moléculas glicosiladas, interferindo nas funções de enzimas digestivas e proteínas assimilatórias dificultando, desta forma, a digestão e a absorção de nutrientes (COELHO; MARANGONI; MACEDO, 2007; OLIVEIRA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2015).

2.4.2.1.1 Atividade inseticida de lectinas e mecanismos de ação

Os estudos têm demonstrado que lectinas encontradas em tecidos vegetais resistentes ao ataque de insetos constituem potenciais candidatos a agentes inseticidas eficazes e biodegradáveis. A aroeira do sertão, *Myracrodruon urundeuva*, é uma árvore considerada madeira de lei, resistente ao ataque dos principais agentes biodeterioradores, tais como os cupins, insetos que degradam a celulose com o auxílio de simbioses (bactérias e protozoários flagelados) presentes no trato digestivo. Algumas lectinas que se ligam a quitina foram isoladas de sementes (MuHL) e entrecasca (MuBL) desta planta (SÁ et al., 2008; SÁ et al., 2009b). Notou-se que essas lectinas foram capazes de induzir a mortalidade de operários e soldados de *Nasutitermes corniger* (Motschulsky, 1855) (Isoptera: termitidae) (Cupim), espécie de cupim considerada praga urbana (SÁ et al., 2008). Além disso, MuHL e MuBL apresentaram atividade inseticida sobre o quarto estágio larval de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae), mosquito vetor da dengue (SÁ et al., 2009b). Contudo, o mecanismo de ação de lectinas com atividade termiticida sobre *N. corniger* e larvicida sobre *A. aegypti* ainda precisa ser mais elucidado. (NAPOLEÃO et al., 2013).

A ingestão de lectina em dietas artificiais, ou sua expressão em plantas transgênicas são as técnicas mais empregadas para mostrar a redução no desempenho de insetos pertencentes a diferentes ordens, incluindo Lepidoptera, Coleoptera e Hemiptera (VANDENBORRE et al., 2011). Numerosos estudos têm abordado a toxicidade de lectinas, mas apenas alguns investigaram o modo de ação pelo qual as lectinas vegetais impõem efeitos prejudiciais em insetos, conforme mostrado na tabela 1 (FITCHES e GATEHOUSE, 1998; LI et al., 2009; MACEDO et al., 2004). Compreender o modo de ação das proteínas entomotóxicas também pode contribuir para a elucidação a evolução de plantas e insetos, bem como contribuir para o desenvolvimento de estratégias menos prejudiciais para o controle de pragas.

Tabela 1 – Lectinas de origem vegetal e seus mecanismos de ação, em alguns insetos.

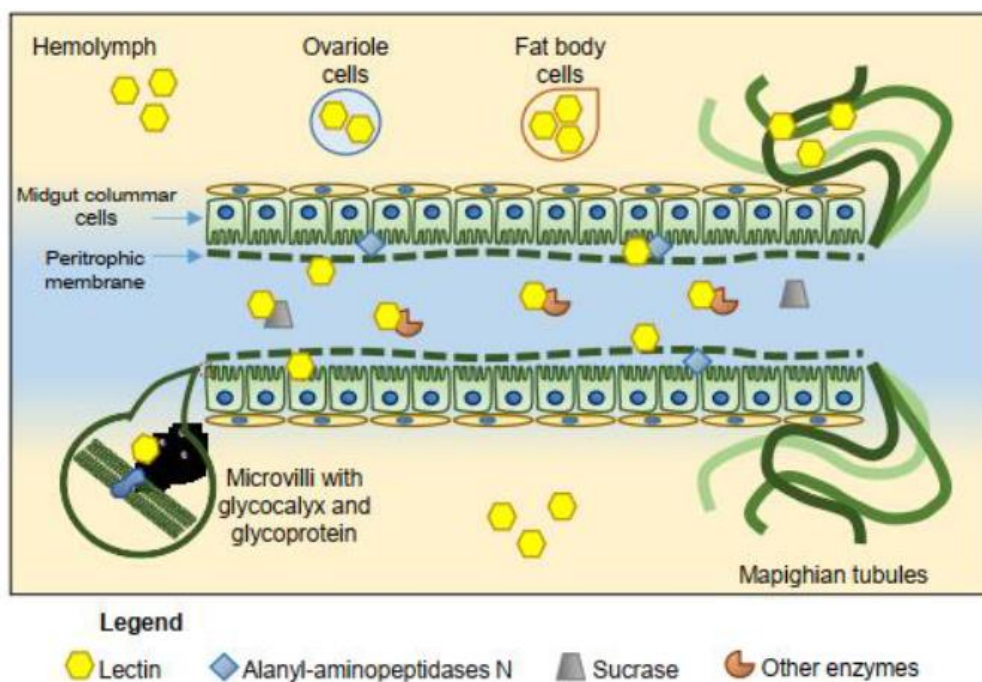
Lectinas (Fonte)	Insetos (Ordem)	Mecanismo	Referências
Folhas de <i>Myracrodruon urundeuva</i> (MuLL)	<i>Sitophilus zeamays</i> (Mots., 1855) (Coleoptera: Curculionidae)	Exerce efeitos deletérios, sobre <i>S. zeamais</i> , interferindo negativamente no ganho de biomassa crescimento, absorção de nutrientes e na atividade de diferentes enzimas digestivas (tripsina, α -amilase e protease).	SOUZA, et al., 2018.
Rhizoctonia solani aglutinina (RSA) e Sambucus nigra Aglutinina I e II (SNA-I e SNA-II)	<i>Tribolium castaneum</i> (Herbst, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae)	Capacidade de passar através da matriz peritrófica, reagindo com o epitélio intestinal.	WALSKI, et al., 2014.
Sementes de <i>Moringa oleifera</i> (WSMoL)	<i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae)	Apresentou atividade ovicida em ovos que já completaram a embriogênese e a ausência de incubação de ovos indica que embriões dentro dos ovos foram mortos.	SANTOS, et al., 2012.
Entrecasca e cerne de <i>Myracrodruon urundeuva</i>	<i>Nasutitermes corniger</i>	Inibiu as atividades da tripsina e β -glicosidade do intestino e estimulou as atividades de	NAPOLEÃO, et al., 2010.

(MuBL e MuHL)	(Motschulsky, 1855)(Isoptera: Termitidae)	endoglucanase e fosfatase ácida.	
Sementes de Dioclea violacea (DVL)	<i>Anagasta kuehniella</i> (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae)	Inibiu as atividades carboidráticas presentes no intestino médio, como a-amilase e a glucosidase.	COELHO, et al., 2007.

Fonte: autor, 2023. Adaptado de Paiva et al., 2011.

Geralmente, essas proteínas são resistentes à degradação proteolítica, sendo capazes de exercer seus efeitos deletérios quando ingeridas pelos insetos. Essa resistência pode ser considerada como um fator defensivo conservado por algumas plantas (MACEDO et al., 2007). Uma vez presentes no trato digestivo do inseto, as lectinas podem interagir com glicoconjugados presentes na superfície da membrana de células epiteliais. Quitina e proteínas glicosiladas contendo resíduos de N-acetilglicosamina presentes na matriz peritrófica (MP) são alvos para lectinas ligadoras de quitina (Figura 7).

Figura 7- Representação das principais estruturas e moléculas como possíveis alvos para a ligação de lectina em insetos.



Fonte: Macedo et al., 2015.

A matriz peritrófica (MP) constitui uma membrana encontrada no intestino médio de insetos, exceto os das ordens Hemiptera e Homoptera (BANDYOPADHYAY et al., 2001) que separa o conteúdo do lúmen intestinal das células epiteliais digestivas. A matriz contém uma rede composta por quitina (polímero de N-acetilglicosamina) e glicoproteínas, como as peritrofinas. A MP é uma barreira física e bioquímica que compartimenta processos digestivos, permitindo a aquisição eficiente de nutrientes, proteção contra patógenos e reutilização de enzimas hidrolíticas (BOLOGNESI et al., 2008). Lectinas de plantas com afinidade por N-acetilglicosamina podem, dessa forma, se ligar à quitina e proteínas glicosiladas da matriz peritrófica, interferindo nos processos de digestão e absorção de nutrientes (MACEDO et al., 2004; MACEDO et al., 2007).

Anomalias na formação da membrana peritrófica funcional e a ruptura das estruturas de microvilosidades foram relatadas em insetos alimentados com dietas contendo lectina (FITCHES; GATEHOUSE, 1998; LI et al., 2009). Lectina de bulbos de *Hippeastrum striatum* (Lam.) (amarílis) interagem com as células da borda em escova do intestino médio e interfere com a absorção normal de nutrientes de *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833) (Lepidoptera: Noctuidae), afetando o crescimento larval normal. Habibi et al. (2000), ao estudarem os efeitos da fitohemaglutinina (PHA) sobre o epitélio intestinal de *Lygus hesperus* (Knight, 1917) (Hemiptera: Miridae), observaram através de imunofluorescência e microscopia eletrônica a ruptura e fechamento do lúmen deste órgão. A lectina de tubérculo de *Arum maculatum* L. (Araceae) também mostrou capacidade de se ligar à glicoproteínas no intestino médio de *Lipaphis erysimi* (Kalt., 1843) (Hemiptera : Aphididae) e *Aphis craccivora* (Koch, 1854) (Hemiptera: Aphididae) (DUTTA et al., 2005). Lectina ligadora de manose (DB1) isolada de *Dioscorea batatas* (inhame) mostrou propriedades inseticidas contra *Helicoverpa armigera* (Hubner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae), espécie de mariposa cujas lagartas têm atacado as plantações de algodão. DB1 inibiu a emergência de adultos de *H. armigera* e técnica de imunomarcção revelou que ela se ligou à membrana peritrófica destes insetos (OHIZUMI et al., 2009).

Após avaliação, foi observado anomalias ultraestruturais na formação da matriz peritrófica de insetos alimentados com a lectina ligadora de quitina de *Triticum vulgaris* (WGA). Notou-se algumas camadas desorganizadas em larvas de *Ostrinia nubilalis* (Hübner, 1796) (Lepidoptera: Pyralidae) e alterações morfológicas nas microvilosidades de larvas de *Drosophila* (LI et al., 2009; VANDENBORRE et al., 2011).

Em insetos que não possuem matriz peritrófica, como pulgões, as lectinas podem interagir livremente com o epitélio intestinal, revelando todo o seu potencial inseticida. (WALSKI et al., 2014). Foi constatado que a lectina de *Allium sativum* L. (alho) se ligou a resíduos de carboidratos de proteínas receptoras específicas presentes nas vesículas da membrana em borda escovada, resultando na redução da permeabilidade (BANDYOPADHYAY et al., 2001).

As ações das lectinas com a matriz peritrófica e glicoconjugados do trato intestinal, afeta na absorção dos nutrientes e vias de sinalização e transporte (FITCHES et al., 1998; VANDENBORRE et al., 2011; WALSKI et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015). Em outros casos, notou-se que o metabolismo do inseto também pode ser desestabilizado, através da interação das lectinas com enzimas digestivas e proteínas transportadoras (AGRA-NETO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015).

Lectinas podem interferir nas funções de enzimas digestivas e proteínas assimilatórias, inibindo ou estimulando a digestão e absorção de nutrientes além de poder afetar indiretamente os mecanismos regulatórios de algumas enzimas devido à perturbação da organização da membrana peritrófica e da borda em escova (FITCHES; GATEHOUSE, 1998; FITCHES et al., 2008; PAIVA et al., 2012). Desta forma, através dessa ligação, lectinas podem afetar o metabolismo de insetos (MACEDO et al. 2007; NAPOLEÃO et al. 2012). Os mecanismos inseticidas podem ser: ligação à porção glicídica de enzimas glicosiladas; ligação às enzimas através de sítios diferentes do sítio de ligação ao substrato; ligação ao substrato; ou ligação tanto à enzima quanto ao substrato, aumentando a afinidade entre eles (MACEDO et al., 2007).

A modulação de atividade de enzimas digestivas por lectinas vem sendo demonstrada. A modificação dessas atividades enzimáticas consegue levar a um desequilíbrio metabólico, podendo levar a morte do inseto (MICHIELS et al., 2010). Lectina inseticida isolada da folha de *Bauhinia* L. *monandra* mostrou um estímulo, sobre a atividade de α -amilase de homogenatos do intestino médio de *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae), provavelmente aumentando a afinidade da enzima ao seu substrato (MACEDO et al. 2007). As lectinas de *Galanthus nivalis* e a concanavalina A, lectina isolada de sementes de *Canavalia ensiformis* (Fabaceae), estimularam a atividade de aminopeptidase, tripsina e glucosidases no intestino de larvas de *Lacanobia oleracea* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Noctuidae) (FITCHES; GATEHOUSE, 1998). A ação pode também ser inibitória, como mostrada para a lectina

isolada da folha de *M. urundeuva*, que inibiu a ação de proteases e a ação estimulatória sobre α -amilase do intestino de larvas de *Aedes aegypti* (NAPOLEÃO et al., 2012).

Algumas lectinas tem o poder de ultrapassar a barreira epitelial, alcançando o sistema circulatório do inseto, podendo afetar moléculas de autodefesa presentes na hemolinfa (FITCHES et al., 2001). No entanto, antes de sugerir que uma lectina possa ter a ação à nível intestinal, é necessário avaliar se essas lectinas são resistentes à degradação proteolítica. Por exemplo, no estudo do mecanismo de ação inseticida da lectina isolada de *Galanthus nivalis* (Amarilydaceae) sobre *Nilaparvata lugens* (Stål) (Homoptera: Delphacidae), evidenciou-se que a lectina não sofreu degradação proteolítica significativa quando ingerida pelos insetos (POWELL et al., 1998).

As lectinas também podem afetar a microbiota intestinal de insetos. Os cupins dependem da microflora intestinal para fazer a digestão da celulose, uma vez que esses microrganismos produzem a celulase. Desta forma, lectinas podem exercer seu efeito inseticida através da ação antimicrobiana. Napoleão et al., (2014) mostrou que lectinas isoladas da casca e cerne de *M. urundeuva* (aroeira do sertão) causavam mortalidade em cupins da espécie *N. corniger*. Adicionalmente, as lectinas isoladas também foram bactericidas contra microrganismos da flora intestinal desses insetos.

Algumas lectinas mostraram a capacidade de atuar inibindo a atividade da superóxido dismutase (SOD). A atividade da SOD em insetos foi encontrada nas brânquias anais de larvas de insetos e essa enzima desempenha alguns papéis importantes para a resistência contra espécies reativas de oxigênio tais como o ânion superóxido (NIVSARKAR et al. 1991). O aumento da SOD em alguns insetos pode levar, em alguns casos, a resistência a alguns inseticidas já utilizados em plantações como é o caso dos piretróides (NIVSARKAR et al. 1991; MÜLLER et al. 2007). Com a inibição da atividade da SOD, ocorrerá estresse oxidativo devido à ausência de desintoxicação. A alta inibição da atividade da SOD pela cMoL (Lectina coagulante de *M. oleifera*), além de levar a um estresse oxidativo devido a menor desintoxicação do radical superóxido, também resultou em uma diminuição de larvas, gerando um controle populacional do inseto (AGRA-NETO et al., 2014).

Ainda, as lectinas podem exercer uma ação deterrente sobre a alimentação dos insetos por um efeito pré-ingestão, envolvendo sensores digestores, ou por um efeito pós-ingestão, ao promoverem intoxicação (SAUVION et al., 2004; MICHIELS et al., 2010).

O controle de insetos alados pode ser feito durante o desenvolvimento larval, impedindo ou dificultando a transformação deles para a fase adulta. Organofosforados são bastante utilizados no Brasil para esse fim. No entanto, devido a uma diminuição na sua eficácia devido à tolerância das larvas e a busca por segurança ambiental e biodegradabilidade, novos bioinseticidas têm sido avaliados, tais como as lectinas (COELHO et al., 2009).

A lectina isolada de sementes de *Moringa oleifera* (WSMoL), a qual apresenta elevada solubilidade em água, mostrou ação larvicida contra *Aedes aegypti*. Além disso, extratos contendo WSMoL foram capazes de atrasar o desenvolvimento larval, que parou no terceiro instar (COELHO et al., 2009). O desenvolvimento larval pode estar sendo comprometido pela inibição de enzimas digestivas interferindo na nutrição dessas larvas, como foi visualizado para a lectina de folha de *Bauhinia monandra* Kurz (pata-de-vaca), que estimulou em ensaios *in vitro* a atividade de α -amilase em larvas de *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleóptera: Bruchidae) (MACEDO et al., 2007). Fitches e Gatehouse (1998) reportaram que, em curto prazo, a lectina de *Galanthus nivalis* apresentou efeito estimulatório sobre tripsina, α -glicosidase e aminopeptidase de larvas de *L. oleracea* causando, em longo prazo, uma diminuição na atividade de α -glicosidase. Larvas da mosca do melão (*Bactrocera cucurbitae* (Coquillett, 1899) (Diptera: Tephritidae)) apresentaram redução nas atividades de fosfatases ácidas e alcalinas quando alimentadas com a lectina de tubérculos de *Arisaema helleborifolium*, enquanto a atividade de esterases aumentou consideravelmente (KAUR et al., 2006).

A ação entomotóxica de lectinas pode ocorrer também a longo prazo. Algumas lectinas podem não afetar a sobrevivência do inseto que está se alimentando, mas alterar parâmetros reprodutivos que levam à redução populacional. A lectina de *Galanthus nivalis* (GNA) expressa em plantas de trigo transgênico causou efeitos significativos nos pulgões do trigo, que está ligado aos níveis de expressão da proteína nas diferentes linhas transgênicas. Embora a sobrevivência de pulgões que foram criados em plantas que expressam GNA não foi afetada, sua fecundidade foi reduzida significativamente. Esse mecanismo pode causar a reduções na taxa de eclosão de ovos. A ausência de larvas mortas em soluções mostra que o efeito é bem seletivo, com a atividade ovicida e não a larvicida da lectina (SANTOS et al., 2012). A atividade ovicida sobre *A. aegypti* tem sido demonstrada em extratos orgânicos, óleos essenciais e lectinas através do impedimento da eclosão dos ovos. WSMoL também foi capaz de inibir a eclosão de ovos armazenados

e análises mostraram que a lectina levou à morte dos embriões dentro dos ovos (SANTOS et al., 2012).

2.5 *Crotalaria stipularia*

O gênero *Crotalaria* constitui-se em um dos maiores da família, com cerca de 690 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, principalmente no Hemisfério Sul, sendo mais rico na África e na Índia. São citadas por Lewis et al (2005) cerca de 74 espécies, sendo 59 endêmicas e, destas, 35 são da América do Sul, a maioria das quais, no Brasil. Segundo Burkart (1952), nos neotrópicos, a área natural do gênero, abrange desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina e o Uruguai.

Em relação a sua utilidade agroecológica, diversos são os usos citados para suas espécies, como: adubo orgânico; forragem; no combate a nematóides de plantações; em programas de revegetação de áreas contaminadas com substâncias tóxicas (como arsênio empregado na indústria têxtil); na produção de fibras para confecção de papel; na medicina popular e em atividades farmacológicas (BURKART, 1952; POLHILL, 1982; MORRIS, 1997; MEDA; NARENDER et al., 2005, AHMED et al., 2006, SILVA et al., 2007; GARRIDO et al., 2008, FELIPE et al., 2009; e ROCHA et al., 2009).

Além dessas aplicações, sementes de duas espécies de *Crotalaria*, *Crotalaria juncea* (Linnaeus, 1753), *Crotalaria spectabilis* Roth, tem sido utilizadas no combate do mosquito vetor da dengue, *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), há controvérsias de como essas sementes agiriam no combate a esse inseto, se de maneira direta impedindo a eclosão dos ovos ou se essas sementes atrairiam um inimigo natural do mosquito, apesar disso, diversos estados já as utilizam no combate ao vetor da dengue, como pode ser visto na tabela 2.

Tabela 2 - Levantamento dos Municípios que aderiram à distribuição da *Crotalaria* como forma de controle do *Aedes* até março de 2016.

Município	Data	Fonte
Brasília/DF	25 Jan. 2016	Portal G1
Vianópolis/GO	23 Abr. 2015	http://www.opopular.com.br
Alto Araguaia/MT	09 Mar. 2016	Site Oficial da Prefeitura
Alta Floresta/MT	18 Jan. 2016	Site Oficial da Prefeitura
Confresa/MT	29 Fev. 2016	Site Oficial da Prefeitura
Juína/MT	17 Fev. 2016	Site Oficial da Prefeitura

Primavera do Leste/MT	19 Mar. 2016	http://tvmutum.com.br
Sorriso/MT	15 Dez. 2015	Site Oficial da Prefeitura
Nova Andradina/MS	25 Mai. 2015	drsandro.org
Bonito/MS	08 Mar. 2016	Site Oficial da Prefeitura
Dourados/MS	25 Mai. 2015	drsandro.org
Araxá/MG	05 Nov. 2011	Portal G1
Carmo do Rio Claro/MG	16 Out. 2010	Site Oficial da Prefeitura
Chapada do Norte/MG	30 Abr. 2013	2013 Site Oficial da Prefeitura
Frutal/MG	11 Fev. 2016	Site Oficial da Prefeitura Gov.
Valadares/MG	04 Mar. 2016	Site Oficial da Prefeitura
Ipatinga/MG	04 Fev. 2016	http://www.diariopopularmg.com.br
Ituiutaba/MG	25 Mar. 2016	Site Oficial da Prefeitura
Uberaba/MG	03 Jul. 2013	Portal G1
Santo Ângelo/RS	15 Mar. 2016	http://www.jornaldasmissoes.com.br
Santa Maria/RS	08 Mar. 2016	http://site.ufsm.br
Santa Catarina/SC	29 Fev. 2016	Portal G1
Andradina/SP	17 Jan. 2016	Portal G1
Apazivel/SP	25 Mai. 2015	drsandro.org
Araraquara/SP	12 Fev. 2016	Portal G1
Catanduva/SP	24 Fev. 2015	Site Oficial da Prefeitura
Jaboticabal/SP	13 Jan. 2016	Site Oficial da Prefeitura
Penápolis/SP	24 Fev. 2015	http://www.regionalpenapolis.com.br
Presidente Prudente/SP	24 Fev. 2015	Portal G1
Presidente Venceslau/SP	06 Mai. 2015	Site Oficial da Prefeitura
São José do Rio Preto/SP	26 Mar. 2015	Site Oficial da Prefeitura
Cordeiro/RJ	08 Mar. 2016	Portal G1
Rio de Janeiro/RJ	29 Mar. 2016	Site Oficial da Prefeitura

Fonte: PEIXOTO et al, 2018.

A espécie *Crotalaria stipularia* (Desv., 1814) (Figura 8) é amplamente distribuída no Brasil como pode ser visto na figura 8, ocorrendo nas regiões: Norte (Acre, Pará, Roraima); Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Sergipe); Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato

Grosso); Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) ([http://servicos.jbrj.gov.br/flora/search/Crotalaria stipularia](http://servicos.jbrj.gov.br/flora/search/Crotalaria_stipularia)).

Figura 8 - *Crotalaria stipularia*



Fonte: Autor, 2019.

Figura 9 - Distribuição da *C. stipularia* no território brasileiro



Fonte: [http://servicos.jbrj.gov.br/flora/search/Crotalaria stipularia](http://servicos.jbrj.gov.br/flora/search/Crotalaria_stipularia)

Com o exposto, percebe-se que pouco se sabe sobre a espécie *Crotalaria stipularia* e não há na literatura estudos sobre a sua potencialidade inseticida nem sobre sua constituição fitoquímica e ecotoxicológica, motivos que justificam o presente estudo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Isolar, purificar e caracterizar a lectina das sementes de *Crotalaria stipularia* e avaliar a atividade inseticida dessa proteína do extrato e da fração concentrada de proteínas das sementes contra os insetos adultos de *Cerconota anonella*.

3.2 Objetivos específicos:

- ✓ Extrair lectinas das sementes de *C. stipularia*;
- ✓ Isolar lectinas das sementes de *C. stipularia* utilizando métodos cromatográficos convencionais e avançados para isolamento de proteínas;
- ✓ Caracterizar lectinas determinando o efeito de carboidratos, glicoproteína, íons, pH e temperatura na atividade hemaglutinante da lectina de *C. stipularia*;
- ✓ Avaliar a atividade inseticida do extrato, fração concentrada e da lectina de *C. stipularia* contra os insetos adultos de *Cerconota anonella*;
- ✓ Calcular parâmetros nutricionais (taxa relativa de ganho de biomassa, taxa de consumo relativo e eficiência de conversão do alimento ingerido) dos adultos de *C. anonella* que ingeriram a dieta artificial contendo os tratamentos de *C. stipularia*;
- ✓ Analisar os efeitos de *C. stipularia* sobre o perfil bioquímico (proteínas totais, triglicerídeos, colesterol e glicose) de *C. anonella*;
- ✓ Realizar a análise quantitativa de metabólitos secundários presentes no extrato das sementes de *C. stipularia*;
- ✓ Realizar teste ecotoxicológico com extrato das sementes de *C. stipularia* frente a *Lectuce sativa*.

4. METODOLOGIA

4.1 Material Biológico

4.1.1 Identificação da espécie de planta e obtenção das sementes de *C. stipularia*

Inicialmente, amostras da planta em estudo foram coletadas e levadas para identificação e deposição de exemplar no repositório do Herbário MAC do Instituto de Meio Ambiente (IMA) do Estado de Alagoas. A planta selecionada apresentava em sua estrutura todos os requisitos necessários para a devida identificação (folhas, flores, caules e vagens).

As sementes foram extraídas das leguminosas *C. stipularia* (Figura 10) encontradas no Povoado Saco, localizado na zona rural da cidade de Marechal Deodoro/AL (09° 42' 37" S 35° 53' 42" W). As sementes foram armazenadas em sacos lacrados e levadas ao laboratório de Laboratório de Metabolismo e Proteômica (LAMP) da Universidade Federal de Alagoas- UFAL para realização dos procedimentos experimentais.

Figura 10 – Sementes secas de *C. stipularia* sendo retiradas de parte da planta.



Fonte: autor, 2023.

4.1.2 Insetos de *Cerconota anonella*

Frutos de *Annona muricata* (graviola), infestados, foram coletados em pomares, na Cooperativa Pindorama, localizada no município de Coruripe-AL, (10°09'54''S; 36°21'07''W) (Figura 11).

Figura 11 – Coleta de frutos de *Annona muricata* (graviola) infestados por *Cerconota anonella*.



Fonte: autor, 2023.

Após a coleta, foram levados para o laboratório de Ecologia Química na Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Os frutos maduros e verdes, com sinais de ataque, foram armazenados em gaiolas de madeira (30 cm de largura x 30 cm de comprimento x 30 cm de altura) com as laterais cobertas por tela Figura (12).

Figura 12 – Esquema demonstrativo do armazenamento dos frutos de graviola coletados no campo para posteriormente adquirir os insetos adultos de *Cerconota anonella*.



Fonte: autor, 2023.

Logo após emergirem os insetos adultos de *Cerconota anonella* foram separados por sexo e posteriormente, utilizados em bioensaios laboratoriais.

4.2 Experimentos para a Purificação e Caracterização da Lectina das Sementes Secas de *Crotalaria stipularia*

4.2.1 Preparo do extrato bruto das sementes de *Crotalaria stipularia*

Para o preparo do extrato bruto, foram retiradas das vagens as sementes secas (Figura 13), as quais foram pesadas em balança analítica (Marte AY220) (1,0 g) e trituradas com auxílio de almofariz e pistilo em tampão de extração Tris HCl 50 mM pH 8,0 (20 mL).

Em seguida, as soluções foram mantidas sob agitação constante por 16 horas na temperatura de 4°C. Findo este tempo, os extratos foram centrifugados para que o material particulado fosse retirado, e o sobrenadante foi submetido as demais análises.

Figura 13 – Semente secas de *C. stipularia*

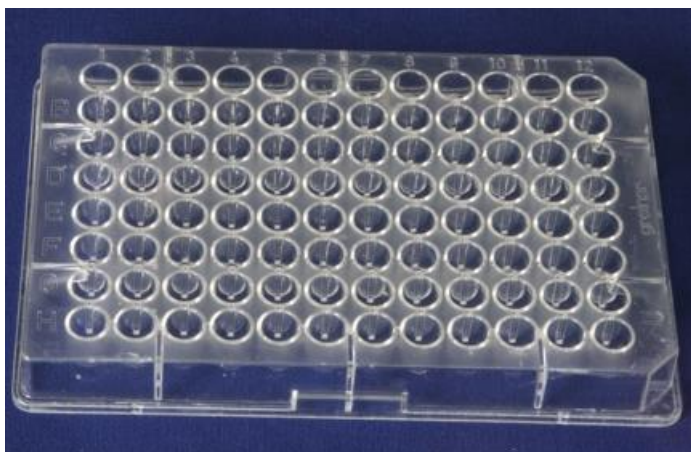


Fonte: autor, 2023.

4.2.2 Atividade hemaglutinante

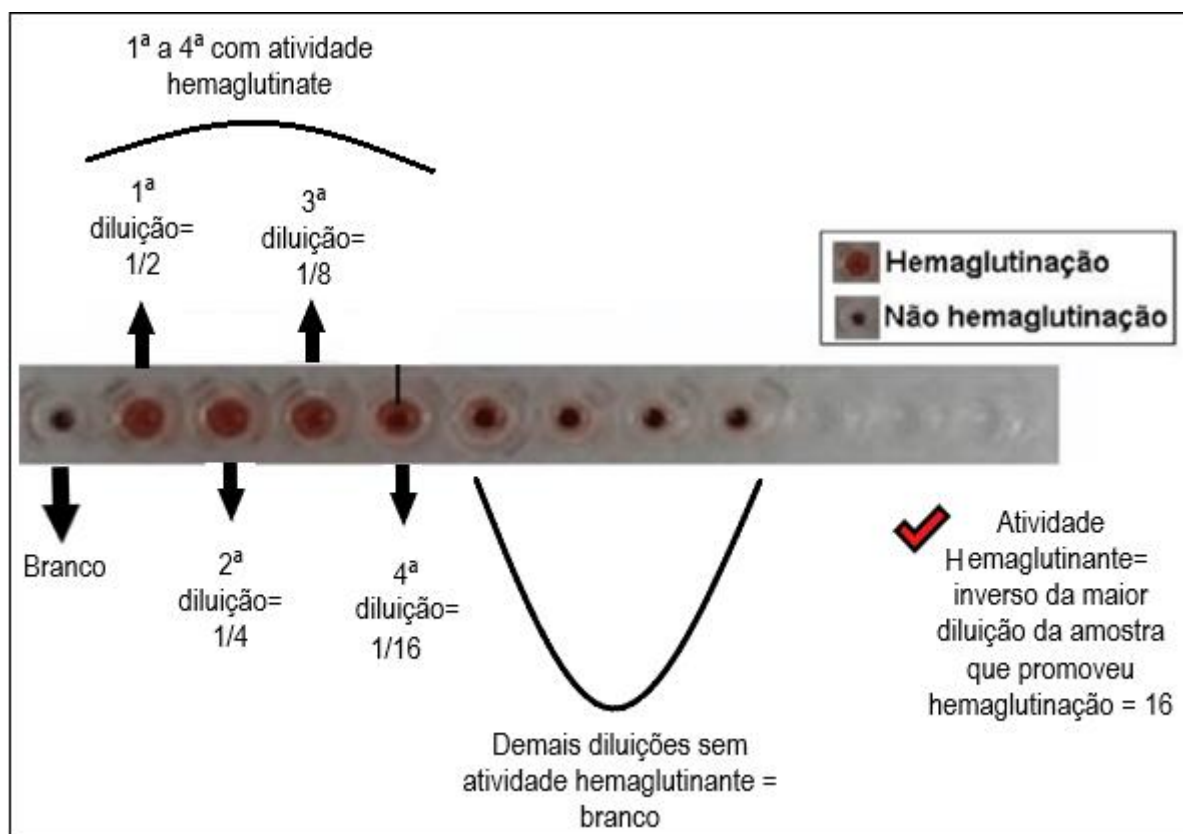
Com objetivo de saber se no extrato de *C. stipularia* havia a presença de lectinas foi realizado o ensaio de atividade hemaglutinante (AH). O ensaio de atividade hemaglutinante foi realizado em placas de microtitulação (Figura 14), de acordo com a metodologia descrita por Paiva e Coelho (1992). Aliquota (50 µL) da amostra foi diluída serialmente em NaCl 0,15 M antes da adição de 50 µL de suspensão (2,5 % v/v) de eritrócitos de coelho. A AH (título⁻¹) foi expressa como o inverso da maior diluição da amostra que promoveu hemaglutinação, (Fígura 14). AH específica (AHE) foi definida pela razão entre o título e a concentração proteica (mg/mL).

Figura 14 – Placa de microtitulação



Fonte: autor, 2023.

Figura 15 – Mostra do teste de atividade hemaglutinante



Fonte: autor, 2023.

4.2.3 Determinação da concentração de proteína

A concentração da proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976), usando albumina de soro bovino como padrão ($250-0,009 \mu\text{g/mL}$). Para isso foram usados

10 µL das amostras (extrato bruto e fração, que é melhor detalhada no tópico 4.2.5) diluídas (1:10), e 190 µL de reagente de Bradford. Posteriormente as amostras foram incubadas por 5 min, e medido a absorbância em espectrofotômetro a 595 nm (VARIAN CARY 50 BIO). As unidades correspondentes são (mg/mL) de proteína.

4.2.4 Teste de inibição a carboidratos

Para confirmar a presença de lectinas, foi realizado o ensaio de inibição da AH utilizando carboidratos e glicoproteínas como descrito por Carvalho et al. (2015). Aliquotas de 50 µL da amostra foram submetidas à incubação inicial em solução de carboidrato dissolvido em NaCl 0,15 M durante 15 minutos. Em seguida foram adicionadas 50 µL de suspensão de eritrócitos (2,5 % v/v) nos poços de micro titulação e incubadas por um período de 45 minutos. Uma alíquota de 50 µL da amostra diluída serialmente em igual volume de solução salina de NaCl 0,15 M incubada com 50 µL de suspensão de eritrócitos de coelho foi usado como controle positivo.

As concentrações de soluções inibidoras foram 0,2; 0,1; 0,5 e 0,25 M para os carboidratos D – Galactose, D – Glicose, Maltose, Fucose, Ribose, Raminose, Glicopirranose, Piranose, D – Frutose, D – Arabinose, D – Lactose, Manose, N-acetil-monosamina, N-acetil-glicosamina, N-acetil-galactose e 500, 250 e 125 µg/mL para glicoproteína (fetuína). A inibição é quantificada em razão da redução da AH quando comparado com o controle negativo.

4.2.5 Precipitação com sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a partir do extrato da *C. stipularia*

Após a certificação da presença de lectina no extrato bruto obtido a partir das sementes da *C. stipularia*, realizou-se uma precipitação salina com sulfato de amônio, como forma de eliminar parte das proteínas contaminantes, e concentrar a atividade lectínica. O fracionamento aplicado é mostrado na Tabela 3, e ambas as etapas de precipitação foram realizadas a 15.000G a 4°C por 20 min, com centrífuga refrigerada (HERMLE- Z236K). O volume inicial de extrato utilizado para a precipitação foi de 10 mL O extrato utilizado foi o das sementes secas.

Tabela 3 – Precipitação salina

FRAÇÃO (%)	MASSA DE $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (G)
0-20	1,060
20-40	1,164

40-60	1,260
60-80	1,419
80-100	-

Fonte: autor, 2019.

Durante a adição do sal, tomou-se a precaução de que este procedimento fosse realizado de forma paulatina, e sob baixa agitação, com auxílio do agitador magnético, visando uma solubilização uniforme, e uma maior separação das proteínas em função do grau de solubilidade. Após a precipitação, as amostras coletadas foram submetidas ao teste de atividade hemaglutinate, para verificar em qual fração estaria concentrada a lectina.

4.2.6 Cromatografia líquida por afinidade

Para a etapa de isolamento da lectina, foi utilizada a fração contendo a maior atividade hemaglutinante específica obtida a partir da etapa de pré-purificação do fracionamento salino (precipitado 20%), que foi aplicada em uma coluna cromatográfica (10 x 2,5 cm) em matriz de quitina (Figura 14) previamente hidratada com NaCl 0,15 M, seguida de 40 mL de tampão de equilíbrio Tris-HCl pH 8,0 50 mM, a um fluxo de 0,2 mL/min em 2 volumes de coluna. Em seguida utilizou-se como tampões de eluição 20 mL de Tris-HCl contendo NaCl 0,5M pH 8,0, 20 mL de ácido acético 0,25 M e 40 mL ácido acético 1 M sendo coletadas frações de 2 mL, a 25°C.

As amostras coletadas foram monitoradas em espectro a 280 nm e avaliadas quanto à AH e dosagem proteica. As frações que apresentaram maiores AH foram dialisadas separadamente em membrana semipermeável com poros de 10 kDa de diâmetro contra solução tampão Tris-HCl pH 8,0 a 4° C durante 6 horas, com trocas a cada 2 horas, para remoção do ácido acético contidos nas amostras. Ao término do procedimento foi observado seu potencial bioquímico em aglutinar hemácias de coelho.

De cada análise cromatográfica foram obtidos dois tubos com atividade hemaglutinante (com 2 mL cada), foram realizadas 5 análises assim obteve-se 20 mL que foram acondicionadas em 4 tubos de vidros, vedados com plástico filme e congelados. Em seguida foram submetidas ao processo de liofilização (modelo LS3000, Terroni científicos) por 24 horas. As amostras foram ressuspendidas em 1 mL de Tris-HCl 50 mM pH 8,0 e submetido a análise em eletroforese para verificação da pureza da amostra.

Figura 16 – Cromatografia líquida em coluna de quitina



Fonte: autor, 2023.

4.2.7 Eletroforese SDS-PAGE

As amostras coletadas da cromatografia que apresentaram maiores atividades hemaglutinantes foram reunidas e submetidas à eletroforese para confirmar o grau de pureza da amostra, utilizando gel de poliacrilamida (PAGE) contendo dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) usando um gel a 10 % (p/v) sob condição não redutora e redutora em presença de β -mercaptoetanol (LAEMMLI,1970). As bandas de polipeptídios foram coradas com Coomassie Brilliant Blue (0,02 %, v/v) em ácido acético a 10 % (v/v) por 4h e, em seguida, revelado com solução descorante (10 % ácido acético, 40% de metanol e 50 % água mili-Q).

4.2.8 Avaliação do efeito da temperatura e do pH na AH

O teste de estabilidade térmica foi feito mantendo alíquotas de 200 μ L da amostra em tubos de 2,0 mL, a temperaturas que variaram gradativamente de 30 a 100 °C, em banho maria com água, durante 60 minutos. Após esse período as amostras foram centrifugadas (15.000 g, 5 minutos, 25°C) para remover precipitados, caso fosse formado, e em seguida foi realizado a atividade hemaglutinante do sobrenadante e quantificado em razão do título.

O ensaio para avaliar a estabilidade da lectina das sementes de *C. stipularia* em diferentes valores de pH foi realizado com alíquotas de 1000 μ L que foram colocadas em membranas semipermeáveis (poros de 12 kDa e diâmetro de 2,5 cm) para dialisar por 4

horas, com trocas a cada hora, contra vários tampões com pH variando de 4 a 12: Tampão Citrato-fosfato 100 mM (pH 4,0), Acetato de sódio 100 mM (pH 5,0 - 6,0) Fosfato de sódio 100 mM (pH 7,0), Tris-HCl 100 mM (pH 8,0) e Glicina-NaOH 100 mM (pH 9,0 a 12,0). Em seguida todas as amostras foram submetidas aos testes de atividade hemaglutinante com suspensão (2,5 % v/v) de eritrócitos de coelhos, para verificação da melhor AH. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

4.2.9 Avaliação do efeito do EDTA e de íons divalentes sobre AH

A influência de cátions divalentes (Ca^{2+} e Mg^{2+}) e do EDTA (agente quelante) para a atividade hemaglutinante foi determinada conforme adaptações do método de PAJIC et al. (2002). Alíquotas de 1000 μL da proteína foram colocadas em membranas semipermeáveis com poros de 12 kDa, apresentando diâmetro de 2,5 cm, e dialisadas por 4 horas, com troca a cada hora contra 5 mM de EDTA as soluções de Ca^{2+} e Mg^{2+} a 10 mM. Alíquotas foram retiradas e avaliadas a atividade hemaglutinante.

4.3 Análises Fitoquímicas Feitas a partir do Extrato das Sementes Secas de *C. stipularia*

4.3.1 Determinação do conteúdo fenólico total

O conteúdo total de fenóis foi obtido de acordo com o método de Folin-Ciocalteu (RFC), descrito por Cicco et al., (2009). Para o método adicionou-se aos tubos, 120 μL da amostra (extrato) (83,3 g/mL), 180 μL de água, 300 μL do reagente de Folin-Ciocalteu e 2,4 mL de carbonato de sódio a 5% (m/v), totalizando um volume de 3mL. Os tubos foram postos em banho-maria a 40°C no escuro por 20 minutos. Logo após, a mistura reacional foi colocada em uma cubeta de quartzo e foi medida a absorbância a 760 nm, utilizando espectrofotômetro UV-vis (Agilent 8453).

Os teores de fenóis totais (TFC) foram obtidos a partir da curva de calibração utilizando ácido gálico (0,7 a 7,0 mg/mL) como padrão e os resultados foram expressos em micrograma de equivalentes de ácido gálico/ grama da amostra bruta (μg EAG/g da amostra bruta). O ácido gálico foi utilizado como padrão no presente estudo, representando os compostos fenólicos em meio básico. As análises foram feitas em triplicata.

4.3.2 Perfil fitoquímico por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

O perfil fitoquímico do extrato aquoso de *Crotalaria stipularia* foi investigado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Essas análises de HPLC foram realizadas em um cromatógrafo analítico Shimadzu® modelo LC20AT, controlador CBM-20A, SPD-20 com um detector Ultravioleta-Visível (UV-Vis), forno CTO-20A, autoinjeter SIL-20A HT, degaseificador DGU-20A 5R, coluna de fase reversa (C18 Shim-pack VP-ODS, 4,6 mm × 150 mm, 4,6 µm).

Inicialmente, o extrato foi preparado a partir das amostras de *C. stipularia* (como mostrado no tópico 4.2.1). As soluções padrão de ácido gálico, catecol, catequina, ácido clorogênico, ácido cafeico, vanilina, siringaldeído, ácido cumárico, cumarina, rutina, miricetina e quercetina foram filtradas em um cartucho de extração de fase sólida Macherey-Nagel chromabond® C18-ec e um disco de filtro de 0,45 µm. A amostra foi filtrada em membrana de filtro Chromafil® Xtra PTFE-20/25 de 25 mm com poro de 0,20 µm.

O processo de eluição foi realizada com uma solução de ácido acético a 0,1% em água (solvente A) e metanol (solvente B). O extrato e os padrões foram eluídos de acordo com o gradiente de solvente B: 0 a 5 min (7-11%); 5 a 10 min (11-16%); 10 a 15 min (16-25%); 15 a 30 min (25%); 30 a 34 min (25-38%); 34 a 38 min (38-50%); 42 a 46 min (60-65%); 46 a 50 min (65-70%); 54 a 58 min (75-85%); 58 a 62 min (85-25%); 62 a 63 min (25-7%); 63 a 80 min (7%), fluxo de 0,6 mL/min. O volume de injeção foi de 20 µL para padrões e extrato. A temperatura do forno foi fixada em 35 °C. As medições cromatográficas foram monitorados a $\lambda \sim 290$ nm.

Os compostos presentes no extrato foram identificados comparando-se o tempo de retenção (Rt) com os obtido pela injeção de padrões preparados nas mesmas condições. Para quantificação, uma curva analítica (10 pontos) foi construída a partir de uma solução contendo uma mistura de todos os padrões (Mix). Para isso, soluções com concentrações que variam de 1 a 10 ppm em água: solução de etanol (70:30 v/v) foram preparados. A quantificação dos compostos foi realizada por meio da correlação a área do sinal e o volume dos padrões adicionados, sendo a concentração expressa em g.Kg⁻¹.

4.4 Ensaio de Ecotoxicidade Frente a *Lactuca sativa*

Conforme apresentado no trabalho de Young et al., (2012) a *Lactuca sativa* é considerada como modelo para teste de fito-toxicidade, sendo recomendada por diversas organizações internacionais (ISSO, EPA, OECD) para determinação dos efeitos ecológicos de substâncias tóxicas e padronização dos ensaios de toxicidade.

Nesse trabalho foram preparadas placas de Petri contendo um papel filtro, nas quais foram adicionados 5 mL de soluções contendo 30, 45 e 90 ppm de extrato bruto das sementes de *C. stipularia* acompanhados do controle Tris-HCl 50 mM que foi utilizado como tampão para extração das sementes de *C. stipularia*. (Figura 17) Em seguida, procedendo-se à adição de 15 sementes de *L. sativa* para cada placa e foram armazenadas em caixas de isopor para evitar o contato com a luz durante um período de 8 dias.

Decorrido o período de incubação, as placas foram retiradas, e foi realizada a análise do total de sementes germinadas e medição do tamanho das radículas, sendo os valores utilizados para a determinação dos índices de germinação (IG) e crescimento relativo (ICR), com base nas Equações X e Y (YOUNG et al., 2012).

Equação X

$$\text{ICR} = \text{CRA} / \text{CRC}$$

Equação Y

$$\text{IG} = \text{ICR} \times (\text{SGA}/\text{SGC}) \times 100$$

Onde CRA é o comprimento médio das radículas da amostra, CRC o comprimento médio das radículas do controle, SGA o número de sementes da amostra e SGC é o número de sementes germinadas do controle. A partir dos valores obtidos foram traçados gráfico comparativos entre cada tratamento e o efluente a partir do *software GraphPad Prism® 6.0*.

4.5 Bioensaios

Os bioensaios foram conduzidos no laboratório de Ecologia Química (UFAL), por meio de uma adaptação do método descrito por Lima (2020).

Foram colocados um inseto adulto e um frasco penicilina de vidro contendo a dieta, em uma câmara de vidro (9 cm de largura x 16 cm de comprimento x 9,5 cm de

altura). Como tratamento controle foi adicionada à dieta, na proporção de 1:1:8 (tris:mel:água), o Tris-HCl 50 mM pH 8,0. Para o tratamento com o extrato, fração e lectina, estes foram adicionados à dieta no lugar do Tris-HCl 50 mM pH 8,0, também na proporção de 1:1:8 (extrato:mel:água), 1:1:8 (fração 20%:mel:água) e 1:1:8 (lectina:mel:água). Foram realizadas 30 repetições com 15 fêmeas e 15 machos e foram testados os tratamentos citados na tabela 4.

Tabela 4 – Tratamentos testados nos bioensaios

	Extrato			Fração			Lectina		
Concentração (µg de proteínas/mL de dieta)	30	45	90	10	15	30	3	5	10

Fonte: autor, 2023.

Todos os testes foram realizados em sala climatizada com temperatura e umidade controladas ($24,1^{\circ}\text{C} \pm 1,2$ e $65\% \text{ UR} \pm 1,9$) e fotoperíodo invertido. A sobrevivência e a pesagem dos adultos foram avaliadas ao longo de 7 dias.

4.6 Aspectos nutricionais

Após 7 dias de avaliação, foi possível determinar o índice de deterrência (ID) através da fórmula $(\%) = 100 \times (A-B)/(A)$, onde A é a massa de alimento ingerida pelo inseto no ensaio controle, e B é a massa de alimento ingerida pelo inseto no ensaio com a amostra. Os resultados podem ser classificados como: sem deterrência alimentar ($\text{ID} < 20\%$), fraca deterrência alimentar ($20\% < \text{ID} < 50\%$), moderada deterrência alimentar ($50\% < \text{ID} < 70\%$), ou forte deterrência alimentar ($\text{ID} > 70\%$) (LIU et al., 2007).

Adicionalmente, foram avaliados os seguintes índices nutricionais: taxa de consumo relativo ($\text{TCR} = C/(D \times \text{dias})$), onde C é a massa do alimento ingerido em mg e D corresponde à biomassa inicial do inseto em mg; taxa de crescimento relativo ($\text{TCRE} = E/(D \times \text{dias})$) em que E corresponde à biomassa obtida em mg; eficiência de conversão do alimento ingerido ($\text{ECI} = E/(C \times 100)$).

4.7 Efeitos de *C. stipularia* sobre o perfil bioquímico de *C. anonella*

Após o término dos bioensaios, os níveis de proteínas, glicose, colesterol e triglicerídeos totais dos insetos que ingeriram a dieta artificial com o controle e com os

tratamentos foram avaliados com o intuito de conhecer os possíveis efeitos da ingestão do extrato. Para isto, 10 insetos adultos (5 machos e 5 fêmeas) foram macerados em 1000 μ L de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, centrifugado por 15 min a 10.000 rpm a 4°C e o sobrenadante foi coletado. A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976), enquanto que para glicose, colesterol e triglicerídeos foi utilizada a metodologia padrão dos kit's comerciais (Bioclin, Quibasa Química Básica Ltda, Belo Horizonte, BR).

4.8 Análise Estatística

Os dados foram analisados pela ANOVA a fim de analisar os pressupostos paramétricos de normalidade e homogeneidade das variâncias dos resíduos e uma vez esclarecidos foram aplicados testes de detecção de diferença significativa e comparação entre tratamentos pelo teste de *Tukey* utilizando o *software GraphPad Prism* versão 6.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Extração e fracionamento salino das sementes de *C. Stipularia*

Há na literatura trabalhos realizados utilizando-se do Tris-HCl como meio de extração proteica (PAN et al., 2010; KOOSHA et al., 2013). Assim, foi feita a extração com esse tampão e obteve-se uma boa quantificação de proteínas pelo método de Bradford com 0,93 mg/mL de proteína e uma alta atividade hemaglutinante específica (AHE) de 1101,07 conforme mostrado na tabela 5. Considerou-se os valores altos quando comparados com outros trabalhos, como Costa et al., (2018) que em seu trabalho de purificação da lectina da casca de *Genipa americana* obteve uma AHE de 640.

Com o objetivo de obter um material enriquecido com lectina, foi realizado o fracionamento proteico. Feitos todos os ciclos do fracionamento salino (0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%), a fração que apresentou maior atividade hemaglutinante específica – AHE foi a fração precipitado F0-20%, expressando atividade igual a 2314,12, maior que o extrato bruto, demonstrando a efetividade do método em concentrar lectina em uma fração pré-purificada e com menores teores de contaminantes (tabela 5). Existem outros métodos de precipitação de proteínas, porém optou-se por realizar o salino, porque o uso de solventes orgânicos pode apresentar desvantagens, como a tendência a causar danos estruturais à proteína e muitas vezes afetar a atividade da mesma, fazendo com que essa perca totalmente sua atividade ou venha a reduzi-la drasticamente (COSTA et al., 2016).

Tabela 5 – Fracionamento Salino do Extrato, Quantificação Proteica e Atividade Hemaglutinante

Amostras	Proteína total (mg/mL)	AH	AHE
Extrato	0,93	1024	1101,07
F1- F0-20% (precipitado)	1,77	4096	2314,12
F20% (sobrenadante)	0,20	-	-
F2- F20-40% (precipitado)	0,11	-	-
F40% (sobrenadante)	0,08	-	-
F3- F40-60% (precipitado)	0,15	-	-
F60% (sobrenadante)	0,09	-	-
F4- F60-80% (precipitado)	0,15	-	-
F80% (sobrenadante)	0,07	-	-

Fonte: Autor, 2023. Atividade hemaglutinante (AH) foi definida como o inverso da menor concentração capaz de produzir a rede de hemaglutinação de eritrócitos de coelho. AH específica (AHE) foi calculada como a razão entre AH e a concentração proteica (mg/mL).

5.2 Teste de inibição a carboidratos e glicoproteína com extrato das sementes de *C. Stipularia*

O teste de inibição a carboidratos com o extrato bruto permite confirmar que a atividade hemaglutinante observada mediante o teste é proveniente de lectinas e não de outros compostos como lipídios ou polifenóis, como os taninos, que muitas vezes são abundantes em tecidos vegetais e podem formar complexos solúveis ou insolúveis com proteínas ou interagir com eritrócitos por ligações não-específicas, interferindo assim com sua atividade e resultando em um falso positivo na atividade hemaglutinante (JAKOBEK, 2015).

Os ligantes testados que causaram a inibição na atividade foram a D- galactose, N-acetilglicosamina, e D-lactose, evidenciando a presença de ao menos uma lectina na amostra, que inibiu praticamente toda a atividade hemaglutinante, que antes da inibição era 2048 e passou para 2, 4 e 2 respectivamente. Os demais carboidratos testados não inibiram (NI) a atividade hemaglutinante, conforme consta na tabela 6.

Tabela 6 – Teste de inibição com carboidratos

LIGANTE	ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE
D-FRUTOSE	NI
D-RIBOSE	NI
D-GLICOSE	NI
D-ARABINOSE	NI
D-FUCOSE	NI
D-GALACTOSE	2
D-MANOSE	NI
RAMINOSE	NI
PIRANOSE	NI
GLICOPIRANOSE	NI
N-ACETILGLICOSAMINA	2
N-ACETILMONOSAMINA	NI
N-ACETILGALACTOSAMINA	NI
D-MALTOSE	NI
D-LACTOSE	4
FETUÍNA (GLICOPROTEÍNA)	NI

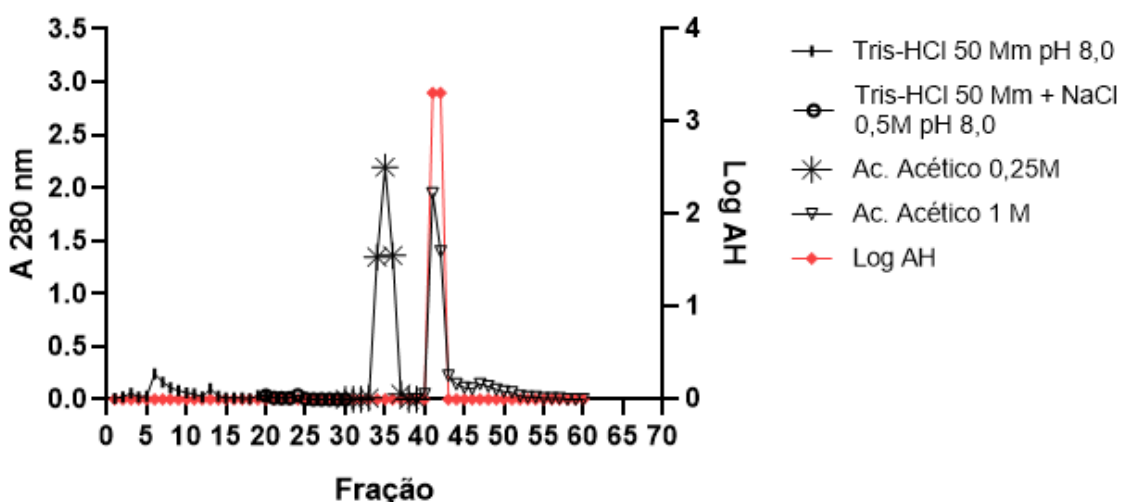
Fonte: autor, 2023. NI: não inibiu.

Outras lectinas apresentam a mesma característica quanto à especificidade ao N-acetilglicosamina. A PgTeL, extraída do fruto da *Punica granatum*, apresentou uma forte inibição em sua atividade hemaglutinante (SILVA et al., 2016). Tal propriedade norteou a escolha da matriz de quitina, composta por longas cadeias de N-acetilglicosamina, para o próximo passo, o isolamento da lectina das sementes da *C. stipularia*.

5.3 Purificação da lectina das sementes de *C. stipularia*

A lectina foi purificada com uma única etapa de cromatografia em coluna de quitina, equilibrada com Tris-HCl 50 mM pH 8,0, apresentando um único pico proteico com atividade hemaglutinante eluído com ácido acético 1,0 M, (Figura 17). As frações 41 e 42 foram submetidas ao ensaio de AH após a diálise de 2 horas em Tris-HCl 50 mM pH 8,0 apresentando uma AH de 1024, conforme descrito na tabela 7.

Figura 17 – Cromatograma de purificação da lectina de *C. stipularia*



Fonte: autor, 2023.

A tabela 7 abaixo, descreve o resumo do perfil de purificação da lectina de *C. stipularia*, onde pode ser observado sua concentração de proteína e seus valores de AH, AHE e grau de purificação. A purificação da lectina das sementes de *C. stipularia* obteve um ótimo rendimento de 100%, já que com 1,0 g de sementes de *C. stipularia* obteve-se 0,72 mg de proteína com mesma atividade hemaglutinante e atividade hemaglutinante específica mais de 5 vezes maior que a do extrato, o que leva ao alto fator de purificação.

Tabela 7 - Purificação da proteína das sementes de *C. stipularia*

Amostra	Volume (mL)	Proteínas (mg/mL)	Proteína total (mg)	AH	AHE	Fator de purificação	Rendimento (%)
Extrato	10	0,93	9,3	1024	1101	1,0	100
F-0-20%	1	1,77	1,77	4096	2314	2,1	40
Lectina	2	0,18	0,36	1024	5689	5,16	100

Fonte: autor, 2023. AHE: atividade hemaglutinante específica – relação entre AH da etapa e proteínas (mg/mL); Fator de purificação: relação entre AHE da etapa e a AHE do extrato; Rendimento: relação entre a AH total da etapa e a AH total do extrato.

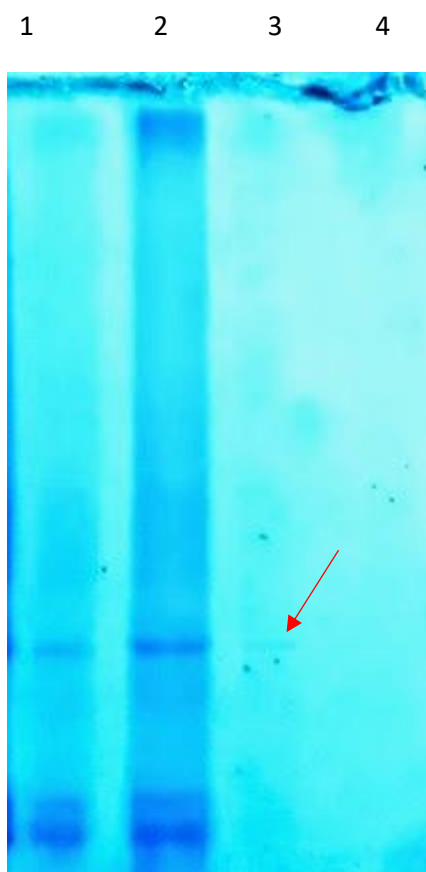
A literatura relata diversos trabalhos onde lectinas foram purificadas através de coluna de quitina como a lectina MvRL (a lectina isolada do rizoma de *Microgramma vacciniifolia*), Stell (lectina isolada da folha de *Schinus terebinthifolius*), WSMol (lectina isolada da semente de *Moringa oleífera*), entre outras (ALBUQUERQUE et al., 2012; GOMES et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2017).

A fração obtida da lectina isolada foi submetida a uma eletroforese em gel de poliacrilamida, em condição desnaturante (SDS-PAGE) e redutoras para verificar a pureza do material.

5.4 Eletroforese SDS-PAGE

Na figura 18, pode ser visualizado, da esquerda para direita, na canaleta 1 a fração 0-20% (advinda do fracionamento salino), na canaleta 2, o extrato bruto e na canaleta 3 a lectina isolada advinda do tubo 41 e na canaleta 4 não é possível visualizar nada possivelmente devido a pequena concentração de proteína presente no tubo 12. A metodologia proposta favoreceu a purificação da proteína das sementes de *C. stipularia* em um só processo cromatográfico. Tanto a amostra no tubo 41 e 42 foram tratados com β -mercaptanol, que facilita a entrada da proteína no gel devido seu poder desnaturante e redutor. Além disso a presença de uma única banda na canaleta 3, também revela uma proteína composta de uma única subunidade sem ligações dissulfeto.

Figura 18 – Gel de eletroforese SDS-PAGE 10%.



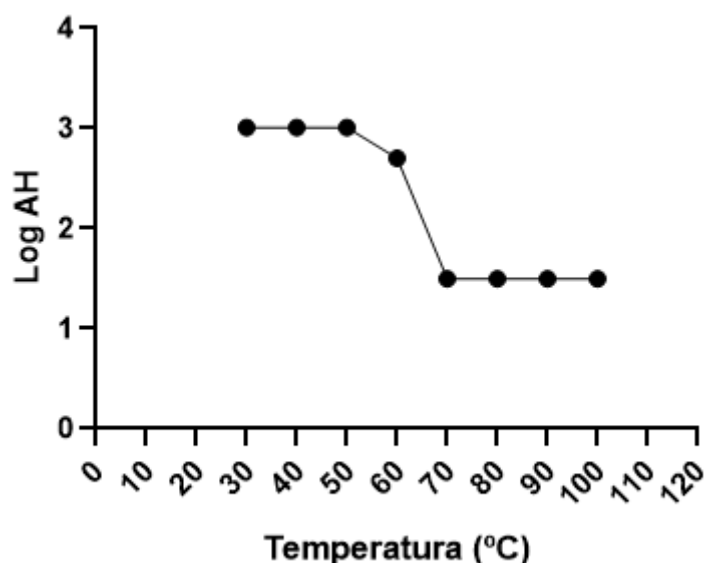
Fonte: autor, 2023. Em 1- Fração 0-20%, 2- Extrato e 3 – 41 4- 42.

5.5 Efeito da temperatura na AH em amostras da lectina de *C. stipularia*

Alguns fatores influenciam na estabilidade de uma proteína e dentre eles está a temperatura. Conhecer o perfil de fatores físico-químicos que favorece sua condição ideal permite conhecer e condicionar o meio para a manutenção e integridade da estrutura nativa e consequentemente futura aplicação biotecnológica (NELSON; COX., 2014).

A proteína das sementes de *C. stipularia* foi aquecida durante 60 minutos em faixa de temperatura de 30 a 100 °C e teve sua AH mantida até 50°C. Em seguida, perde cerca de 10% de sua atividade ao atingir 60°C, perde cerca de 50% de sua atividade na temperatura de 80°C e a partir desta temperatura se mantém estável até 100°C, como pode ser observado na figura 19.

Figura 19 – Efeito da temperatura na AH



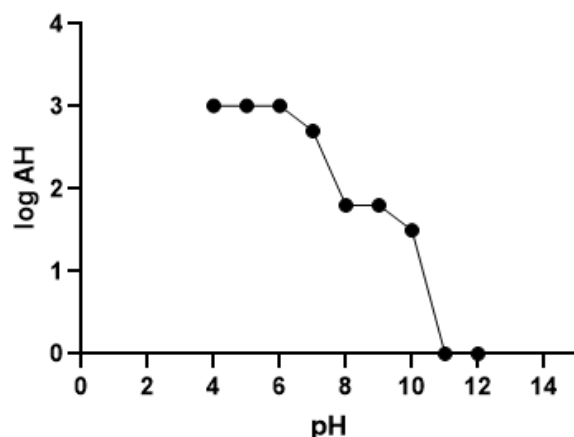
Fonte: autor, 2013. As amostras foram incubadas por 60 minutos.

A Lectina isolada de sementes de *Centrolobium microchaete*, a lectina purificada de sementes de *Platypodium elegans* e a lectina de *Punica granatum L.* (PgTeL), diminuíram suas atividades a 80°C (SILVA, et al., 2015, VASCONCELOS-FILHO et al., 2015. ARARIPE et al., 2017). Alguns trabalhos descritos na literatura mostram lectinas que mantiveram a atividade hemaglutinante mesmo ao serem submetidas a temperatura de 100°C, a exemplo da lectina CNA, isolada de sementes de *Clathrotropis nítida* (ALVES et al., 2015), também a CasuL, uma lectina isolada de *Calliandra surinamensis*, que foi estável em uma faixa de temperatura bem ampla, quando submetidas a temperatura de até 100°C (PROCÓPIO, et al., 2017) e GaBL, a lectina extraída da casca de *Genipa americana* que manteve sua AH inalterada até 70°C e apresentando uma pequena queda entre 80 -120°C (COSTA et al., 2018).

5.6 Efeito do pH na AH em amostras da lectina de *C. stipularia*

Análises buscando o ambiente com pH mais adequado para a lectina das sementes de *C. stipularia* mostraram que após a diálise de 2 horas foi mantida a atividade hemaglutinante nos pHs entre 4-6, havendo uma redução de aproximadamente 40% ao ser exposta ao pH 8 e perdendo atividade ao ser dialisada em solução na faixa de pH igual ou maior que 11 como pode ser visualizado na figura 20.

Figura 20 – Efeito do pH na AH da lectina de *C. stipularia*



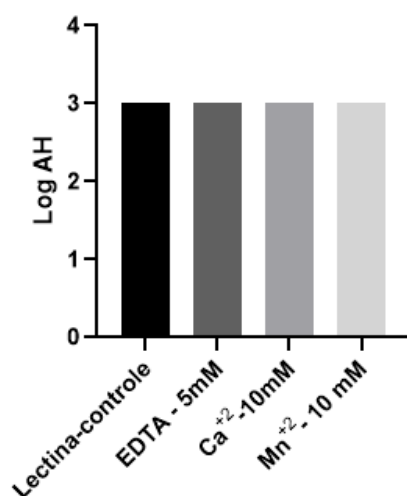
Fonte: autor, 2023.

A literatura relata resultados similares para a lectina extraída da raiz da *Portulaca elatior* (PeRoL) e para a lectina extraída de sementes de *Dioclea reflexa* Hook (Drfl) que apresentaram atividade hemaglutinante em meios ácido e ligeiramente básico (SILVA et al., 2019; PINTO JUNIOR et al., 2017).

5.7 Efeito do EDTA e íons divalentes na AH

Após a exposição da lectina das sementes de *C. stipularia* ao EDTA e íons metálicos foi possível evidenciar que não houve redução da atividade hemaglutinante (Figura 21).

Figura 21 – Efeito de íons na AH da lectina de *C. stipularia*



Fonte: autor, 2023.

Algumas lectinas apresentam sua atividade influenciada por grupos prostéticos como cátions (Mn^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+}). O EDTA pode quelar esses cátions presentes em suas estruturas. Tal resultado sugere que a proteína em estudo não necessita de íons divalentes para sua atividade, ou provavelmente eles estão fortemente ligados a proteína e a diálise com EDTA não foi capaz de interferir na estrutura proteica, sendo quelada por esses íons (SANTIAGO et al., 2014).

Outras lectinas como GaBL e JamuLL também não tiveram sua atividade hemaglutinante alterada na presença de EDTA e íons (COSTA et al., 2018; SANTOS, 2020).

A avaliação de fatores como pH, temperatura e dependência de íons são muito importantes para a possível aplicação biotecnológica do produto, visto que o mesmo precisa ser estável a uma variação de temperatura (30-40°C), e é preferível que possa talvez ser diluída em outros solventes, para a possível aplicação em campo.

5.8 Resultados das Análises Fitoquímicas Feitas a partir do Extrato das Sementes Secas de *C. stipularia*

5.8.1 Conteúdo fenólico total

O teor de fenólicos no extrato aquoso das sementes secas de *C. stipularia* foi 7,05 µg EAG/g da amostra bruta.

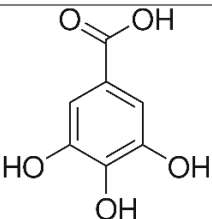
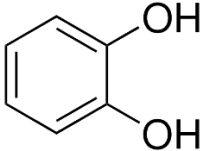
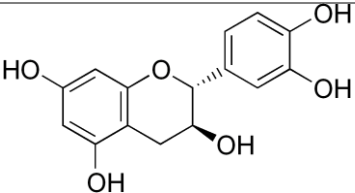
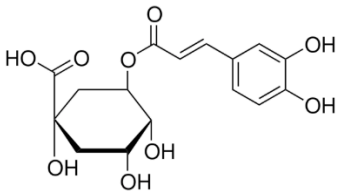
Investigações para a identificação e caracterização de compostos ativos de plantas podem levar a uma melhor compreensão de seus mecanismos de ação a fim de contribuir para um melhor aproveitamento dos mesmos sozinhos ou em combinação com outros extratos naturais para diferentes atividades biológicas (QUATTRUCCI et al., 2013). O presente estudo investigou o teor de compostos fenólicos totais através dosagem de fenóis usando ácido gálico como padrão, que é conhecido por apresentar efeitos antibacterianos (ARULMOZHI; MIRUNALINI, 2010) (QUATTRUCCI et al., 2013). Como o presente estudo avalia a mortalidade dos insetos *C. anonella* alimentados com o extrato bruto das sementes de *C. stipularia*, através do mecanismo de ingestão alimentar, um composto antimicrobiano em tese poderia causar danos à flora bacteriana do inseto, sendo assim uma possível causa de sua mortalidade (NAPOLEÃO et al., 2011).

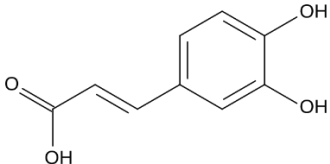
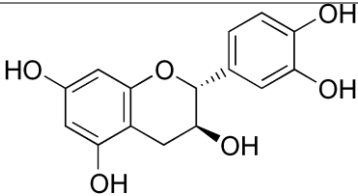
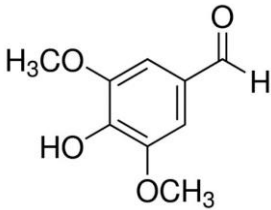
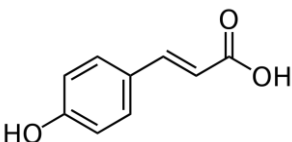
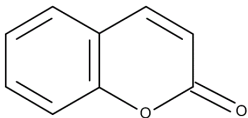
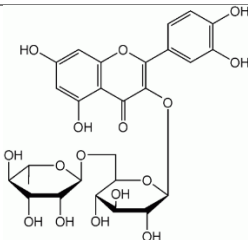
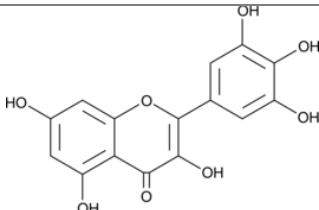
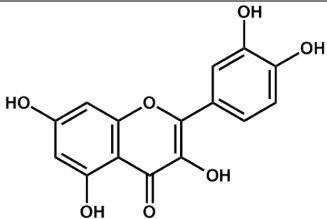
5.8.2 Perfil fitoquímico obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Em trabalho anterior, Chicuta (2019) realizou uma análise qualitativa dos metabólitos secundários presentes no extrato das sementes de *C. stipularia* onde foram encontrados flavonas, flavonóis, xantonas e saponinas entre os compostos fitoquímicos analisados. A partir daí uma análise quantitativa foi realizada através de uma cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com o objetivo de identificar compostos presentes no extrato com base na comparação dos tempos de retenção dos padrões utilizados (tabela 8) (Figura 22A).

Foi possível identificar os seguintes compostos: o ácido clorogênico (2,8642 mg/kg) e o siringaldeído (0,2763 mg/kg). Também pode-se perceber no cromatograma alguns picos na região do tempo de retenção dos padrões 10, 11 e 12, porém não houve correspondência com esses padrões (Comparando Figura 22A e 22B).

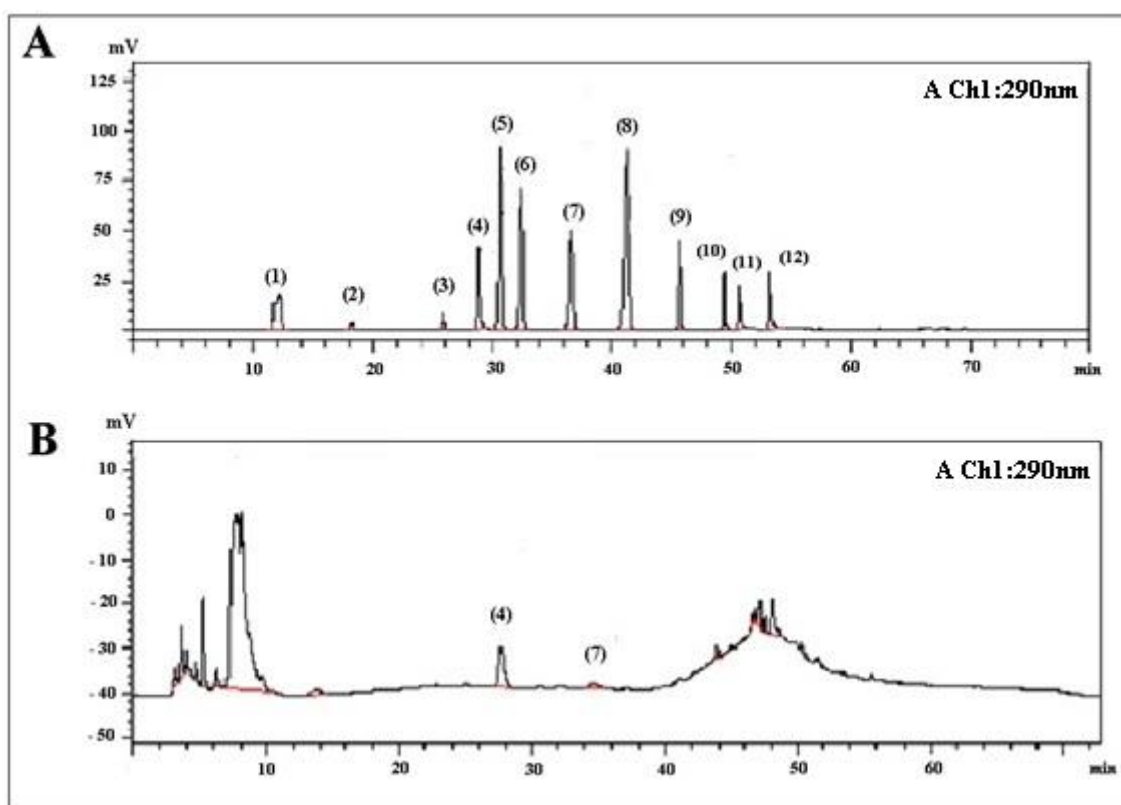
Tabela 8 – Padrões utilizados na análise

Padrões	Estrutura Química	Tempos de Retenção (min)
1-ácido gálico		12.182
2- catecol		18.195
3- catequina		25.892
4- ácido clorogênico		28.831

5- ácido cafeico		30.652
6-catequina		32.397
7- Siringaldeído		36.588
8- Ácido cumárico		41.251
9- Cumarina		45.643
10- Rutina		49.404
11- Miricetina		50.662
12- Quercetina		53.186

Fonte: autor, 2023.

Figura 22 – Cromatograma obtido da análise por HPLC. Curva com a mistura de padrões: 1-ácido gálico, 2- catecol, 3- catequina, 4- ácido clorogênico, 5- ácido cafeico, 6- catequina, 7- Siringaldeído, 8- Ácido cumárico, 9- Cumarina, 10- Rutina, 11- Miricetina, 12- Quercetina (A). Curva com os compostos identificados: 4- ácido clorogênico e 7- Siringaldeído, como presentes no extrato das sementes de *C. stipularia* (B).



Fonte: autor, 2023.

O ácido clorogênico é um metabólito secundário classificado como polifenólico, já que é um conjugado do ácido cafeico e do ácido quínico. Esse composto mostrou-se um agente de defesa em plantas que fornece proteção contra diferentes patógenos (SUNG & LEE 2010; WOJCIECHOWSKA et al., 2014; MARTINEZ et al., 2017). Além disso, o ácido clorogênico também mostrou ter atividade anti-herbívora de amplo espectro (ELLIGER et al., 1981; LEISS et al., 2009; LEE et al., 2017; LIU et al., 2017), particularmente em batata, tomate e berinjela (NIGGEWEG et al., 2004), embora outras espécies de plantas, incluindo chás, feijão verde, café, cacau, frutas cítricas, maçãs e peras, também produzam este metabólito (NAVEED et al., 2018). Além disso, Lin et al., (2022) alimentou a lagarta oriental *Mythimna separata* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) com diferentes concentrações de ácido clorogênico em dietas artificiais e

encontrou um efeito letal significativo e a mortalidade aumentou com o aumento da concentração, observando também efeitos subletais, como a taxa de pupação, taxa de eclosão, razão sexual e quantidade de oviposição no grupo tratado com ácido clorogênico que foram significativamente menores do que aqueles do grupo controle.

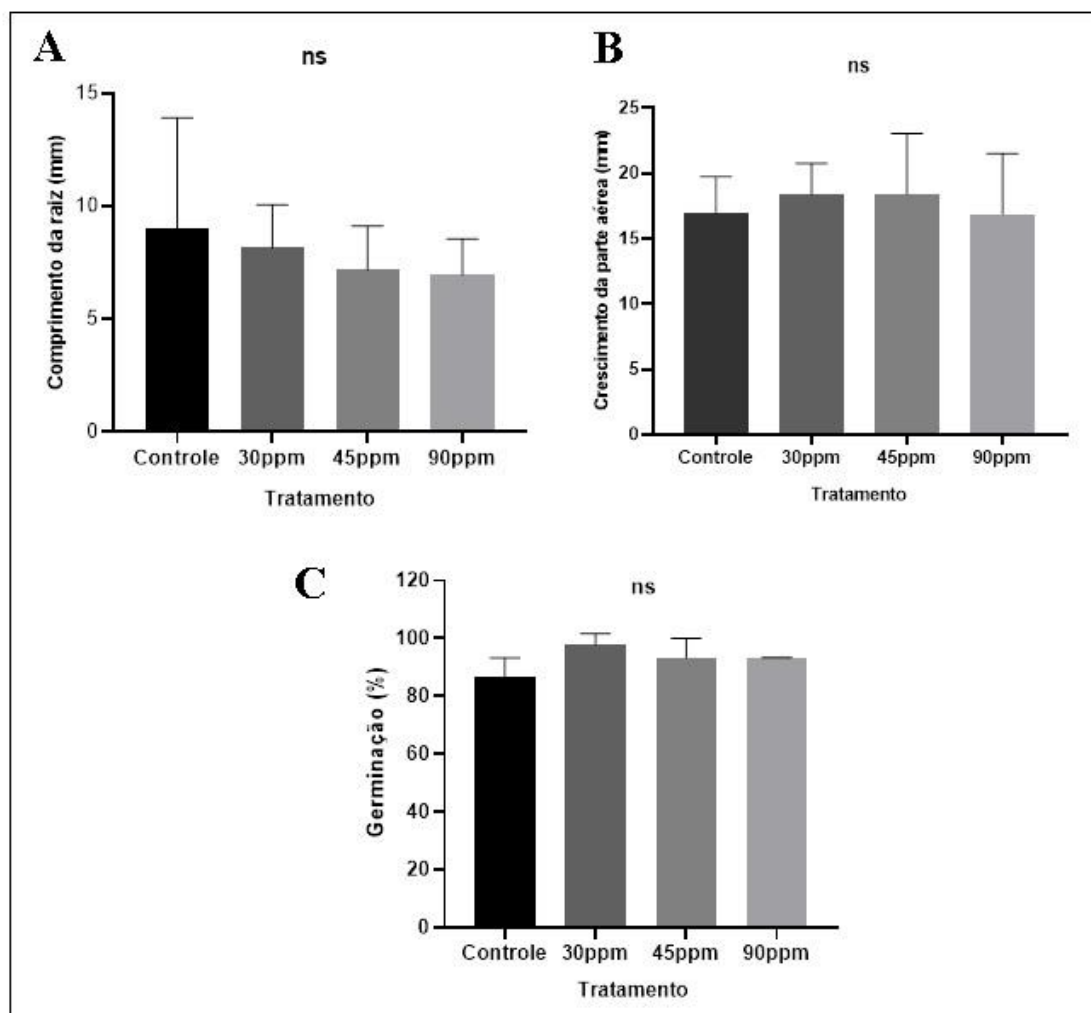
Já o seringaldeído ou 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldeído é um composto orgânico aromático do grupo dos compostos fenólicos. É um derivado do benzaldeído que carrega um grupo metoxi na posição para e dois grupos hidroxila fenólicos em cada uma das posições meta, (ALDRICH, 2023.).

Ele ocorre naturalmente na natureza, muito descrito na literatura como presente em madeira e alguns insetos o utilizam como sistema de comunicação química, como por exemplo o besouro *Scolytus multistriatus* (Coleoptera: Scolytidae) que provavelmente se guie por esse composto buscando substratos para a oviposição e, posteriormente, para o desenvolvimento da prole (MEYER & NORRIS, 1967). Outros testes podem ser feitos com o objetivo de avaliar se o composto poderia atrair *C. anonella* para uma possível armadilha com a isca alimentar. Contudo, existem relatos na literatura, como o trabalho de Tavares (2021), que trazem a identificação de compostos atraentes para machos e fêmeas deste inseto, que poderiam ser usados em conjunto com a isca alimentar aqui proposta.

5.9 Resultado da avaliação de toxicidade frente a *L. sativa*

Mediante a avaliação da germinação e crescimento de hipocótilos e radículas de *L.sativa* foi possível evidenciar que não foi gerado um ambiente tóxico já que não foi constatada diferença significativa na análise de germinação das sementes, crescimento das raízes de alface ao ser exposto aos meio de cultivo, tampão e diferentes concentrações do extrato das semente *C. stipularia* ao longo do bioensaio (Figura 23).

Figura 23 – Média do crescimento da raiz (A) média do crescimento da parte aérea (B) e média da germinação (C) de *L. sativa* exposta a diferentes concentrações de extrato aquoso das sementes de *C. stipularia*.



Fonte: autor, 2023.

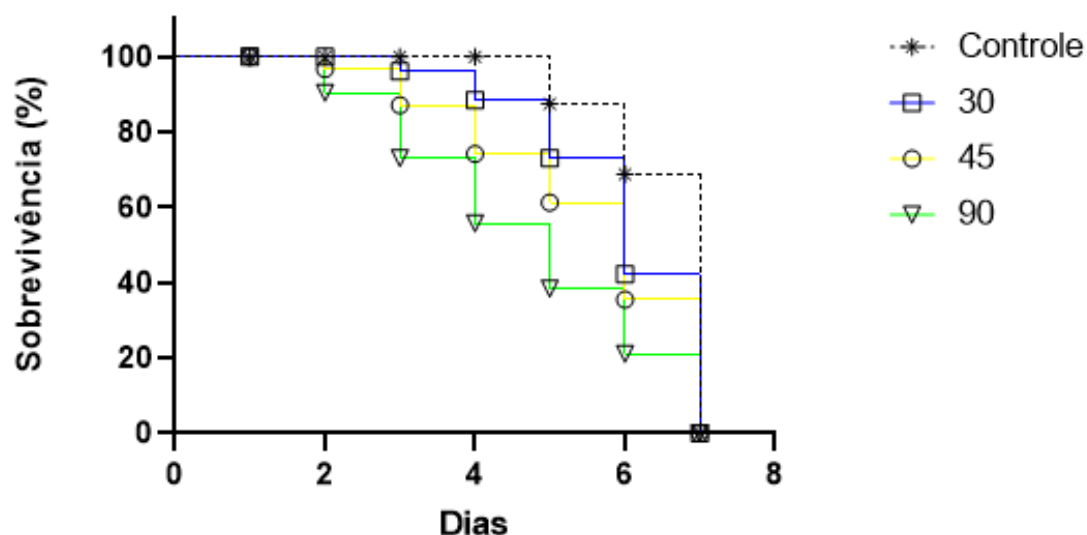
Resultados semelhantes foram obtidos quando analisado o extrato aquoso da folha da espécie de bambu *Dendrocalamus giganteus* Munru mostrando que não há interferência do bambu gigante sobre o desenvolvimento da semente de *L. Sativa* (SCHULZ, et al., 2010). Barros (2022), também testou a toxicidade do extrato aquoso do colmo do bambu frente a *L. Sativa* e obteve os mesmos resultados.

Essa análise é importante para um futuro uso do extrato como bioinseticida podendo ser usado pulverizando plantações ou em armadilhas sendo usado em conjunto com um atraente.

5.10 Resultados dos Bioensaios com o Extrato das Sementes de *C. stipularia*

A ingestão do extrato aquoso de *C. stipularia* pelos insetos adultos de *C. anonella* resultou na mortalidade de 50% dos insetos na concentração de 90 µg de proteína/mL de dieta ao passar de 3 dias de experimento enquanto que no controle todos os insetos permaneceram vivos nesse mesmo tempo, como pode ser visto na figura 24. As concentrações de 30 e 45 (µg de proteína/mL de dieta) também causaram a mortalidade dos insetos, mas em menor proporção, demonstrando um efeito dose resposta.

Figura 24 – Sobrevivência dos insetos adultos de *C. anonella* tratados com diferentes concentrações de extrato das sementes de *C. stipularia* expressos pela curva de Kaplan-Meier.



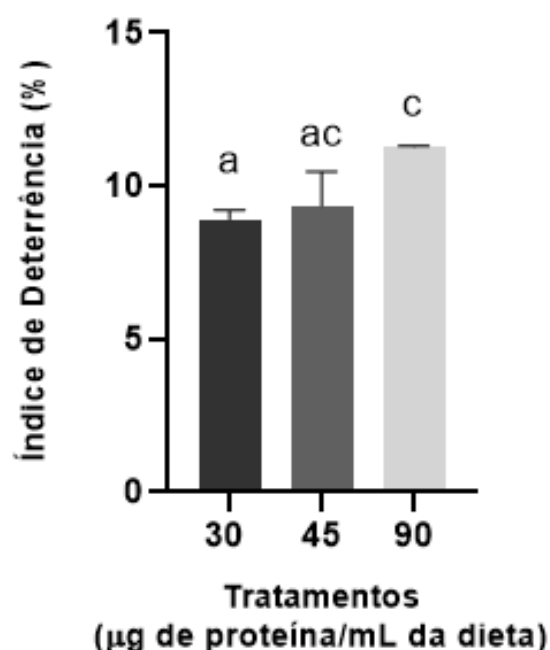
Fonte: autor, 2023.

Muitos estudos utilizam o bioensaio através do mecanismo de ingestão alimentar para avaliação da sobrevivência/mortalidade de diversas classes de insetos. Por exemplo, Napoleão et al. (2013) utilizou a mesma metodologia ao testar o extrato e a lectina de *Myracrodruon urundeuva* contra *Sitophilus zeamais*. No extrato de folhas *M. urundeuva* a concentração de 10 mg de proteína/g de dieta promoveu uma taxa de mortalidade de 14,3% em 7 dias. Lima et al (2020) também testou o extrato aquoso da casca de *Genipa americana* contra um inseto da ordem Coleoptera (*Tribolium castaneum*) obtendo também resultados promissores.

No entanto poucos artigos relatam bioensaios com o objetivo fim de controlar *Cerconota anonella*. Brito (2010) testou o efeito bioinseticida por meio da pulverização de extratos aquosos de *Piper cf. aduncun*, do pedúnculo do botão floral do craveiro-da-índia (*Syzygium aromaticum*), e do óleo emulsionável a base de nim (Neemseto©) sobre lagartas de *C. anonella* em laboratório. O uso do extrato aquoso de *P. cf. aduncun* resultou na mortalidade de 3,0% das lagartas, enquanto a aplicação do tratamento com o pedúnculo do botão floral do craveiro-da-índia ocasionou a morte de 10,71%, e 17,86% quando tratado com óleo emulsionável a base de nim após 12 horas de aplicação. Através desse resultado, percebe-se o quão promissor é o extrato testado neste trabalho.

Para compreender os mecanismos que levaram à mortalidade de *C. anonella* frente ao extrato, foram avaliados a deterência alimentar e os parâmetros nutricionais. O extrato de *C. stipularia* apresentou índices de deterência de aproximadamente 10%-11% para as concentrações testadas que quase não diferem do controle (Figura 25). Logo, o extrato de *C. stipularia* não é classificado como deterrente por estar abaixo de 20% de acordo com LIU et al (2007).

Figura 25 – Índice de deterência dos insetos adultos de *C. anonella* tratados com diferentes concentrações de extrato das sementes de *C. stipularia*

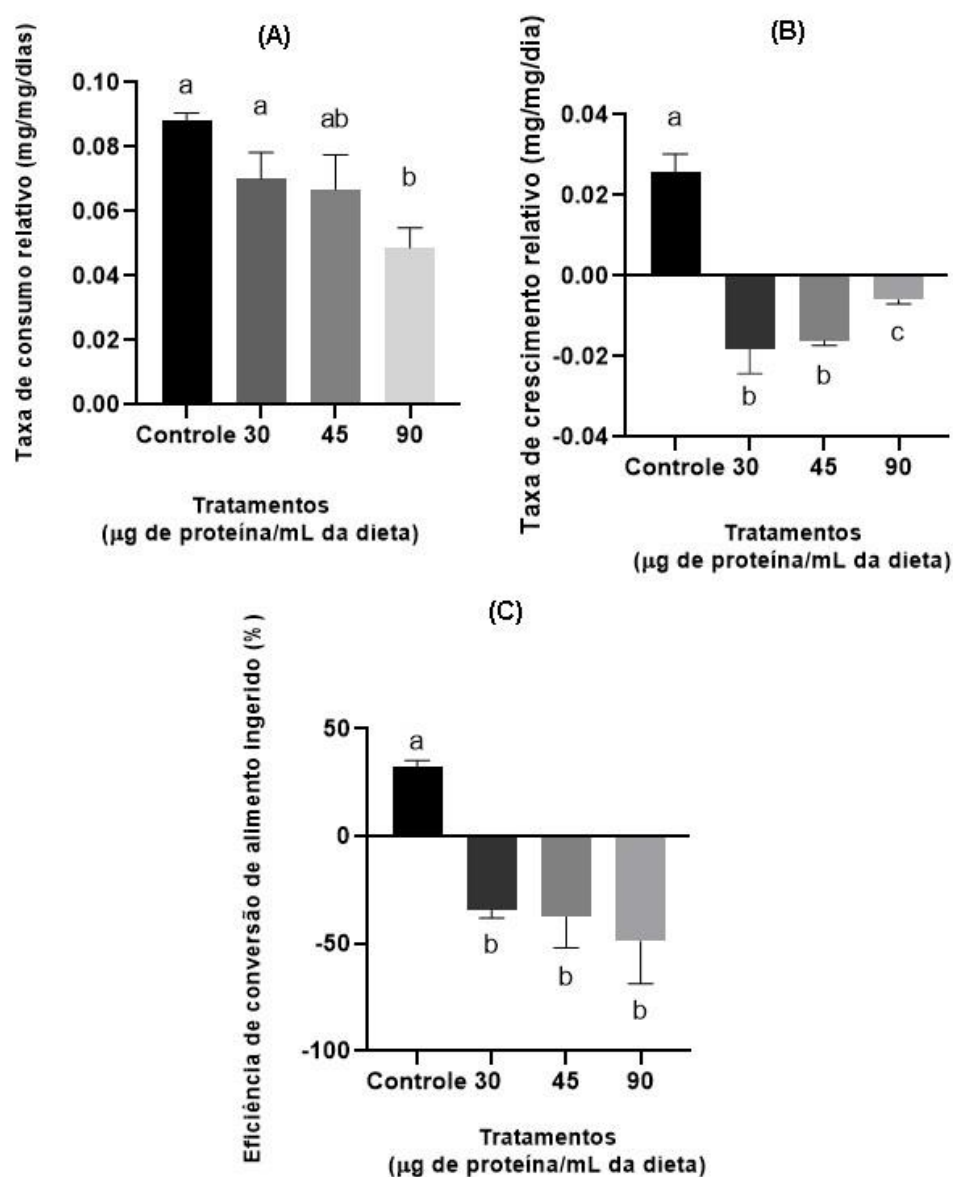


Fonte: autor, 2023. Cada barra corresponde à média $\pm$ DP de 30 repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos pelo teste de Tukey.

Já que a deterrência não se mostrou relevante para justificar a mortalidade apresentada pelo extrato, foi feita a análise dos parâmetros nutricionais de adultos de *C. anonella* que evidenciou os efeitos deletérios causados pela ingestão do extrato. A taxa de consumo relativo (Figura 26A) apresentou pouca diferença significativa entre os tratamentos, isso significa que a quantidade de dieta artificial consumida foi semelhante, corroborando com a ausência do efeito deterrente. Apesar disto, a taxa de crescimento relativo foi significativamente menor do que no tratamento controle. Os valores negativos apresentados em (B) e (C) da figura 26 para as três concentrações diferentes apontam que os insetos, além de perderem peso, não foram capazes de converter o alimento em biomassa.

À medida que a concentração do extrato foi aumentando na dieta artificial, menos os insetos cresceram, comprovando o potencial antinutricional de *C. stipularia* sobre os insetos adultos de *C. anonella*. Napoleão et al., (2013) e Camaroti et al (2018) também obtiveram resultados semelhantes quando serviram em dieta artificial extrato de *Myracrodruon urundeuva* e *Schinus terebinthifolius*, ao besouro *S. zeamais* e relatam que o extrato pode danificar os processos de digestão e absorção de nutrientes o que induziria os insetos a metabolizarem suas reservas corporais para sua sobrevivência, o que leva a perda de peso. A presença do ácido clorogênico no extrato de *C. stipularia* pode estar associado a esse efeito, já que como já foi citado anteriormente, uma espécie de lepidóptera foi tratada com esse composto fenólico e sofreu consequências semelhantes.

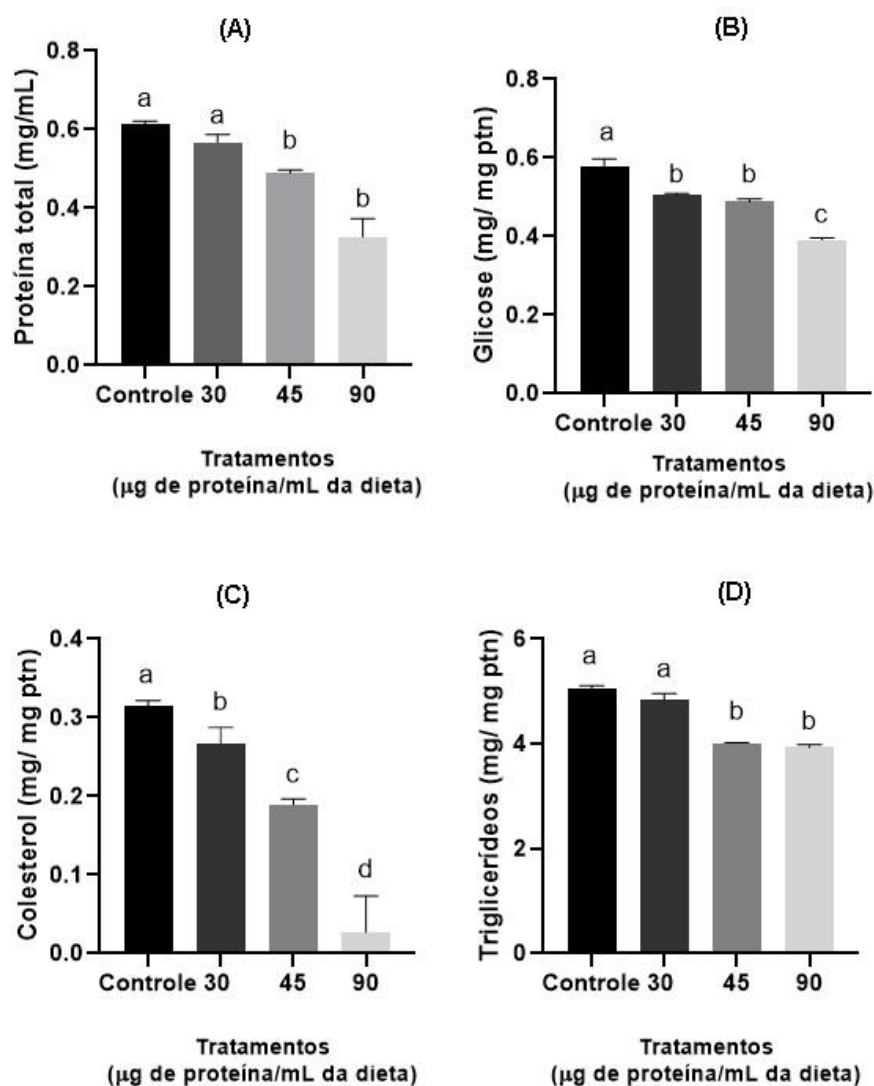
Figura 26 – Taxa de consumo relativo (A), taxa de crescimento relativo (B) e eficiência em conversão do alimento ingerido (C) dos insetos adultos de *C. anonella* tratados com diferentes concentrações de extrato das sementes de *C. stipularia*.



Fonte: autor, 2023. Cada barra corresponde à média $\pm$ DP de 30 repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos pelo teste de Tukey.

A fim de conhecer os possíveis efeitos bioquímicos da ingestão do extrato de *C. stipularia* nos insetos de *C. anonella*, foram avaliados os níveis de proteínas totais, glicose, colesterol e triglicerídeos dos insetos mortos após o término do bioensaio, como descrito no item 4.6. A figura 27, mostra que todas as concentrações testadas foram capazes de provocar uma mudança nas taxas, diminuindo estatisticamente ($p < 0,05$) em relação ao controle a quantidade de proteínas totais, colesterol, triglicerídeos e glicose.

Figura 27 – Perfil bioquímico do abdômen de adultos de *C. anonella* mantidos em dietas artificiais preparadas em Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (controle) ou com extrato sementes de *C. stipularia* em diferentes concentrações. (A) Proteínas totais em mg/mL; (B) glicose em mg/ mg de proteína (C) colesterol em mg/mg de proteína; (D) triglicerídeos em mg/ mg de proteína.



Fonte: autor, 2023. Cada barra corresponde à média $\pm$ DP de 4 repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos pelo teste de Tukey.

Glicogênio e triglicerídeos constituem reservas energéticas em células animais. A glicose é armazenada em forma polimérica, glicogênio. Ácidos graxos armazenados como triglicerídeos podem ser usados para produção de energia através de β -oxidação. Reservas de gordura são mais empregadas pelos insetos para atender a demanda de

energia, para fornecer energia para o embrião em desenvolvimento, e para alimentá-los durante períodos prolongados de vôo. Armazenamento de ácidos graxos e glicose é essencial em insetos para outras funções também. Ácidos graxos servem como precursores na síntese de eicosanóides e feromônios. Da mesma forma, a glicose é usada para a síntese de quitina, um dos principais componentes da cutícula, e para a síntese de álcoois de açúcar, que são necessários para a adaptação a frio ou seca (ARRESE; SOULAGES, 2010).

Na literatura, poucos trabalhos relatam como funciona o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas em insetos lepidópteros. Kozhantshikov (1938) investigou a importância dos carboidratos e das gorduras no metabolismo de lepidópteros adultos concluindo que a dieta dos lepidópteros adultos, com algumas exceções, é constituída principalmente por carboidratos, e que o teor de glicogênio e açúcares solúveis nesses insetos é geralmente baixo. Seu estudo concentrou-se em três espécies de lepidópteros: *Agrotis segetum* (Denis & Schiffermüller, 1775) (Lepidoptera: Noctuidae), *Pyrausta nubilalis* (Poos, 1927) (Lepidoptera: Crambidae) e *Loxostege sticticalis* (Linnaeus, 1761) (Lepidoptera: Crambidae). O autor mediu o consumo de açúcar e analisou as fezes para determinar a quantidade de açúcar utilizada. O teor de gordura também foi avaliado por meio de métodos específicos.

Os resultados mostraram que as fêmeas recém-emergidas de ambas as espécies apresentam alto teor de gordura e baixo teor de açúcar. O consumo de açúcar influenciou o ganho de peso e a longevidade das fêmeas, bem como a produção de ovos. As fêmeas alimentadas com soluções de glicose de alta concentração apresentaram um aumento na longevidade e na fecundidade, enquanto as fêmeas que passaram fome ou alimentadas apenas com água apresentaram uma diminuição significativa na produção de ovos e na viabilidade embrionária. O trabalho concluiu que o metabolismo dos carboidratos nos lepidópteros adultos é altamente especializado, com rápida transformação dos carboidratos em gordura, essa especialização é biologicamente importante, pois a gordura é utilizada para a formação da prole, conectando diretamente a nutrição de carboidratos com a fertilidade.

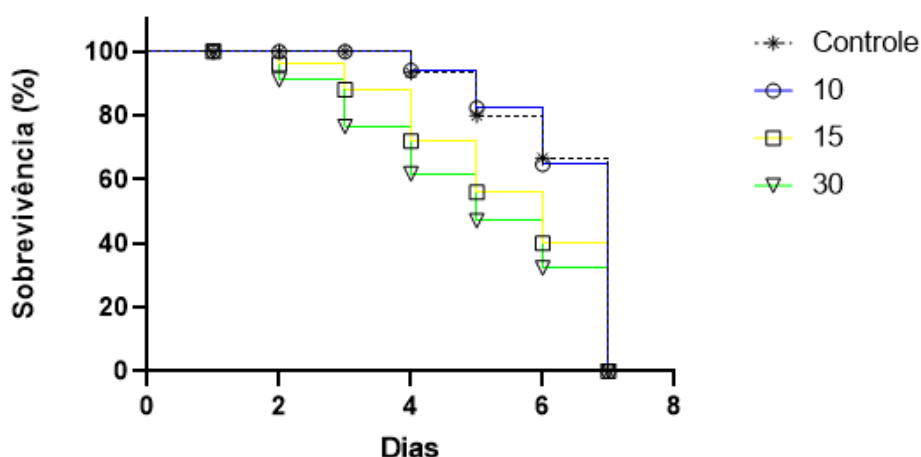
Mediante o exposto e comparando-se com os nossos dados, percebemos que uma desestabilização do metabolismo, como a que foi causada pela diminuição de todo perfil bioquímico (proteínas, colesterol, glicose e triglicerídeos) dos insetos tratados pelo

extrato das sementes secas de *C. stipularia*, pode ter sido a causa da mortalidade dos insetos tratados.

5.11 Resultados dos Bioensaios com a Fração 20% das sementes de *C. stipularia* sobre os insetos adultos de *C. anonella*

De maneira semelhante a que ocorreu com o extrato, a ingestão da fração 0-20% de *C. stipularia* pelos insetos adultos de *C. anonella*, resultou na mortalidade dos insetos, no entanto, em menor proporção. Quando comparado com o controle, as concentrações de 30 e 15 (μg de proteína/mL de dieta) causaram a mortalidade de 40% e 30% dos insetos, respectivamente, no quarto dia de bioensaio, como pode ser visto na figura 28.

Figura 28 – Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de adultos de *C. anonella* mantidas em dieta artificial com diferentes doses da fração proteica (0-20%) das sementes de *C. stipularia*.



Fonte: autor, 2023.

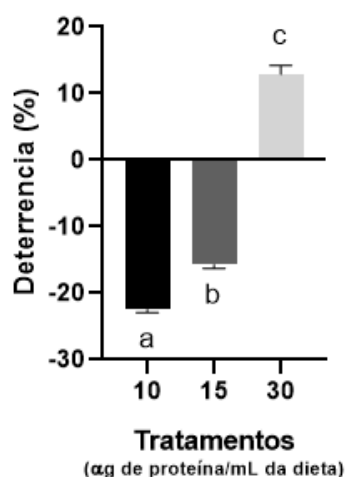
A menor mortalidade dos insetos quando comparado com o extrato, pode ser explicada pelo efeito sinérgico que poderia haver entre os metabolitos secundários presentes no extrato e eliminado pelo fracionamento salino, com as proteínas concentradas através do mesmo.

Santos et al., (2023) é um dos poucos relatos na literatura que relata a investigação inseticida de fração enriquecida de lectina. Os autores avaliaram a suscetibilidade de larvas e adultos de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) ao extrato salino, fração rica em lectina e lectina isolada (MvRL) de rizomas de *Microgramma vacciniifolia* e observou que os tratamentos apresentados aos

insetos em dieta artificial, mostraram efeito larvívica imediato, mas não tiveram efeito na sobrevivência dos adultos. Os autores também avaliaram a influência dessas preparações em enzimas importantes dos insetos e perceberam que a fração enriquecida se destacou inibindo as enzimas digestivas tripsina e amilase. Pretende-se, em experimentos posteriores, realizar esses experimentos.

Assim como no extrato, também foram calculados a porcentagem de deterência alimentar, os parâmetros nutricionais e o perfil bioquímico da fração a fim de investigar os possíveis efeitos da ingestão da fração proteica testada. De fato, o cálculo de deterência alimentar não revelou efeito deterrente nas concentrações de 10 e 15 (μg de proteína/mL de dieta). Apenas a concentração de 30 μg de proteína/mL de dieta apresentou-se fracamente deterrente, os valores negativos das menores concentrações revelam que os insetos se alimentaram da dieta mais que o controle (Figura 29). Como a concentração de 15 μg de proteína/mL de dieta, foi uma das que mais provocou a mortalidade dos insetos como demonstrado anteriormente, sugere-se que a mortalidade observada foi causada por algum componente ingerido pelos insetos.

Figura 29 – Índice de deterência dos insetos adultos de *C. anonella* tratados com diferentes concentrações da fração 0-20% das sementes de *C. stipularia*

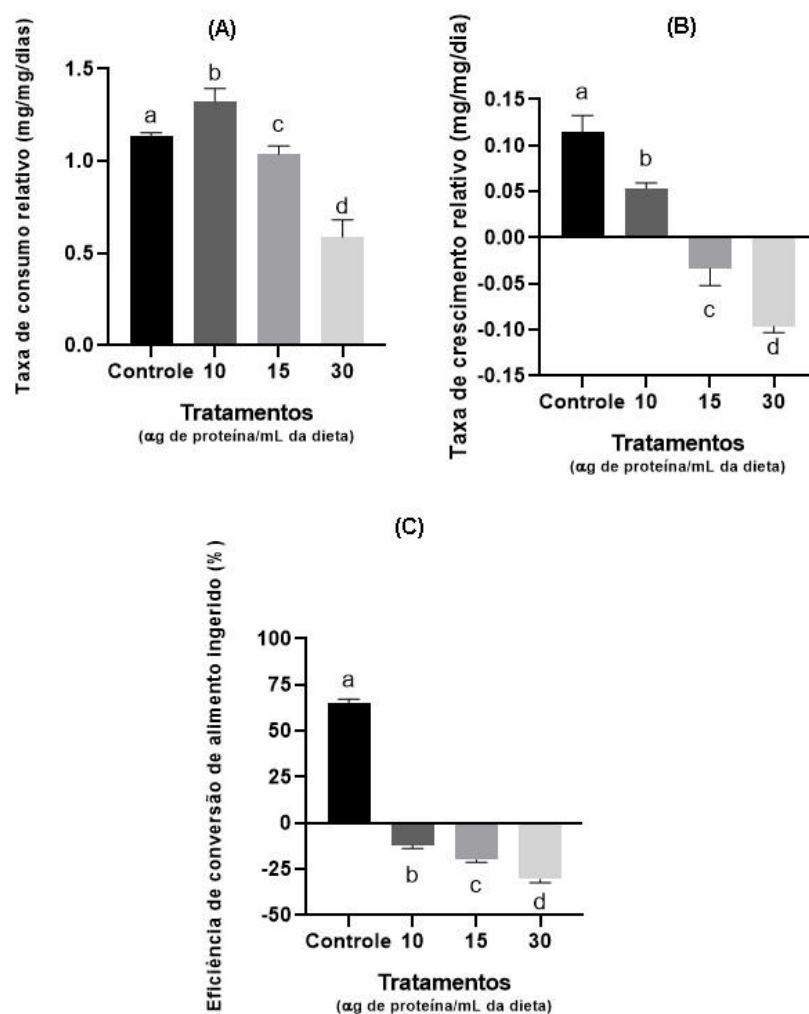


Fonte: autor, 2023. Cada barra corresponde à média $\pm$ DP de 30 repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos pelo teste de Tukey.

Os resultados dos parâmetros nutricionais mostrados na figura 30, corroboram com os resultados apresentados até aqui, já que a taxa de consumo relativo mostrado na figura 30A demonstra o aumento do consumo dos insetos que ingeriram as doses de 10 e 15 μg de proteína/mL enquanto que a concentração de 30 μg de proteína/mL foi pouco ingerida pelos insetos, em relação ao controle. A ingestão da fração resultou na

diminuição do crescimento, como mostrado na figura 30B. Os dados sobre a eficiência da conversão do alimento ingerido estão de acordo com a perda de biomassa dos insetos, pois os valores de conversão alimentar também foram negativos para os tratamentos (Figura 30C).

Figura 30 – Parâmetros nutricionais dos insetos adultos de *C. anonella* tratados com a fração 0-20% de *C. stipularia*. Taxa de consumo relativo (A), taxa de crescimento relativo (B) e eficiência em conversão do alimento ingerido (C).

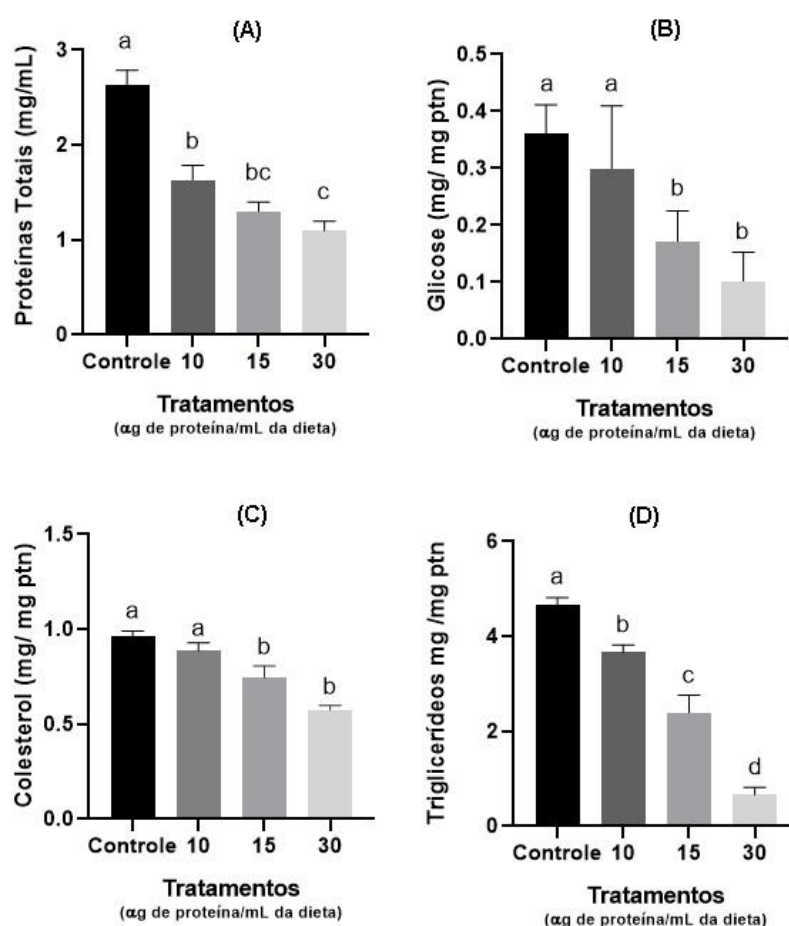


Fonte: autor, 2023. Cada barra corresponde à média $\pm$ DP de 30 repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos pelo teste de Tukey.

Chicuta (2019) testou a fração enriquecida de *C. stipularia* contra *Tribolium castaneum* e obteve resultados semelhantes. Revelando que mesmo eliminando a maior concentração de metabólitos secundários os efeitos sobre os parâmetros nutricionais continuam relevantes para o controle da praga.

Semelhantemente ao que foi feito com o extrato, a fim de conhecer os possíveis efeitos bioquímicos da ingestão da fração 20% de *C. stipularia* nos insetos de *C. anonella*, foram avaliados os níveis de proteínas totais, glicose, colesterol e triglicerídeos dos insetos após o término do bioensaio. Percebemos através da figura 31, uma redução significativa em todas as taxas avaliadas ($p < 0,05$) em relação ao controle, causando uma desestabilização praticamente total no metabolismo desses insetos na presença da preparação enriquecida de proteínas de *C. stipularia*.

Figura 31 – Perfil bioquímico do abdômen de adultos de *C. anonella* mantidos em dietas artificiais preparadas em Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (controle) ou com a fração 0-20% das sementes de *C. stipularia* em diferentes concentrações. (A) Proteínas totais em mg/mL; (B) glicose em mg/ mg de proteína (C) colesterol em mg/mg de proteína; (D) triglicerídeos em mg/ mg de proteína.



Fonte: autor, 2023. Cada barra corresponde à média $\pm$ DP de 4 repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos pelo teste de Tukey.

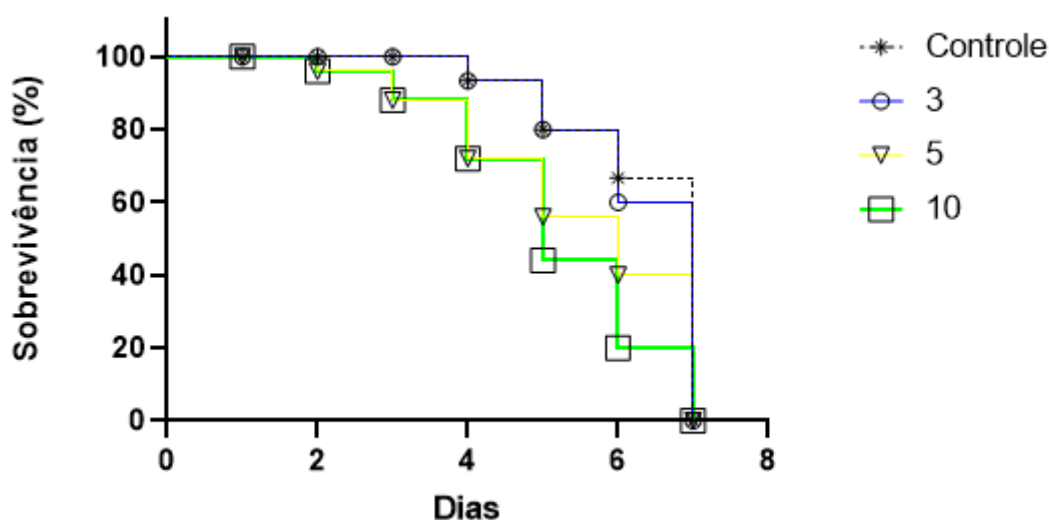
Outros testes precisam ser realizados, como por exemplo testes com enzimas digestivas do inseto, para tentar esclarecer os motivos para tal desestabilização.

5.12 Resultados dos Bioensaios com a lectina das sementes de *C. stipularia* sobre os insetos adultos de *C. anonella*

Com o objetivo de avaliar se a lectina das sementes de *C. stipularia* causaria a mortalidade dos insetos adultos de *C. anonella*, após os 7 dias de experimento, para o seu futuro uso no melhoramento de plantas, a mesma foi adicionada em diferentes concentrações (3, 5 e 10 µg de proteínas/mL) na dieta artificial de *C. anonella*

Observou-se neste bioensaio que as concentrações de 5 e 10 µg de proteínas/mL após 4 dias de experimento causaram 30% da mortalidade dos insetos e no 5º dia de experimento essa mortalidade chegou a aproximadamente 50%.

Figura 32 – Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de adultos de *C. anonella* mantidas em dieta artificial com diferentes doses da lectina das sementes de *C. stipularia*.



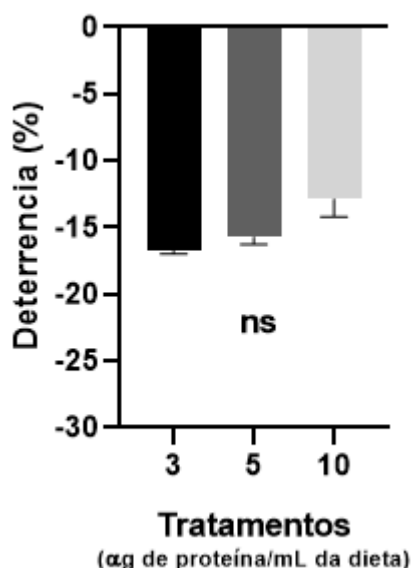
Fonte: autor, 2023.

A lectina de *Galanthus nivalis* (GNA) expressa em cana-de-açúcar transgênica provocou a redução da sobrevivência dos insetos adultos das espécies *Eoreuma loftini* (Dyar: 1917) (Lepidoptera: Crambidae) e *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Pyralidae) (SÉTAMOU et al., 2002).

Afim de entender melhor essa mortalidade o índice de deterência dos insetos tratados com a lectina foi calculado. Os resultados obtidos apresentaram uma deterência alimentar negativa após a exposição do inseto adulto de *Cerconota anonella* a dietas acrescidas da lectina nas concentrações (3, 5 e 10 µg de proteínas/mL) (Figura 33),

revelando que os insetos se alimentaram mais nos tratamentos com a lectina, do que com o tratamento contendo controle.

Figura 33 – Índice de deterência dos insetos adultos de *C. anonella* tratados com diferentes concentrações da lectina das sementes de *C. stipularia*



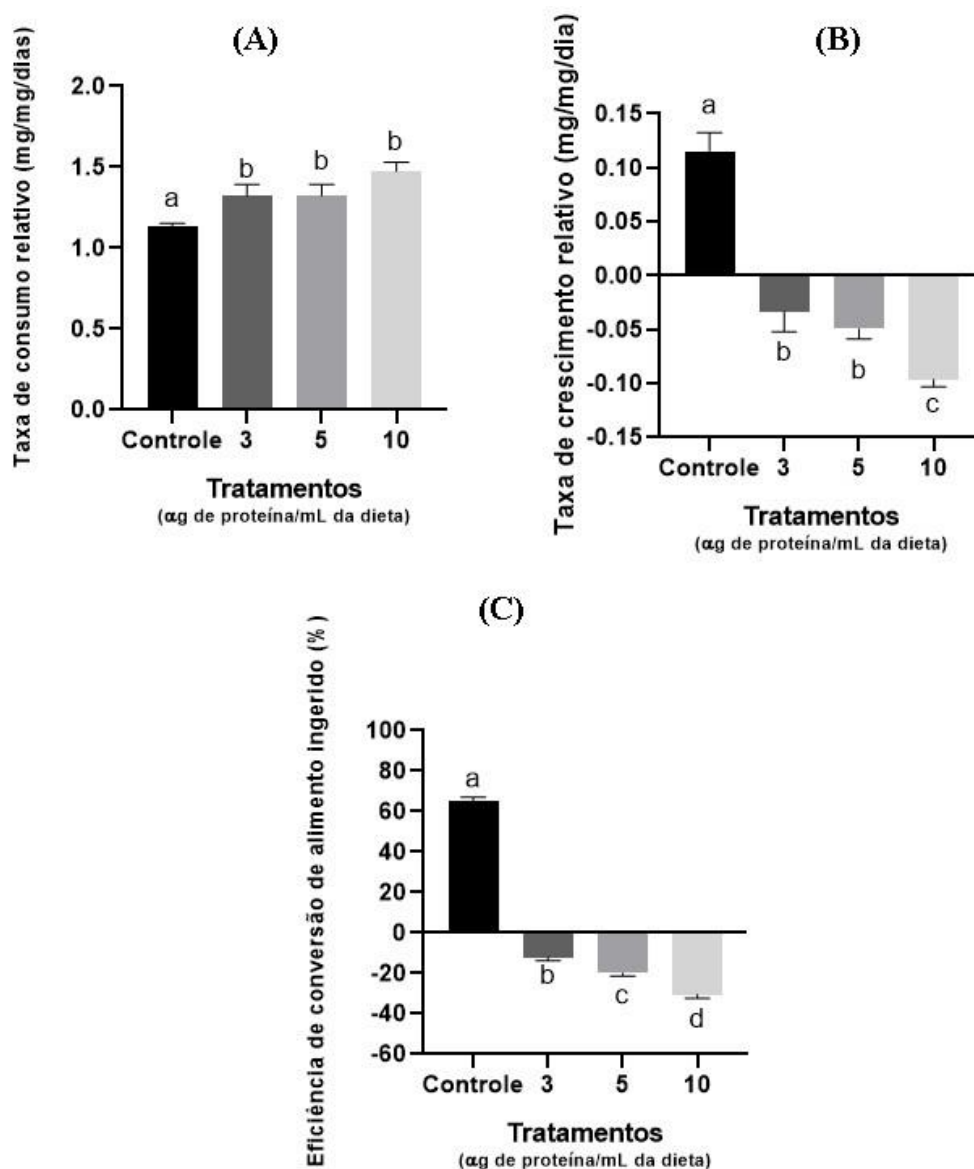
Fonte: autor, 2023. Cada barra corresponde à média $\pm$ DP de 30 repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos pelo teste de Tukey.

As lectinas podem exercer uma ação deterrente sobre a alimentação dos insetos por um efeito de pré-ingestão, envolvendo sensores digestores, ou por um efeito pós-ingestão, ao promoverem intoxicação (SAUVION et al., 2004; MICHIELS et al., 2010). PAA (lectina ligada a manose isolada de bulbos de *Phycella australis*) não apresentou efeito deterrente e PHA (lectina isolada do feijão (*Phaseolus vulgaris*)) apresentou efeito deterrente baixa ao serem ofertadas com a dieta para *Myzus persicae* (sulzer:1776) (Hemiptera: Aphididae) e *Sitibion avenal* (Fabricius, 1775) (Hemiptera: Aphididae) respectivamente (ZAPARA et al., 2016; SPRAWKA et al., 2010).

De maneira análoga a que ocorreu no extrato e na fração, os resultados dos parâmetros nutricionais corroboram com o obtido até aqui para os testes com a lectina (Figura 34). A taxa de consumo relativo confirma o observado na deterência, onde os insetos adultos de *C. anonella* alimentados com as concentrações (3, 5 e 10 µg de proteínas/mL) de lectina se alimentaram mais dos tratamentos com a lectina do que com o controle (Figura 35A), sugerindo também que os efeitos observados se dão da alimentação e não da falta dela, como fica evidente através da taxa de crescimento relativo

e da eficiência em converter o alimento ingerido que apresentam valores negativos, indicando que mesmo li alimentando os insetos não conseguiram se desenvolver.

Figura 34 – Parâmetros nutricionais dos insetos adultos de *C. anonella* tratados com a lectina de *C. stipularia*. Taxa de consumo relativo (A), taxa de crescimento relativo (B) e eficiência em conversão do alimento ingerido (C).



Fonte: autor, 2023. Cada barra corresponde à média $\pm$ DP de 30 repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos pelo teste de Tukey.

Napoleão et al, 2013, testou, além do extrato, a lectina das folhas de *Myracrodruon urundeuva* (MuLL) contra *S. zeamais*. MuLL promoveu a perda de biomassa, como refletido nos valores negativos para as taxas de ganho relativo de biomassa e eficiência na conversão de alimentos ingeridos e os autores inferiram que os

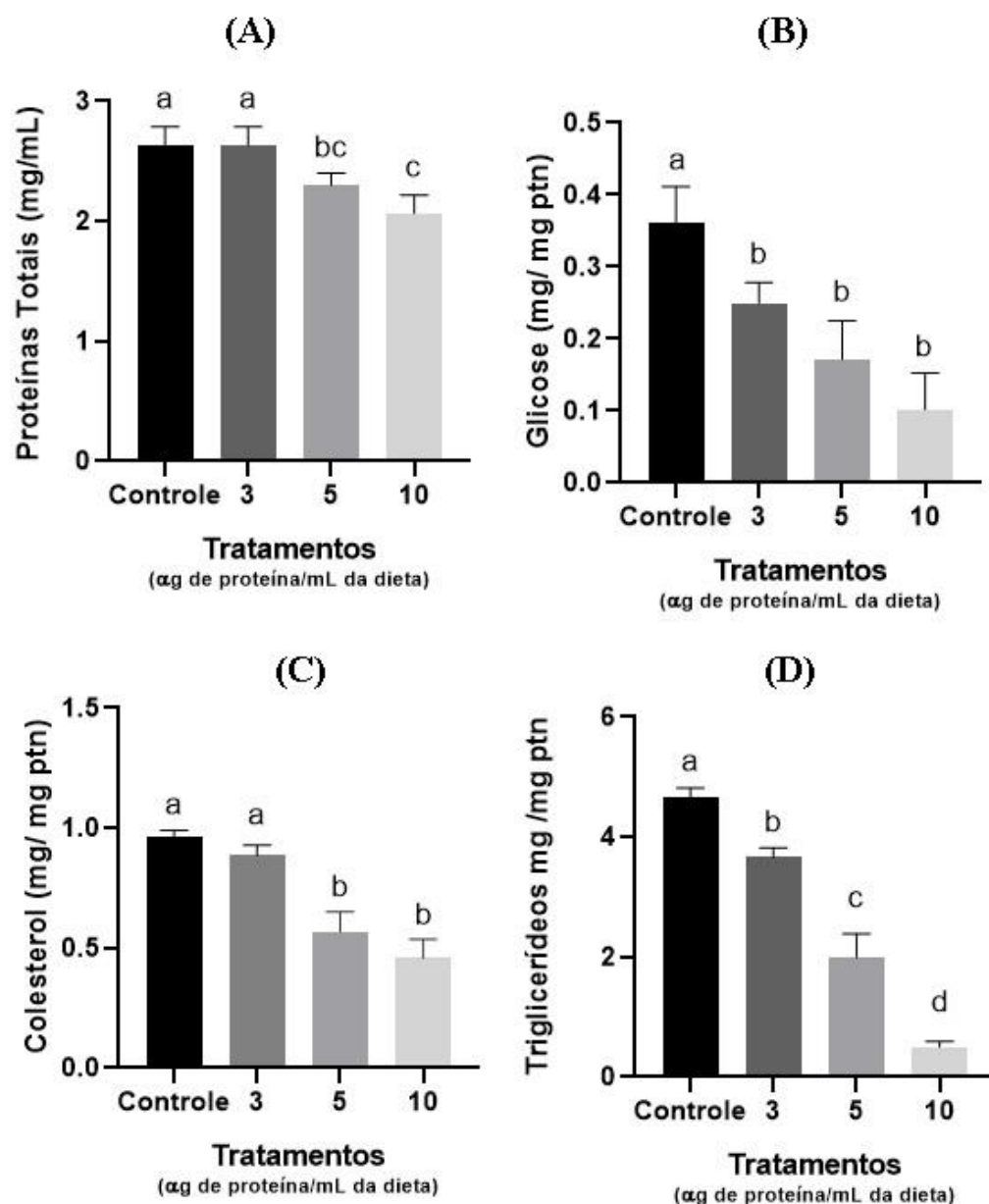
efeitos deletérios da lectina sobre *S. zeamais* poderiam estar ligados à inibição enzimática e a consequente supressão dos processos digestivos, já que a lectina afetou a atividade de enzimas do intestino do inseto *in vitro*.

Outra lectina testada que apresentou efeitos semelhantes, foi a lectina extraída das folhas de *Schinus terebinthifolius* (SteLL). A lectina não mostrou efeito deterrente, mas a biomassa e a eficiência na conversão do alimento ingerido diminuíram de uma maneira dose dependente, analogamente ao que ocorreu nos testes com a lectina de *C. stipularia* contra *C. anonella*, neste trabalho. SteLL, também inibiu a atividade de proteases intestinais e estimulou a atividade da amilase (CAMAROTI et al., 2018).

Um dos principais mecanismos de ação de metabólitos secundários e lectinas, relatados na literatura, é o efeito inibidor ou estimulador de enzimas digestivas (CAMAROTI et al., 2018; NAPOLEÃO et al, 2013; SOUZA et al., 2018). Assim, pretende-se no decorrer desta investigação tentar desvendar como age a lectina de *C. stipularia* sobre as enzimas digestivas de *C. anonella*, para melhor elucidação de como age essa proteína.

De maneira semelhante ao que foi feito com o extrato e fração, a fim de conhecer os possíveis efeitos bioquímicos da ingestão da lectina de *C. stipularia* nos insetos de *C. anonella*, foram avaliados os níveis de proteínas totais, glicose, colesterol e triglicerídeos dos insetos após o término do bioensaio. Percebemos através da figura 35, uma redução significativa em todas as taxas avaliadas ($p < 0,05$) em relação ao controle, causando uma desestabilização praticamente total no metabolismo desses insetos na presença da lectina de *C. stipularia*.

Figura 35 – Perfil bioquímico do abdômen de adultos de *C. anonella* mantidos em dietas artificiais preparadas em Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (controle) ou a lectina das sementes de *C. stipularia* em diferentes concentrações. (A) Proteínas totais em mg/mL; (B) glicose em mg/ mg de proteína (C) colesterol em mg/mg de proteína; (D) triglicerídeos em mg/ mg de proteína.



Fonte: autor, 2023. Cada barra corresponde à média $\pm$ DP de 4 repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos pelo teste de Tukey.

Mediante os resultados expostos, onde a lectina das sementes de *C. stipularia* se mostra uma biomolécula de relevância para o controle de *C. anonella*, percebe-se há perspectiva de utilização da proteína em plantas geneticamente modificadas, uma importante estratégia para o Manejo Integrado de Pragas (MIP), sendo possível futuramente a inserção de genes das lectinas em plantas sensíveis para a expressão ou super expressão dessas proteínas inseticidas.

6 CONCLUSÕES

No presente trabalho, foi purificada e caracterizada a lectina de *C. stipularia*, o extrato foi analisado fitoquimicamente e ecotoxicologicamente e o mesmo extrato, a fração proteica e a lectina das sementes de *Crotalaria stipularia* foram avaliados quanto ao seu potencial inseticida contra adultos de *Cerconota anonella*.

A lectina de *C. stipularia* foi isolada e visualizada sua pureza em gel de eletroforese (SDS-PAGE). Apresentou-se termicamente estável mantendo a AH até 50°C e mantendo 50% de sua AH até 100 °C, manteve sua AH frente a pHs ácidos a neutros e não variou sua AH mediante a EDTA e íons divalentes (cátions Mn^{2+} e Ca^{2+}).

A análise fitoquímica mostrou que o teor de fenólicos no extrato aquoso das sementes secas de *C. stipularia* foi de 7,05 µg EAG/g da amostra bruta, enquanto que através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi possível identificar o composto ácido clorogênico (2,8642 mg/kg) e o siringaldeído (0,2763 mg/kg). O extrato também foi submetido a uma análise de ecotoxicidade frente a *L.sativa* (alface) onde demonstrou-se a sua não toxicidade.

Os resultados com os bioensaios mostram que todas os tratamentos (extrato, fração e lectina das sementes de *C. stipularia*) possuem atividade inseticida contra *C. anonella*.

O extrato apresentou maior atividade inseticida contra *C. anonella* do que fração e lectina, resultando na mortalidade de 50% dos insetos na concentração de 90 µg de proteína/mL de dieta ao passar de 3 dias de experimento. Já na fração, as concentrações de 30 e 15 (µg de proteína/mL de dieta) causaram a mortalidade de 40% e 30% dos insetos, respectivamente, somente quarto dia de bioensaio, enquanto que na lectina, as concentrações de 5 e 10 µg de proteínas/mL após 4 dias de experimento causaram 30% da mortalidade dos insetos e no 5º dia de experimento essa mortalidade chegou a aproximadamente 50%, revelando que pode haver um sinergismos de compostos no extrato e fração que fizeram com que os mesmos apresentasse maior atividade inseticida em relação a lectina.

O extrato apresentou uma leve atividade deterrente, a fração apresentou atividade deterrente leve apenas na maior concentração e a lectina não apresentou atividade deterrente, porém ambos afetaram nos parâmetros nutricionais (taxa relativa de ganho de biomassa, taxa de consumo relativo e eficiência de conversão do alimento ingerido) dos insetos testados de maneira análoga, equivalentemente, as taxas de

proteínas, glicose, colesterol e triglicerídeos também foram alteradas, revelando que os tratamentos (tanto, extrato, fração e lectina) interferiram no metabolismo dos insetos.

Ambas as preparações avaliadas (extrato, fração e lectina das sementes de *Cratalaria stipularia*), podem construir uma nova alternativa biodegradável a ser considerada no controle da broca do fruto, *Cerconota anonella*. A lectina poderá ser melhor caracterizada e seu uso pode ser aproveitado no melhoramento de plantas, para produção de plantas resistentes. Extrato e fração poderão, depois de estudos mais detalhados, serem utilizados como iscas alimentares ou através de borrifamento.

7 PROPOSTA FUTURA

- Realizar testes com as enzimas digestivas (α -amilase, tripsina, etc) para melhor entender o mecanismo de ação por trás dos efeitos observados neste trabalho.
- Teste em condições seminaturais e naturais para avaliação da eficiência dos tratamentos.

REFERÊNCIAS

AGRA-NETO, A. C. ; NAPOLEÃO, T. H. ; PONTUAL, E. V. ; SANTOS, N. D. L. ; LUZ, L. A. ; OLIVEIRA, C. M. F. ; MELO-SANTOS, M. A. V. ; COELHO, L. C. B. B. ; NAVARRO, D. M. A. F. ; PAIVA, P. M. G. . Effect of *Moringa oleifera* lectins on survival and enzyme activities of *Aedes aegypti* larvae susceptible and resistant to organophosphate. **Parasitology Research** (1987. Print), v. 113, p. 175-184, 2014.

AHMED, B.; AL-HOWIRINY, T.A.; MOSSA, J. S. Crotalic and emarginellic acids: Two triterpenes from *Crotalaria emarginella* and anti-inflammatory and anti-hepatotoxic activity of crotalic acid. **Phytochemistry**, 67(10): 956-964. 2006.

ALBUQUERQUE, L. P. et al. Effect of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on survival and digestive enzymes of *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae). **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 75, p. 158–166, 2012.

ALDRICH, S. Disponível em:

< <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/aldrich/s7602>>. Acesso: 21/07/2023.

ALVES, A. C. et al. A novel vasorelaxant lectin purified from seeds of *Clathrotropis nitida*: partial characterization and immobilization in chitosan beads. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 588, p. 33-40, 2015.

AQUINO, N. C. **Extração e identificação de compostos voláteis atraentes para fêmeas de *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae)**. Tese – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO. Maceió, 2019.

ARARIPE, D. A. et al. Partial characterization and immobilization in CNBr-activated Sepharose of a native lectin from *Platypodium elegans* seeds (PELa) and comparative study of edematogenic effect with the recombinant form. **International journal of biological macromolecules**, v. 102, p. 323-330, 2017.

ARULMOZHI, V., MIRUNALINI, S. Ellagic acid: a novel polyphenolic antioxidant and their therapeutic applications. **Pharmacology online**.3, 446e457. 2010.

BANDYOPADHYAY, S. et al. Binding of garlic (*Allium sativum*) leaf lectin to the gut receptors of homopteran pests is correlated to its insecticidal activity. **Plant Science**, v. 161, n. 5, p. 1025-1033, 2001.

BARROS, A. C. A. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DO COLMO DA *Guadua angustifolia* Kunth CONTRA *Tribolium castaneum* (Herbst). Tese – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. PPGQB. Maceió, 2020.

BITTENCOURT, M. A.L.; SOBRINHO, C. C. de M.; PEREIRA, M. J. B. Biologia, danos e táticas de controle da broca-da-polpa das anonáceas. **Bahia Agrícola.**, v.8, n. 1, nov. 2007.

BOLOGNESI, R. **Síntese, degradação e funções da membrana peritrófica dos insetos**. Tese (Doutorado em Bioquímica). Instituto de Química. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2005.

BOTTON, M.; NAVA, D. E.; ARIOLI, C. J.; GRUTZMACHER, A. D.; GARCIA, M. S. Bioecologia, monitoramento e controle da mariposa-oriental na cultura do pessegueiro no Rio Grande do Sul. **Embrapa Uva e Vinho** - Circular Técnica, v. 86, 11p. 2011.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities for proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego/ USA, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAGA SOBRINHO, et al. **Monitoramento de pragas na produção integrada do meloeiro**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007.

BRAGA SOBRINHO, R. Potencial de exploração de anonáceas no Nordeste do Brasil. In: Semana Internacional da Fruticultura, **Floricultura e Agroindústria**, 17, Fortaleza: Embrapa 2010. Disponível em: Acesso em: 20 jun. 2021.

BRITO, E. dos A. **Avaliação de táticas de controle sobre a broca-do-fruto das anonáceas *Cerconota anonella* (Lepidoptera: Oecophoridae)**. Dissertação de mestrado. Produção Vegetal. Ilhéus: Universidade Federal de Santa Cruz, 2010.

- BRITO, E. A. et al. Efeito do ensacamento e pulverização de frutos de gravioleira, frente à broca-do-fruto das anonáceas, *Cerconota anonella* (Lepidoptera: Oecophoridae). **Agrotrópica**, v. 22, n. 3, p. 171-176, 2011.
- BROGLIO-MICHELETTI, S.M.F. et al. Controle de *Cerconota anonella* (Sepp.) (Lep.: Oecophoridae) e de *Bephratelloides pomorum* (Fab.) (Hym.: Eurytomidae) em frutos de graviola (*Annona muricata*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 3, p. 722-725, 2001.
- BURKART, A. Las leguminosas argentinas: silvestres y cultivadas. 2. ed. Buenos Aires: **Acme Agency**. 579 p. 1952.
- CAMACHO, N.N. **Expressão heteróloga da lectina de *Bauhinia forficata* Link em *Escherichia coli* e efeito sobre linhagens celulares tumorais**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas, 2007
- CAMAROTI, J. R. S. L.; OLIVEIRA, A. P. S.; PAIVA, P. M. G.; PONTUAL, E. V.; NAPOLEÃO, T. H. Phytoinsecticides for controlling pests and mosquito vectors of diseases. In: Victor Green. (Org.). *Biocontrol Agents: Types, Applications and Research Insights*. 1ed. New York: **Nova Science Publishers**, v., p. 147-188. 2017.
- CAMAROTI, J. R. S. L. et al. *Sitophilus zeamais* adults have survival and nutrition affected by *Schinus terebinthifolius* leaf extract and its lectin (SteLL). **Industrial Crops & Products**, v. 116. p. 81–89. 2018.
- CARLINI, C.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potential as bioinsecticides. **Toxicon**, v.40, p. 1515-1539, 2002.
- CARVALHO, A. DE S. et al. Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.75, p. 402–408, 2015.
- CASTANHEIRA, L. et al. Insights into anti-parasitism induced by a C-type lectin from *Bothrops pauloensis* venom on *Toxoplasma gondii*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 568–574, 2015.

CERDA, H., et al., Effects of aqueous extracts from Amazon plants on *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) and *Brevicoryne brassicae* (Homoptera: Aphididae) in laboratory, semifield, and field trials. **Journal of Insect Science**, 9, p. 1- 9, 2019.

CHIKALOVETS, I. V. et al. A lectin with antifungal activity from the mussel *Crenomytilus grayanus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 42(2), p. 503–507, 2015.

CHICUTA, C. P.L. **Avaliação do efeito do extrato e de frações proteicas das sementes de crotalaria stipularia (desv., 1814) (farbales: fabaceae) sobre a sobrevivência e parâmetros nutricionais de *Tribolium castaneum* (herbst, 1797) (coleoptera: tenebrionidae)**. Dissertação – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. PPGQB. Maceió, 2019.

CICCO, N.; LANORTE, M. T.; PARAGGIO, M.; VIGGIANO, M.; LATTANZIO, V. A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. **Microchemical Journal**., 91(1), 107–110.2009.

COELHO, M. B.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Insecticidal action of *Annona coriacea* lectin against the flour moth *Anagasta kuehniella* and the rice moth *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera: Pyralidae). **Comparative Biochemistry and Physiology C**, v. 146, p. 406-414, 2007.

COELHO, J. S.; SANTOS, N. D.; L.; NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S.; FERREIRA, R. S.; ZINGALI, R. B.; COELHO, L. C. B. B.; LEITE, S. P.; NAVARRO, D. M. A. F.; PAIVA, P. M. G. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. **Chemosphere**, v. 77, p. 934-938, 2009.

COSTA, M. A. L.; et al. Estudo da precipitação com etanol de xilanases de complexos enzimáticos produzidos por *Aspergillus niger* em fermentação no estado sólido e fermentação submersa. 2016.

COSTA, R. B. C.; CAMPANA, P. T.; CHAMBERGO, F. S.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G.; PEREIRA, H. J. V.; OLIVA, M. L. V.; GOMES, F. S. Purification and characterization of a lectin with refolding ability from *Genipa americana* bark. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 119 P. 517–523, 2018.

DANGUY, A. et al. Applications of lectins and neoglycoconjugates in histology and pathology. **Acta Anatomica**, v. 161, p. 206-218, 1998.

DUTTA, I. et al. Constitutive and phloem specific expression of *Allium sativum* leaf agglutinin (ASAL) to engineer aphid (*Lipaphis erysimi*) resistance in transgenic Indian mustard (*Brassica juncea*). **Plant Science**, v. 169, n. 6, p. 996-1007, 2005.

ELLIGER C.A., WONG Y., CHAN B.G., WAISS A.C. JR. Growth inhibitors in tomato (*Lycopersicon*) to tomato fruit worm (*Heliothis zea*). **Journal of Chemical Ecology**, 7, 753–758. 1981.

EMBRAPA–Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2016. **Qualidade de sementes e grãos comerciais de soja no Brasil** – safra 2014/15 [recurso eletrônico]: / Irineu Lorini (editor técnico). – Londrina : Embrapa Soja, 2016. 190 p. il. – (Documentos / Embrapa Soja, ISSN 2176-2937 ; 378). 1.Soja-semente-qualidade. 2.Soja-grão-qualidade. I.Lorini, Irineu. II.Título. III.Série, 2016

EMBRAPA–Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Controle biológico de pragas da agricultura** / Eliana Maria Gouveia Fontes, Maria Cleria Valadares-Inglis, editoras técnicas. – Brasília, DF, 2020.

ENDO, T. Fractionation of glycoprotein-derived oligosaccharides by affinity chromatography using immobilized lectin columns. **Journal of Chromatography A**, v.720, p. 251-261, 1996.

FACHINELLO, J. C.; NACHTIGAL, J. C.; KERTERN, E. Poda das plantas frutíferas. In: **Fruticultura: fundamentos e práticas**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, p. 8-13, 2008.

FAO – Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação. Disponível em: <https://www.fao.org>. Acesso em 10 de mar. de 2023.

FRASSINETTI, S. et al. Antimutagenic and Antioxidant Activity of a Selected Lectin-free Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Two Cell-based Models. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 70(1), p. 35–41, 2015.

FELIPE, R.T.A.; OLIVEIRA, J.A.; LEÃO, G.A. Potencial de *Cajanus cajan* e *Crotalaria spectabilis* para fitorremediação: absorção de arsênio e respostas antioxidativas. **Revista Árvore**, 33(2): 245-254. 2009.

FERNANDES, A. V.; RAMOS, M. V.; GONÇALVES, J. F.C.; MARANHÃO, P. A. C.; CHEVREUIL, L. R.; SOUZA, L. A. G. Seeds of Amazonian Fabaceae as a source of new lectins. **Brazilian Journal of Plant Physiology**., 23(3): 237-244, 2011.

FERREIRA, S. B.; DANTAS, I. C.; CATÃO, R. M. R. Evaluation of the antimicrobial activity of the essential oil of sucupira (*Pterodon emarginatus*). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.16, Botucatu abr/jun. 2014.

FITCHES, E.; GATEHOUSE, J.A. A comparison of the short and long term effects of insecticidal lectins on the activities of soluble and brush border enzymes of tomato moth larvae (*Lacanobia oleracea*). **Journal of Insect Physiology**, v. 44, p. 1213-1224, 1998.

FITCHES, E. et al. In vitro and in vivo binding of snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA) and jackbean (*Canavalia ensiformis*; Con A) lectins within tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae; mechanisms of insecticidal action. **Journal of Insect Physiology**, v. 47, n. 7, p. 777-787, 2001.

FLORES, A. V.; RIBEIRO, J. N.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, E. L. R. **Organoclorados: Um problema de saúde pública**. Ambiente & Sociedade, v. 3, p. 111-124, 2004.

FUNK, P.E.; THOMPSON. Identification of a lectin that induces cell death in developing chicken B cells. **Cellular Immunology**, v.186, n.1, p. 75-81, 1998.

GALDINO, L. T.; RAGA, A. Ensacamento de frutos – uma antiga e eficiente estratégia de manejo de pragas na horticultura. **Biológico**, v.81, 1-16, 2019.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 920p. 2002.

GARRIDO, M. S.; SOARES, A.C.F.; COIMBRA, J.L.; SOUSA, C. S. Manejo da crotalaria e do guandu no controle de nematoses do inhame. **Summa Phytopathologica**, 34(3): 222-227. 2008.

GOMES, F. S. et al. Antimicrobial lectin from *Schinus terebintifolius* leaf. **Journal of applied microbiology**, v. 114, n. 3, p. 672-679, 2013.

GONZÁLEZ, G. E. et al. Galectin-3 is essential for early wound healing and ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. **International Journal of Cardiology**, v. 176(3), p. 1423–1425, 2014.

GORDTS, S. C. et al. NICTABA and UDA, two GlcNAc-binding lectins with unique antiviral activity profiles. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70 (6), p. 1674–1685, 2015.

HAYUNGA, E.G.; SUMMER, M.P. Characterization of surface glycoprotein on *Schistosoma mansoni* adult worms by lectin affinity chromatography. **Journal of Parasitology**, v. 72, p. 283-291, 1986.

HIRSCH, A.M. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, p. 320-326, 1999.

IMBERT, A.; WIMMEROVÁ, M.; MITCHELL, E. P.; GILBOA-GARBER, N. Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into the molecular basis for host glycan recognition. **Microbes and Infection**, v. 6, n. 2, p. 221-228, 2004.

ISIDRO, R. et al. Ação de lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* Mart. sobre o comportamento da saúva do Nordeste (*Atta opaciceps* Borgmeier, 1939). **Revista de la Facultad de Agronomía**, v. 27, p. 77-89, 2001.

JAKOBEK, Lidija. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. **Food Chemistry**, v. 175, p. 556-567, 2015.

KOZHANTSHIKOV, I. W. Carbohydrate and Fat Metabolism in Adult Lepidoptera, **Cambridge University Press**, v.29, n.1, p.103, 1938.

KAUR, M.; SINGH, K.; RUP, P. J.; SAXENA, A. K.; KHAN, R. H.; ASHRAF, M. T.; KAMBOJ, S. S.; SINGH, J. A tuber lectin from *Arisaema helleborifolium* Schott with antiinsect activity against melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) and anti-cancer effect on human cancer cell. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 445, p. 156 -165, 2006.

KENNEDY, J. F. et al. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 219-30, 1995.

KIST, B. B.; CARVALHO, C.; BELING, R. R. **Anuário Brasileiro de Horti&Fruti** **2022**. Editora Gazeta Santa Cruz: Santa Cruz do Sul, 2022.

KRISHNAPPA, K., et al., Larvicidal and repellent effects of *Jussiaea repens* (L.) leaf ethanol extract and its major phytoconstituent against important human vector mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Environmental Science and Pollution Research**. Res. 27, 23054–23061, 2020.

KOGAN, M. Integrated Pest Management: Historical perspectives and contemporary developments. **Annual Review of Entomology**, v.43, p.243-270, 1998.

KOOSHA, M., ABAI, M.R., ABOLHASANI, M. CHAREDAR, S. AND BASSERI, H.R. Lectin activity in gut extract of *Culex pipiens*. **Journal of Arthropod-Borne Diseases**. v. 7, p. 23–30, 2013.

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

LANNOO, N, VAN DAMME, E. J. M. Lectin domains at the frontiers of plant defense. **Front Plant Sci**, v. 5, p.397- 405, 2014.

LEE G., JOO Y., KIM S.G., BALDWIN I.T. What happens in the pith stays in the pith: tissue-localized defense responses facilitate chemical niche differentiation between two spatially separated herbivores. **The Plant Journal**, 92, 414–425. 2017.

LEISS K.A., MALTESE F., CHOI Y.H., VERPOORTE R., KLINKHAMER P.G. Identification of chlorogenic acid as a resistance factor for thrips in chrysanthemum. **Plant Physiology**, 150, 1567–1575. 2009.

LEITE, Y. F. M. M.; SILVA, L. M. C. M.; AMORIM, R. C. N.; FREIRE, E.A.; MELO, J. D. M.; GRANGEIRO, T. B.; BENEVIDES, N. M. B. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1724, p. 137-145, 2005.

LEITE, G. L. D. et al. The bagging of *Annona crassiflora* fruits to control fruit borers. **Acta Scientiarum**. Agronomy, v. 34, n. 3, p. 253-257, 2012.

LI, H. M. et al. Transcriptional signatures in response to wheat germ agglutinin and starvation in *Drosophila melanogaster* larval midgut. **Insect molecular biology**, v. 18, n. 1, p. 21-31, 2009.

LIU X., VRIELING K., KLINKHAMER P.G.L. Interactions between plant metabolites affect herbivores: a study with pyrrolizidine alkaloids and chlorogenic acid. **Frontiers in Plant Science**, 8, 1–14. 2017.

LIU, Z. L.; GOH, S. H.; HO, S. H. Screening of chinese medicinal herbs for bioactivity against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium castaneum* (Herbst). **Journal of Stored Products Research**, v. 43, p. 290-296, 2007.

LEMOES, E. E. P. A produção de anonáceas no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 77-85, jan. São Paulo, 2014.

LEWIS, G.P.; SCHRIRE, B.; MACHINDER, B. & LOCK, M. Legumes of the world. **Kew: Royal Botanic Gardens**. 577 p. 2005.

LIMA, J.K.A., CHICUTA, C.P.L., COSTA, M.M., COSTA, M.L.A., GRILLO, L. A. M., SANTOS, A. F., GOMES, F.S. Biototoxicity of aqueous extract of *Genipa Americana* L. bark on red flour beetle *Tribolium castaneum* (Herbst). **Industrial Crops and Products**. 156. 112874.2020.

LIMPENS, E.; BISSELING, T. Signaling in symbiosis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 343-350, 2003.

LIN D-J, FANG Y, LI L-Y, ZHANG L-Z, GAO S-J, WANG R AND WANG J-D. The insecticidal effect of the botanical insecticide chlorogenic acid on *Mythimna separata* (Walker) is related to changes in MsCYP450 gene expression. **Frontiers in Plant Science**. 2022.

LIU, Z. L.; GOH, S. H.; HO, S. H. Screening of chinese medicinal herbs for bioactivity against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium castaneum* (Herbst). **Journal of Stored Products Research**, v. 43, p. 290-296, 2007.

MAAS, P.J.M.; RAINER, H.; LOBÃO, A.Q. **Annonaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB110572>>. Acesso em: 05 jun. 2023.

MACEDO, M L R et al. Mechanisms of the insecticidal action of TEL (*Talisia esculenta* lectin) against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America**, v. 56, n. 2, p. 84-96, 2004.

MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. G. M.; SILVA, M. B. R.; COELHO, L. C. B. B. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A, v. 146, p. 486-498, 2007.

MACEDO, M. L. R. et al. Adaptive Mechanisms of Insect Pests Against Plant Protease Inhibitors and Future Prospects Related to Crop Protection: A Review. **Protein & Peptide Letters**, v. 22, p. 149-163, 2015.

MARCIEL, M. V. e col. Extratos vegetais usados no controle de dípteros vetores de zoonoses. **Revista brasileira de plantas medicinais**. V.12, n.1, Botucatu, 2010

MARTINEZ G., REGENTE M., JACOBI S., DEL RIO M., PINEDO M., DE LA CANAL L. Chlorogenic acid is a fungicide active against phytopathogenic fungi. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 140, 30–35. 2017.

MAZHAWIDZA, E., MVUMI, B. M. Field evaluation of aqueous indigenous plant extracts against the diamondback moth, *Plutella xylostella* L. and the rape aphid, *Brevicoryne brassicae* L. in brassica production. **Industrial Crops and Products**. 110, p. 36–44, 2017.

MEDA, A.R.; FURLANI, P.R. Tolerance to aluminum toxicity by tropical leguminous plants used as cover crops. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 48(2): 309-317. 2005.

MELO, B. S. C. **Avaliação do potencial inseticida de produtos naturais e sintéticos no controle das brocas da graviola**. 2006. 61f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, área de concentração Fitotecnia) Universidade Federal do Ceará, CE, 2006.

MEYER, H. J.; NORRIS, D. M. Vanillin and syringaldehyde as attractants for *Scolytus multistriatus* (Coleoptera: Scolytidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 60, n. 4, p. 858-859, 1967.

MICHIELS, K et al. Plant-insect interactions: what can we learn from plant lectins?. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America**, v. 73, n. 4, p. 193-212, 2010.

MORRIS, J.B. Special-purpose legume genetic resources conserved for agricultural, industrial, and pharmaceutical use. **Economic Botany**, 51(3): 251-263. 1997.

MOSCA, J. L; CAVALCANTE, C. L. B; DANTAS, T.M. **Características botânicas das principais Anonáceas e aspectos fisiológicos de maturação**. Embrapa Agroindústria Tropical, Doc. 106, Fortaleza- CE, 2006.

MOURA, R. M.; QUEIROZ, A. F.S.; FOOK, J. M.; DIAS, A. S.; MONTEIRO, N. K.; RIBEIRO, J. K.; MOURA, G. E.; MACEDO, L. L.; SANTOS, E. A.; SALES, M. P. **CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania promastigotes*. Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 145, n. 4, p. 517-523, 2006.

MÜLLER, G. J. et al. Anti-apoptotic signaling and failure of apoptosis in the ischemic rat hippocampus. **Neurobiology of disease**, v. 25, n. 3, p. 582-593, 2007.

NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S.; LIMA, T. A.; SANTOS, N. D. L.; SÁ, R. A.; ALBUQUERQUE, A. C.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, p. 52-59, 2011.

NAPOLEÃO, T. H.; PONTUAL, E. V.; LIMA, T. A.; SANTOS, N. D. L.; SÁ, R. A.; COELHO, L. C. B. B.; NAVARRO, D. M. A. E.; PAIVA, P. M. G. Effect of *Myracrodruon*

urundeuva leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. **Parasitology Research**, v. 110, p. 609-616, 2012.

NAPOLEÃO, T. H., DO REGO BELMONTE, B., PONTUAL, E. V., DE ALBUQUERQUE, L. P., SÁ, R. A., PAIVA, L. M., PAIVA, P. M. G. Deleterious effects of *Myracrodruon urundeuva* leaf extract and lectin on the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae). **Journal of stored products research**, 54, 26-33.2013.

NAPOLEÃO, T. H.; ALBUQUERQUE, L. P.; SANTOS, N. D. L.; NOVA, I. C. V.; LIMA, T. A.; PAIVA, P. M. G.; PONTUAL, E. V. Insect midgut structures and molecules as targets of plant-derived protease inhibitors and lectins. **Pest Management Science**. 2018.

NARENDER, T.; SHWETA; TANVIR, K.; RAO, M.S.; SRIVASTAVA, K. & PURI, S.K. Prenylated chalcones isolated from *Crotalaria* genus inhibits in vitro growth of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. 2005.

NAVEED M., HEJAZI V., ABBAS M., KAMBOH A.A., KHAN G.J., SHUMZAID M., AHMAD F., BABAZADEH D., XIA F., MODARRESI-GHAZANI F., LI W., ZHOU X. Chlorogenic acid (CGA): a pharmacological review and call for further research. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 97, 67–74. 2018.

NELSON, DAVID L.; COX, MICHAEL, M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Artmed Editora, 2014.

NIGGEWEG R., MICHAEL A.J., MARTIN C. Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. **Nature Biotechnology**, 22, 746–754. 2004.

NIVSARKAR, M. et al. Superoxide dismutase in the anal gills of the mosquito larvae of *Aedes aegypti*: Its inhibition by α -terthienyl. **Archives of insect biochemistry and physiology**, v. 16, n. 4, p. 249-255, 1991.

OHIZUMI, Y. et al. Mannose-binding lectin from yam (*Dioscorea batatas*) tubers with insecticidal properties against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 7, p. 2896-2902, 2009.

OLIVEIRA, C. F. R.; LUZ, L. A.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera*

lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 498-504, 2011.

OLIVEIRA, C. T. et al. Entomotoxic properties of Dioclea violacea lectin and its effects on digestive enzymes of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera). **Journal of Insect Physiology**, v. 81, p. 81–89, 2015.

OLIVEIRA, Wilian Rosário de. Lectinas de *Crotalaria spectabilis* R.: isolamento, purificação e atividade aglutinante em *Leptospira biflexa* (saprófita) e *L. interrogans* (patogênica). 2017

PAES, J.B. et al. Resistência das madeiras de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*), cássia (*Senna siamea*) e ipê (*Tabebuia impetiginosa*) a fungos e cupins xilófagos em condições de laboratório. **Floresta e Ambiente**, v. 9, p. 135-144, 2002.

PAIVA, P. M.; COELHO, L. C. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* mart.(camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 36(2), 113-118, 1992.

PAIVA, P. M. G., NAPOLEÃO, T. H., COELHO, L. C. B. B. In: Perveen, F. (Ed.), Insecticide Activity of Lectins and Secondary Metabolites, in Insecticides – Advances in Integrated Pest Management. **InTech**, Rijeka, pp. 579–598. 2012.

PAIVA, P.M.G. et al. Plant compounds with *Aedes aegypti* larvicidal activity and other biological properties. In: LIONG, M.-T. (ed.). **Bioprocess Sciences and Technology**. New York: Nova Publishers Inc., pp. 271-296, 2011.

PAIVA, P. M. G.; MARTINS, G. F.; NAPOLEÃO, T. H. *Schinus terebinthifolius* leaf extract causes midgut damage, interfering with survival and development of *Aedes aegypti* larvae. **Plos One**, v. 10, p. e0126612, 2015.

PAN, S.; TANG, J.; GU, X. Isolation and characterization of a novel fucose-binding lectin from the gill of bighead carp (*Aristichthys nobilis*). **Vet. Immunol Immunopathol**. v. 133, p. 154-164, 2010.

PEIXOTO, P.G., FUJITA, A.T., CARDOSO, A. C. R. A eventual eficácia da Crotalaria no combate ao mosquito Aedes (Meigen, 1818). **Acta Biologica Brasiliensia**. v.1, n.1 ISSN online 2596-0016. 2018.

PEREIRA, M. C. T. et al. Efeito do ensacamento na qualidade dos frutos e incidência da broca-do-frutos da atemóia e da pinheira. **Bragantia**, v. 68, n. 2, p. 389-396, 2009.

PINTO-JUNIOR, V.R.; OSTERNE, V.J.; SANTIAGO, M.Q.; CORREIA, J.L.; PEREIRA-JUNIOR, F.N.; LEAL, R.B.; PEREIRA, M.G.; CHICAS, L.S.; NAGANO, C.S.; ROCHA, B.A. Structural studies of a vasorelaxant lectin from *Dioclea reflexa* Hook seeds: Crystal structure, molecular docking and dynamics. **International Journal of Biological Macromolecules**. 98, 12–23, 2017.

POLHILL, R.M. Crotalaria in Africa and Madagascar. **Kew: Royal Botanic Gardens**. 1982.

POWELL, K. S. et al. Immunohistochemical and developmental studies to elucidate the mechanism of action of the snowdrop lectin on the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stal). **Journal of Insect Physiology**, v. 44, n. 7-8, p. 529-539, 1998.

PRASANNA, V. K.; & VENKATESH, Y. P. Characterization of onion lectin (*Allium cepa* agglutinin) as an immunomodulatory protein inducing Th1-type immune response in vitro. **International Immunopharmacology**, v. 26(2), p.304–313, 2015.

PROCÓPIO, T. F. ; FERNANDES, K. M. ; PONTUAL, E. V. ; XIMENES, R. M. ; OLIVEIRA, A. R. C. ; SOUZA, C. S. ; MELO, A. M. M. A. ; NAVARRO, D. M. A. F. ; PAIVA, P. M. G. ; MARTINS, G. F. ; NAPOLEÃO, T. H. . *Schinus terebinthifolius* leaf extract causes midgut damage, interfering with survival and development of *Aedes aegypti* larvae. **Plus One**, v. 10, p. e0126612, 2015.

PROCÓPIO, T. F.; MOURA, M. C.; ALBUQUERQUE, L. P.; GOMES, F. S.; SANTOS, N. D. L.; COELHO, L. C. B. B.; PONTUAL, E. V.; PAIVA, P. M. G.; NAPOLEÃO, T. H. Antibacterial Lectins: Action Mechanisms, Defensive Roles and Biotechnological Potential. In: Erika Collins. (Org.). Antibacterials: Synthesis, Properties and Biological Activities. 1ed. **New York: Nova Science Publishers, Inc.**, v. p. 69-89. 2017.

QU, W. et al. Quantitative determination of major polyphenol constituents in pomegranate products. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1585-1591, 2012.

QUATTRUCCI, A., OVIDI, E., TIEZZI, A., VINCIGUERRA, V., & BALESTRA, G. M. Biological control of tomato bacterial speck using *Punica granatum* fruit peel extract. **Crop Protection**, 46, 18–22. 2013.

ROCHA, L.G.; ARAGÃO, C.F.S.; LOIOLA, M.I.B.; BEZERRIL, R.A.; PAIVA, N.R.F.; HOLANDA, C.M.C.X.; BRITO, M.E.F. Evaluation of the leishmanicide action of ethanol extracts of *Crotalaria retusa* L. (Fabaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 19(1A): 51-56. 2009.

SÁ, R. A.; NAPOLEÃO, T.H.; SANTOS, N. D. L.; GOMES, F. S.; ALBUQUERQUE, A. C.; XAVIER, H. S.; COELHO, L. C. B. B.; BIEBER, L. W.; PAIVA, P. M. G. Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 62, p. 460- 464, 2008.

SÁ, R. A. et al. Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood. **Wood Science and Technology**, v. 43, n. 1-2, p. 85-95, 2009b.

SÁ, R. A. et al. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 149, n. 3, p. 300-306, 2009a.

SAUVION, N et al. Effects of jackbean lectin (ConA) on the feeding behaviour and kinetics of intoxication of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 110, n. 1, p. 31-44, 2004.

SANTIAGO, M.Q.; LEITÃO, C.C.; PEREIRA-JUNIOR, F.N.; PINTO-JUNIOR, V.R.; OSTERNE, V.J.; LOSSIO, C.F.; CAJAZEIRAS, J.B.; SILVA, H.C.; ARRUDA, F.V.S.; PEREIRA, L.P.; ASSREUY, A.M.S.; NASCIMENTO, K.S.; NAGANO, C.S.; CAVADA, B.S. Purification, characterization and partial sequence of a pro-inflammatory lectin from seeds of *Canavalia oxyphylla* Standl. & LO Williams. **Journal of Molecular Recognition**, v. 27, n. 3, p. 117-123. 2014.

SANTOS, N. D. L. et al. Oviposition-stimulant and ovicidal activities of *Moringa oleifera* lectin on *Aedes aegypti*. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e44840, 2012.

- SANTOS, R. I. Metabolismo Básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 4. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade, p. 333-365.2007.
- SANTOS, V. S. V.; CUNHA, J. R., SILVA, P. H. S. Atividade ovicida e repelente de pó de citronela sobre o caruncho do feijão-caupi. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. Abr;13(2):146- 149, 2018.
- SANTOS, N.D.L., et al. Effect of gamma irradiation of *Moringa oleifera* seed lectin on its larvicidal, ovicidal, and oviposition-stimulant activities against *Aedes aegypti*. **South African Journal**. Botany, v.129, p. 3-8, 2020
- SANTOS, N.D.L. ; ALBUQUERQUE, L.P. ; AMORIM, M.M.R. ; SILVA, J.N.O.; PROCÓPIO, T.. ; SANTOS, P.E.M. ; PAIVA, P.M.G. ; BARROS, M.R.; **NAPOLEÃO, T.H.** ; PONTUAL, E.V. Effects of Lectin Preparations from *Microgramma vacciniifolia* Rhizomes on the Survival, Digestive Enzymes, and Acetylcholinesterase Activity of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Macromol**, v. 3, p. 451-462, 2023.
- SCHULZ, Deisinara Giane et al. Alelopatia de bambu (*Dendrocalamus giganteus* MURO). **Revista Cultivando o Saber**, v. 3, n. 3, p. 31-39, 2010.
- SÉTAMOU, M. et al. Evaluation of lectin-expressing transgenic sugarcane against stalkborers (Lepidoptera: Pyralidae): effects on life history parameters. **Journal of Economic Entomology**, v. 95, n. 2, p. 469-477, 2002.
- SILVA, A. B.; BATISTA, J. L. **Controle de insetos-praga: qual método é mais apropriado?** 2015. Disponível em: < <http://www.grupocultivar.com.br/artigos/controle-de-insetos-praga-qual-metodo-e-mais-apropriado> > acesso em 19 de dez. 2022.
- SILVA, L. S. **Controle de *Cerconota anonella* (sepp., 1830) (Lep.: Oecophoridae) e de *Bephratelloides pomorum* (Fab., 1808) (Hym.: Eurytomidae) em frutos de pinha (*Annona squamosa* L.) (Annonaceae)**. 86f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, área de concentração Proteção de Plantas) - Universidade Federal de Alagoas, AL, 2013.

- SILVA, T.O. da; MENEZES, R.S.C.; TIESSEN, H.; SAMPAIO, E.V. de S.B.; SALCEDO, I.H. & SILVEIRA, L.M. da. Adubação orgânica da batata com esterco e, ou, *Crotalaria juncea*. I – Produtividade vegetal e estoque de nutrientes no solo em longo prazo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 31(1): 39-49. 2007.
- SILVA, M. C.; CORRÊA, A.D.; SANTOS, C.D.; MARCOS, F. C. A.; ABREU C.M. P. **Extração da lectina da folha de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e o efeito de cátions divalentes na atividade hemaglutinante**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, p. 103-107, 2010.
- SILVA, F. DE O. et al. Antiproliferative effect of *Canavalia brasiliensis* lectin on B16F10 cells. **Research in Veterinary Science**, v. 96(2), p. 276–282, 2014.
- SILVA, Pollyanna Michelle da. **Caracterização estrutural e avaliação da atividade antimicrobiana da lectina da testa de *Punica granatum* L.** 2015.
- SILVA P. M., et al. The juicy sarcotesta of *Punica granatum* contains a lectin that affects growth, survival as well as adherence and invasive capacities of human pathogenic bacteria. **Journal Functional Foods**, v. 27, p. 695–702, 2016.
- SILVA, J. D. F. et al. Portulaca elatior root contains a trehalose-binding lectin with antibacterial and antifungal activities. **International journal of biological macromolecules**, v. 126, p. 291-297, 2019.
- SINGH, B.; KAUR, A. Control of insect pests in crop plants and stored food grains using plant saponins: **A review. Food Science and Technology**. 87, 93-101. 2018.
- SLIPINSKI, S.A.; LESCHEN, R.A.B.; LAWRENCE, J.F. Order Coleoptera Linnaeus, 1758. **Zootaxa**, v. 3148, p. 203–208, 2011.
- SOARES, L. A. L. NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G. Evaluation of the insecticidal activity of *Moringa oleifera* seed extract and lectin (WSMoL) against *Sitophilus zeamais*. Journal of Stored Products Research. 87. 101615. 2020.
- SOBRINHO, R. B.; MESQUITA, A. L. M.; HAWERROTH, F. J.; SILVA, K. S.; KAVATI, R. **Identificação e monitoramento de pragas na produção integrada da gravioleira**. 1. ed. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2011.

SOBRINHO, R. B. CARDOSO, J. E.; FREIRE, F. C. O. Pragas da gravioleira. In: **Pragas de fruteiras tropicais de importância agroindustrial**. Brasília: EMBRAPA-SPI/Fortaleza: EMBRAPA-CNPAT, p.132-141. 1998.

SOUZA, C. S.; PROCÓPIO, T. F.; BELMONTE, B. R.; PAIVA, P. M.G.; ALBUQUERQUE, L. P.; PONTUAL, E. V.; NAPOLEÃO, T.H. Effects of *Opuntia ficus-indica* lectin on feeding, survival, and gut enzymes of maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **The Korean Society for Applied Biological Chemistry**. 2018.

SOUZA, J.D.; SILVA, M. B.R.; ARGOLO, A. C.C.; NAPOLEÃO, T. H.; SÁ, R. A.; CORREIA, M. T.S.; PAIVA, P. M.G.; SILVA, M. D.C.; COELHO, L.C.B.B. A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. **International Biodeterioration & Biodegradation** 65, 696 -702, 2011.

SPRAWKA, I.; GOŁAWSKA, S.. Effect of the lectin PHA on the feeding behavior of the grain aphid. **Journal of Pest Science**, v. 83, p. 149-155, 2010.

SUNG W.S., LEE D.G. Antifungal action of chlorogenic acid against pathogenic fungi, mediated by membrane disruption. **Pure and Applied Chemistry**, 82, 219–226. 2010.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Plant physiology**. California, The Benjamin/Cummings Publishing Co., 1998, 559 p.

TAVARES, C. C. S. **Avaliação do efeito sinérgico dos compostos voláteis de frutos de *Annona squamosa* com o feromônio sexual na atração de machos de *Cerconota anonella* (Lepidoptera: Depressariidae) e da atividade inseticida da casca de *Genipa americana* sobre machos e fêmeas desta espécie**. Tese – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. PPGQB. Maceió, 2021.

THEICHEL, M.; KIST, B.; SANTOS, C.; CARVALHO, C.; BELING, R. Anuário Brasileiro de Fruticultura 2016. Editora Gazeta Santa Cruz: Santa Cruz do Sul, 2016.

VANDENBORRE, G et al. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry**, v. 72, n. 13, p. 1538-1550, 2011.

VASCONCELOS-FILHO, Francisco Sérgio Lopes et al. Natural History and Biological Aspects of Dipsadidae snakes: *P. olfersii*, *P. patagoniensis* and *P. nattereri*. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 9, n. 3, p. 386-399, 2015.

WAR, A. R.; PAULRAJ, M. G.; AHMAD, T.; BUHROO, A. A.; HUSSAIN, B.; IGNACIMUTHU, S.; SHARMA, H. C. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. **Plant Signaling & Behavior**. 7:10, 1306-1320. 2012.

WALSKI, T.; VAN DAMME, E. J. M.; SMAGGHE, G.. Penetration through the peritrophic matrix is a key to lectin toxicity against *Tribolium castaneum*. **Journal of insect physiology**, v. 70, p. 94-101, 2014.

WOJCIECHOWSKA E., WEINERT C.H., EGERT B., TRIERWEILER B., SCHMIDT-HEYDT M., HORNEBURG B., GRAEFF-HONNINGER S., KULLING S.E., GEISEN R. Chlorogenic acid, a metabolite identified by untargeted metabolome analysis in resistant tomatoes, inhibits the colonization by *Alternaria alternata* by inhibiting alternariol biosynthesis. **European Journal of Plant Pathology**, 139, 735–747. 2014.

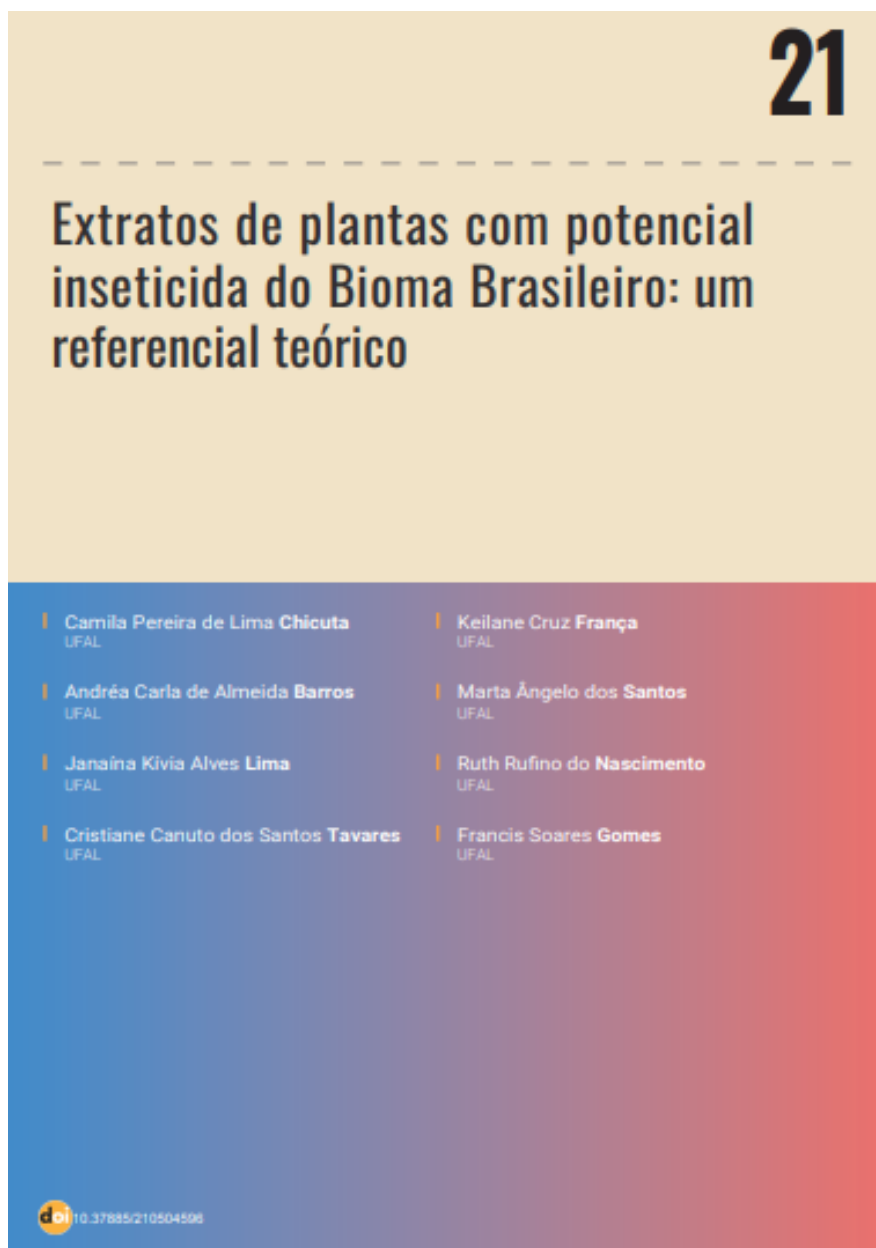
XIE, M. et al. Lectin-modified trifunctional nanobiosensors for mapping cell surface glycoconjugates. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 1311-1317, 2009.

YAMASHITA, K.; OHKURA, T. Determination of Glycan Motifs Using Serial Lectin Affinity Chromatography. **Lectins**, v. 1200, p. 79–92, 2014.

YOUNG, Brian Jonathan et al. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, p. 182-186, 2012.

ZHANG, C. et al. *Momordica Charantia* lectin exhibits antitumor activity towards hepatocellular carcinoma. **Investigational New Drugs**, v. 33(1), p. 1–11, 2015.

ZAPATA, N., VAN DAMME, E. J., VARGAS, M., DEVOTTO, L., & SMAGGHE, G. Insecticidal activity of a protein extracted from bulbs of *Phycella australis* Ravenna against the aphids *Acyrtosiphon pisum* Harris and *Myzus persicae* Sulzer. **Chilean journal of agricultural research**, 76(2), 188-194. 2016.

APÊNDICE – PUBLICAÇÕES E PREMIAÇÕES ADQUIRIDOS DESTA TESE**Capítulo de livro**

Artigo Publicado no Período do Doutorado



Full length article

Evaluation of an eco-friendly botanical extract against *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) and its composition

Camila Pereira de Lima Chicuta^a, Janafna Kívia Alves Lima^b, Cláudio Wilian Victor dos Santos^a, Marília Layse Alves da Costa^c, Hugo Juarez Vieira Pereira^a, Ruth Rufino do Nascimento^a, Aldenir Feitosa dos Santos^c, Cenira Monteiro de Carvalho^a, Luciano Aparecido Meireles Grillo^b, Francis Soares Gomes^{a,*}

^a Institute of Chemistry and Biotechnology, Federal University of Alagoas, 57072-900 Maceió, Alagoas, Brazil

^b Institute of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Alagoas, 57072-900 Maceió, Alagoas, Brazil

^c Department of Chemistry, State University of Alagoas, Arapiraca, Alagoas, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Pest control
Phytochemical analysis
Lectin
Biopesticide

ABSTRACT

The red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae), is one of the most damaging grain insect pests in the storage products industry. The acquired resistance to synthetic pesticides and the high toxicity of these compounds on non-target organisms have led to an increase in the search for biopesticides. Thus, the present study aimed to analyze, for the first time, the chemical composition of the extract of *Crotalaria stipularia* Desv. seeds and its insecticidal activity against *T. castaneum* adults. Therefore, the crude extract (5 % w/v) of *C. stipularia* seeds was performed in a 50 mM Tris – HCl pH 8.0. Lectin and secondary metabolites such as flavones, flavonols, xanthones and saponins were detected in the extract. The extract (10 % w/v) of *C. stipularia* caused 100 % mortality against *T. castaneum* insects and exhibited moderate deterrent activity, resulting in a 70 % reduction in food consumption compared to their normal intake. Furthermore, the aqueous extract exerted antinutritional effects, interfering with the metabolism of proteins, cholesterol, triglycerides and carbohydrates, and abolished the hatching of eggs of the treated insects. The phytotoxicity test revealed that the extract of *C. stipularia* is not toxic to non-target organisms, as it did not affect the germination of lettuce (*Lactuca sativa*) seeds. These results support the search for integrated management strategies for the control of *T. castaneum* using a new biomaterial obtained from *C. stipularia* seeds.

Prêmio de Excelência Acadêmica pelo Artigo Publicado

