

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

KEILANE CRUZ FRANÇA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO, FRAÇÃO PROTEICA E LECTINA DA
CASCA DE *Genipa americana* L. SOBRE A BROCA DOS FRUTOS DAS
ANONÁCEAS *Cerconota anonella* (LEPIDOPTERA: DEPRESSARIDAE)**

Maceió

2022

KEILANE CRUZ FRANÇA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO, FRAÇÃO PROTEICA E LECTINA DA
CASCA DE *Genipa americana* L. SOBRE A BROCA DOS FRUTOS DAS
ANONÁCEAS *Cerconota anonella* (LEPIDOPTERA: DEPRESSARIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Francis Soares Gomes

Maceió

2022

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

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

F815a França, Keilane Cruz.

Avaliação do efeito do extrato, fração proteica e lectina da casca de *Genipa americana* L. sobre a broca dos frutos das anonáceas *Cerconota anonella* (Lepidoptera: Depressariidae) / Keilane Cruz França. – 2022.
80 f. : il. color.

Orientador: Francis Soares Gomes.

Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2022.

Bibliografia: f. 66-80.

1. *Annonaceae*. 2. Broca dos frutos. 3. Inseticidas naturais. 4. Manejo integrado. 5. Lectinas. I. Título.

CDU: 634.41



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins

57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144

Email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de dissertação da mestranda **KEILANE CRUZ FRANÇA** intitulada: “**Avaliação do efeito do extrato, da fração proteica e da lectina da casca de Genipa americana sobre a broca dos frutos das anonáceas Cerconota anonella (Lepidoptera: Depressaridae)**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 1º de abril de 2022, às 14 h, por meio de videoconferência.

Maceió, 1º de abril de 2022.

Comissão Examinadora:

Dra. JANAÍNA KÍVIA ALVES LIMA
Examinadora Externa à Instituição

Prof. Dr. Luciano Aparecido M. Grillo
Coordenador PPGCF / UFAL
SIAPE 1663558
Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo
Coordenador do PPGCF/UFAL

Dr. LUCIANO APARECIDO MEIRELES GRILLO, UFAL
Examinador Externo ao Programa

Dr. HUGO JUAREZ VIEIRA PEREIRA, UFAL
Examinador Interno

Dr. FRANCIS SOARES GOMES, UFAL
Presidente

Aos meus pais, Etã Cruz e Marcos
França, por toda dedicação, amor e
ensinamentos a mim concedidos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pelo entendimento. Por conhecer e suprir todas as minhas necessidades. Pelo acesso à sua viva e eficaz Palavra (Hebreus 4.12) que me mostra o caminho, me ergue e revela minha identidade em Cristo. Por todas as bênçãos e pelo seu amor incondicional e incalculável. Ele me deu honra e poder sobre toda a Sua criação (Salmos 8), por isso me sinto incentivada à pesquisa de produtos naturais. Glória, pois, a Ele!

Aos meus pais, Etã e Marcos, por estarem sempre ao meu lado, por todo amor, conselhos, apoio e incentivo. Vocês são os melhores!

Ao meu irmão, Yuri, por todos os momentos de descontração e risos.

Ao meu namorado David, por todo amor, carinho e palavra de ânimo.

Às minhas avós Terezinha e Maria das Graças (*In memoriam*) pela palavra de tranquilidade e sabedoria que ainda hoje me lembro e me serve em dificuldades.

Ao meu tio Edno, às minhas tias Maria, Deva e Mônica e aos meus primos Quednis, Leila, Queila e Quedma que me ajudaram de diversas maneiras e sempre comemoraram juntamente comigo as minhas vitórias.

Ao Prof. Dr. Francis Soares Gomes pelos ensinamentos desde o curso de graduação, pela tranquilidade, paciência e por ter me conduzido a mais uma conquista tão almejada.

Aos doutorandos Cledson Barros, Cristiane Tavares, Camila Chicuta, Monizy Costa, Marta Oliveira e Andréa Barros pelos bons momentos, ajuda e por compartilharem seus conhecimentos comigo.

À mestrandia Marta Ângelo pela amizade desde a graduação.

A todos os colegas do Laboratório de Metabolismo e Proteômica, Laboratório de Ecologia Química e Laboratório de Bioquímica e Fisiologia pela parceria e pela disponibilidade em responder as dúvidas que por momentos surgem.

Aos professores e coordenadores do Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia que contribuíram na minha formação profissional.

Ao órgão de fomento, Capes, pela bolsa concedida.

Sou infinitamente grata a todos que contribuíram direta ou indiretamente nesta etapa da minha vida. Peço a Deus que os recompense com chuvas de bênçãos!

“Bem-aventurado o homem que acha sabedoria,
e o homem que adquire conhecimento;
porque é melhor a sua mercadoria do que
artigos de prata, e maior o seu lucro que o ouro
mais fino.”

Provérbios 3.13-14

RESUMO

A broca do fruto, *Cerconota anonella* (Sepp., 1830), é uma espécie pertencente à ordem Lepidoptera: Depressaridae, e considerada uma praga de anonáceas, que abrange, por exemplo, as espécies *Annona squamosa* (pinha) e *Annona muricata* (graviola). Os danos expressivos causados aos frutos são constatados pelo apodrecimento da polpa provocado por microrganismos oportunistas, como os fungos, que entram pelos orifícios produzidos pela alimentação das lagartas, o que faz reduzir seu valor comercial. Com o propósito de controlar esta praga, realiza-se o ensacamento dos frutos verdes utilizando sacos perfurados ou são empregados inseticidas químicos convencionais. No entanto, estes métodos necessitam de alta demanda de mão de obra e apresentam elevada toxicidade sobre o ambiente e organismos não-alvos, respectivamente. Neste sentido, é contínua a busca por produtos naturais isentos de toxicidade e efetivos no controle deste e demais insetos praga. O jenipapeiro (*Genipa americana* L.) pertence à família Rubiaceae e tem seu potencial inseticida já reconhecido. Dentre os compostos vegetais que podem atuar contra insetos estão as lectinas – proteínas ou glicoproteínas – que por se ligarem a carboidratos de forma específica e reversível, seus possíveis alvos são diversos, visto que nos corpos dos insetos existem uma variedade de estruturas de glicano e, por esse motivo, as lectinas têm sido bastante investigadas. Nesta perspectiva, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da ingestão do extrato, da fração lectínica e da lectina purificada da casca de *G. americana* em *C. anonella*. Para tanto, foi preparado o extrato bruto em Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 da casca da planta, a partir do qual foi obtida a fração proteica através do fracionamento salino com sulfato de amônio e, então, feito o isolamento da lectina por cromatografia de gel filtração. Estas amostras (extrato, fração proteica e lectina) foram inseridas na dieta artificial e os insetos foram observados quanto à sobrevivência e sua massa corporal por 7 dias. Após o término dos bioensaios, foram analisados o efeito deterrente e os efeitos sobre os parâmetros nutricionais dos insetos. Observou-se que o extrato de *G. americana* não apresentou efeito deterrente para as lagartas, mas causou alterações na conversão de alimento ingerido em biomassa, sendo observada a redução de peso em todas as repetições. Em relação aos insetos adultos, constatou-se que *G. americana* causou a mortalidade de até 80% em 3 dias. A fração proteica e lectina causaram deterrência alimentar e todas as amostras interferiram significativamente nos parâmetros nutricionais e perfil bioquímico. Com base nos resultados obtidos, este trabalho apresenta o potencial de *G. americana* sobre o desenvolvimento de lagartas e adultos de *C. anonella*, que pode ser usado em associação com outras estratégias no manejo integrado de pragas.

Palavras-chave: Anonáceas; broca dos frutos; inseticidas naturais; manejo integrado; lectina.

ABSTRACT

The fruit borer, *Cerconota anonella* (Sepp., 1830), is a species belonging to the order Lepidoptera: Depressaridae, that is considered a pest of Annonaceae, which includes, for example, the species *Annona squamosa* (pine cone) and *Annona muricata* (soursop). The significant damage caused to the fruits is evidenced by the rotting of the pulp caused by opportunistic microorganisms, such as fungi, which enter through the holes produced by the caterpillars feeding, which reduces their commercial value. In order to control this pest, green fruits are bagged using perforated bags or conventional chemical insecticides are used. However, these methods are labor intensive and have high toxicity to the environment and non-target organisms, respectively. In this sense, the search for natural products free of toxicity and effective in the control of this and other insect pests is stimulated. The jenipapeiro (*Genipa americana* L.) belongs to the Rubiaceae family and has already recognized its insecticidal potential. Among the plant compounds that can act against insects are lectins - proteins or glycoproteins – which can bind to carbohydrates in a specific and reversible way and have many possible targets. Additionally, insecticidal activity of lectins have been extensively investigated since the bodies of insects have a variety of glycan structures. In this perspective, the present study aimed to evaluate the effect of ingestion of the extract, lectin fraction and purified lectin from the bark of *G. americana* on *C. anonella*. For this purpose, the crude extract was prepared in Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 from the bark, from which the protein fraction was obtained through saline fractionation with ammonium sulfate. Then, the lectin was isolated by gel filtration chromatography. These samples (extract, protein fraction and lectin) were inserted into the artificial diet and the insects were observed for survival and body mass for 7 days. After the end of the bioassays, the deterrent effect and the effects on the nutritional parameters of the insects were analyzed. It was observed that the extract of *G. americana* did not have a deterrent effect for the caterpillars, but it caused changes in the conversion of food ingested into biomass, with weight reduction being observed in all repetitions. Regarding adult insects, it was found that *G. americana* caused mortality of up to 80% in 3 days. The protein fraction and lectin caused food deterrence and all samples significantly interfered with nutritional parameters and biochemical profile. Based on the results obtained, this work presents the potential of *G. americana* on the development of caterpillars and adults of *C. anonella*, which can be used in association with other strategies in integrated pest management.

Keywords: Annonaceae; fruit borer; natural insecticides; integrated management; lectin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Importância dos insetos para o equilíbrio ecológico até serem considerados praga.	17
Figura 2. Diagrama geral do intestino do inseto. Setas pontilhadas representam o fluxo contracorrente de água e as setas sólidas, a circulação de enzimas digestivas que são deslocadas e recuperadas gradativamente, evitando a sua eliminação.	22
Figura 3. Aparelho bucal sugador-maxilar característico dos lepidópteros.	24
Figura 4. (A) Insetos adultos (fêmea e macho) de <i>Cerconota anonella</i> . (B) Fruto de graviola atacado por <i>C. anonella</i>	25
Figura 5. Invólucros de plástico, TNT vermelho e branco utilizados no ensacamento dos frutos das anonáceas.	26
Figura 6. (A) Aspecto geral, (B) tronco, (C) flor e (D) fruto de <i>Genipa americana</i>	27
Figura 7. Esquema ilustrativo da interação de lectina ao carboidrato através do Domínio de Reconhecimento a Carboidrato (DRC).	29
Figura 8. Classificação estrutural de lectinas de plantas.	30
Figura 9. Hemaglutinação e teste de inibição da atividade hemaglutinante. (a) A presença de lectina é detectada pela formação de uma rede de hemaglutinação. (b) O teste de AH é executado em placas de microtitulação. (c) A inibição da AH é revelada quando a ligação específica da lectina a carboidrato desfaz a formação da rede. C – Controle, CC – Carboidrato Competidor, CME – Carboidrato da Membrana de Eritrócito, E – Eritrócito, L – Lectina.	31
Figura 10. Representação das principais estruturas e moléculas como possíveis alvos para a ligação de lectina em insetos.	33
Figura 11. Representação de um bioensaio com adulto de <i>Cerconota anonella</i> (repetição 21), onde mostra o inseto se alimentando em um vidro de penicilina contendo um pedaço de algodão molhado com o tratamento em uma câmara de vidro.	40
Figura 12. Teste em semi-campo com extrato e fração proteica enriquecida de lectinas de <i>G. americana</i> colocada em armadilha tipo delta, indicada pela seta.	42
Figura 13. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier das lagartas de <i>C. anonella</i> mantidas em dieta artificial com extrato da casca de <i>G. americana</i> a 25%.	43

Figura 14. Efeito deterrente do extrato de casca de <i>G. americana</i> a 25% sobre lagartas de <i>C. anonella</i> em diferentes estágios (T1, T2 e T3).....	44
Figura 15. Parâmetros nutricionais de lagartas de <i>C. anonella</i> mantidas em dieta artificial contendo ou não extrato a 25% da casca de <i>G. americana</i> . (A) TCR = Taxa de consumo relativo indica a quantidade de dieta ingerida em mg por mg de massa corporal de insetos por dia; (B) TCRE = Taxa de crescimento relativo corresponde a quantidade de biomassa em mg adquirida por mg de massa corporal de insetos por dia; (C) ECI = Eficiência de conversão do alimento ingerido indica a quantidade de alimento ingerido pelos insetos convertido em biomassa em porcentagem.....	45
Figura 16. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de adultos de <i>C. anonella</i> mantidas em dieta artificial com diferentes doses do extrato da casca de <i>G. americana</i>	46
Figura 17. Efeito deterrente do extrato de casca de <i>G. americana</i> sobre adultos de <i>C. anonella</i>	48
Figura 18. Parâmetros nutricionais de adultos de <i>C. anonella</i> mantidos em dieta artificial preparada com Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (controle) ou com extrato em diferentes doses da casca de <i>G. americana</i> . (A) TCR = Taxa de consumo relativo indica a quantidade de dieta ingerida em mg por mg de massa corporal de insetos por dia; (B) TCRE = Taxa de crescimento relativo corresponde a quantidade de biomassa em mg adquirida por mg de massa corporal de insetos por dia; (C) ECI = Eficiência de conversão do alimento ingerido indica a quantidade de alimento ingerido pelos insetos convertido em biomassa em porcentagem.....	49
Figura 19. Perfil bioquímico do corpo macerado de adultos de <i>C. anonella</i> mantidos em dietas artificiais preparadas com Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (controle) ou com extrato de casca de <i>G. americana</i> em diferentes doses. (A) Proteínas totais em mg/mL; (B) colesterol em mg/mL; (C) triglicerídeos em mg/mL; (D) glicose em mg/mL.	50
Figura 20. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de adultos de <i>C. anonella</i> mantidas em dieta artificial com diferentes doses da fração proteica da casca de <i>G. americana</i>	52
Figura 21. Efeito deterrente da fração proteica de casca de <i>G. americana</i> sobre adultos de <i>C. anonella</i>	53
Figura 22. Parâmetros nutricionais de adultos de <i>C. anonella</i> mantidos em dieta artificial preparada com Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (controle) ou com diferentes concentrações da fração 0-20% da casca de <i>G. americana</i> . (A) TCR = Taxa de	

consumo relativo indica a quantidade de dieta ingerida em mg por mg de massa corporal de insetos por dia; (B) TCRE = Taxa de crescimento relativo corresponde a quantidade de biomassa em mg adquirida por mg de massa corporal de insetos por dia; (C) ECI = Eficiência de conversão do alimento ingerido indica a quantidade de alimento ingerido pelos insetos convertido em biomassa em porcentagem.....54

Figura 23. Perfil bioquímico do corpo macerado de adultos de *C. anonella* mantidos em dietas artificiais preparadas com Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (controle) ou com diferentes concentrações da fração 0-20% de casca de *G. americana*. (A) Proteínas totais em mg/mL; (B) colesterol em mg/mL; (C) triglicerídeos em mg/mL; (D) glicose em mg/mL.55

Figura 24. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de adultos de *C. anonella* mantidas em dieta artificial com diferentes doses da lectina da casca de *G. americana*.57

Figura 25. Efeito deterrente da lectina de casca de *G. americana* sobre adultos de *C. anonella*.....59

Figura 26. Parâmetros nutricionais de adultos de *C. anonella* mantidos em dieta artificial preparada com Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (controle) ou com diferentes concentrações da lectina da casca de *G. americana*. (A) TCR = Taxa de consumo relativo indica a quantidade de dieta ingerida em mg por mg de massa corporal de insetos por dia; (B) TCRE = Taxa de crescimento relativo corresponde a quantidade de biomassa em mg adquirida por mg de massa corporal de insetos por dia; (C) ECI = Eficiência de conversão do alimento ingerido indica a quantidade de alimento ingerido pelos insetos convertido em biomassa em porcentagem.60

Figura 27. Perfil bioquímico do corpo macerado de adultos de *C. anonella* mantidos em dietas artificiais preparadas com Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (controle) ou com diferentes concentrações da lectina de casca de *G. americana*. (A) Proteínas totais em mg/mL; (B) colesterol em mg/mL; (C) triglicerídeos em mg/mL; (D) glicose em mg/mL.61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tratamentos em diferentes concentrações de proteínas contra adultos de <i>C. anonella</i>	40
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH – Atividade hemaglutinante

AHE – Atividade hemaglutinante específica

DAG – diacilglicerol

DRC – Domínio de Reconhecimento a Carboidrato

ECI – Eficiência de conversão do alimento ingerido

GaBL – Lectina da casca de *Genipa americana* L.

ICMBIO – Instituto Chico Mendes

ID – Índice de deterrência

ILP – Peptídeo semelhante à insulina

IMA – Instituto do Meio Ambiente

LAMP – Laboratório de Metabolômica e Proteômica

LEQ – Laboratório de Ecologia Química

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MP – Membrana peritrófica

m/v – massa por volume

TCR – Taxa de consumo relativo

TCRE – Taxa de crescimento relativo

TAG – triacilglicerol

v/v – volume por volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Insetos-praga e seus impactos econômicos	17
2.2 Aplicação de extratos e proteínas inseticidas vegetais em campo	18
2.3 Mecanismo de defesa das plantas	20
2.4 Sistema digestório dos insetos	22
2.5 Ordem Lepidoptera	23
2.5.1 Espécie <i>Cerconota anonella</i>	24
2.6 A espécie <i>Genipa americana</i> L.	27
2.7 Lectinas	28
2.7.1 Funções biológicas de lectinas	32
2.7.2 Atividade inseticida de lectinas vegetais e seus mecanismos de ação.....	32
3. OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo geral	36
3.2 Objetivos específicos	36
4. METODOLOGIA	37
4.1 Coleta do material biológico	37
4.1.1 Obtenção da casca de <i>Genipa americana</i> L.....	37
4.1.2 Obtenção de <i>Cerconota anonella</i>	37
4.2 Preparação das amostras utilizadas nos bioensaios	38
4.3 Teste de hemaglutinação	38
4.4 Quantificação de proteínas	39
4.5 Bioensaios	39
4.6 Aspectos nutricionais	41
4.7 Efeitos de <i>G. americana</i> sobre o perfil bioquímico de <i>C. anonella</i>	41
4.8 Teste em semi-campo	41
4.10 Análise estatística	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	43
5.1 Efeito do extrato da casca de <i>G. americana</i> sobre lagartas de <i>C. anonella</i>	43
5.2 Efeito do extrato da casca de <i>G. americana</i> sobre adultos de <i>C. anonella</i>	46

5.3 Efeito da fração proteica da casca de <i>G. americana</i> sobre adultos de <i>C. anonella</i>	51
5.4 Efeito da lectina purificada (GaBL) da casca de <i>G. americana</i> sobre adultos de <i>C. anonella</i>	57
5.5 Aplicação da dieta artificial com extrato e fração proteica em semi-campo	63
6. CONCLUSÕES.....	64
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	65
REFERÊNCIAS.....	66

1. INTRODUÇÃO

A família Annonaceae abrange cerca de 2400 espécies em 108 gêneros e o seu cultivo tem recebido grande destaque na fruticultura brasileira em razão, principalmente, dos altos preços obtidos da polpa e da fruta com possibilidade para exportação (CHATROU et al., 2012; CAVALCANTE et al., 2016; SOBRINHO, 2014). A graviola, por exemplo, é muito utilizada na fabricação de produtos alimentícios, porém sua plantação exige cuidados constantes devido ao ataque de pragas (LEMOS, 2014; PASSOS, 2017).

A broca do fruto, *Cerconota anonella* (Sepp., 1830), é uma espécie pertencente à ordem Lepidoptera: Depressaridae e considerada uma praga de anonáceas, que inclui, por exemplo, as espécies *Annona squamosa* (pinha) e *Annona muricata* (graviola), causando grandes prejuízos aos produtores (PEREIRA et al., 2009). As fêmeas depositam seus ovos na superfície do fruto e, após a eclosão, as lagartas se abrigam com fios de seda em fendas naturais do fruto e roem a casca, destruindo a polpa e alojando-se nas sementes. A parte atacada escurece e endurece devido à ação provocada por microrganismos oportunistas, principalmente os fungos, que entram no fruto por meio dos orifícios produzidos na alimentação das lagartas, tornando-se inviável à comercialização (GALLO et al., 2002).

Não há muitos relatos recentes na literatura sobre os métodos de controle para esta espécie, mas já foram discutidos sobre o ensacamento dos frutos verdes utilizando sacos perfurados (BROGLIO-MICHELETTI et al., 2001), uso de parasitoides (BUSTILLO; PEÑA, 1992) e inseticidas (OLIVEIRA et al., 2017), porém se tornam inviáveis por alta exigência de mão de obra e em razão aos diversos problemas que a toxicidade de compostos químicos pode acometer ao aplicador e consumidor (DA SILVA et al., 2017).

Pelo exposto, o interesse por constituintes presentes em plantas tem aumentado progressivamente, pois podem ser uma excelente alternativa ecológica a fim de diminuir o uso de pesticidas (CHICUTA et al., 2021). *Genipa americana* é uma espécie de árvore frutífera que pertence à família Rubiaceae (COSTA et al., 2018) e dentre os seus compostos vegetais, que podem apresentar atividades biológicas, destacam-se as lectinas, proteínas capazes de se ligar seletiva e reversivelmente a

carboidratos de células e, devido à sua alta especificidade, têm sido utilizadas em biotecnologia no agronegócio (COELHO et al., 2017; DIAS et al., 2015).

A atividade inseticida de proteínas vegetais tem sido relatada contra diversas ordens de insetos. No entanto, seus mecanismos de ação ainda são pouco conhecidos e, por isso, tem despertado grande interesse nos últimos anos (PAIVA et al., 2011; WALSKI; VAN DAMME; SMAGGHE, 2014). Considerando a especificidade e habilidade de se ligar à carboidratos de forma reversível, os possíveis alvos das lectinas são diversos visto a variedade de estruturas de glicano que estão presentes nos corpos dos insetos, o que pode afetar parâmetros biológicos como peso larval, fecundidade, pupação e sobrevivência (MACEDO; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2015).

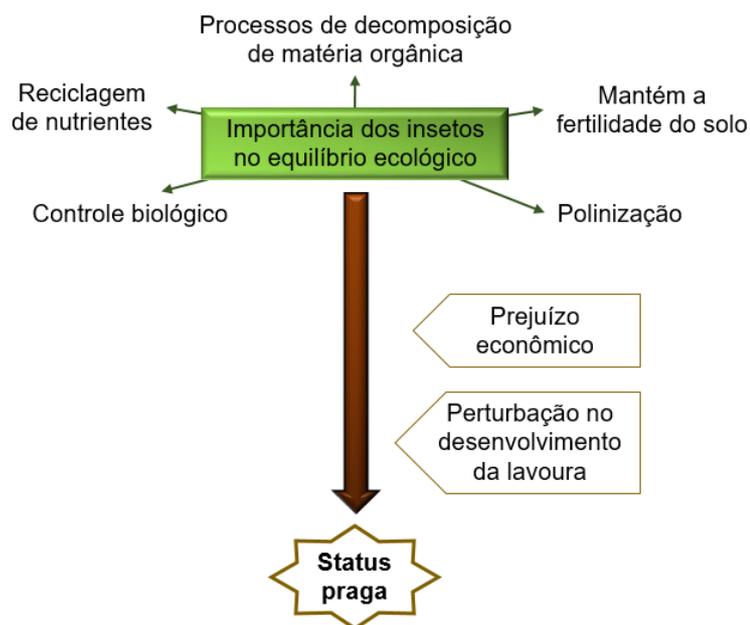
Ao considerar o potencial inseticida das lectinas bem como da espécie *Genipa americana* e que os estudos existentes centrados no controle da espécie *Cerconota anonella* ainda são escassos, o presente trabalho irá contribuir para o desenvolvimento de métodos eficazes de controle de insetos-praga, ao propor uma alternativa ecológica de importância econômica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Insetos-praga e seus impactos econômicos

O Brasil é considerado o país com maior diversidade de insetos no mundo (RAFAEL; AGUIAR; AMORIM, 2009). Embora seja comum serem vistos como nocivos, os insetos assumem diversos papéis importantes no ecossistema e ações benéficas à espécie humana. Dentre as vantagens estão a polinização das plantas, controle biológico, atuação em processos de decomposição de matéria orgânica, sendo um dos responsáveis pela reciclagem de nutrientes, além de manter a fertilidade do solo (RAFAEL et al., 2012). Entretanto, quando a população de insetos aumenta em níveis economicamente inaceitáveis, provocando perturbações no desenvolvimento da lavoura, então nesta situação o organismo é considerado praga (SUJII et al., 2020).

Figura 1. Importância dos insetos para o equilíbrio ecológico até serem considerados praga.



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

A agricultura brasileira é um setor primário gerador de renda para o país. Todavia, segundo Mitchell e colaboradores (2016), as perdas de safra ocasionadas por pragas de artrópodes podem exceder 15% ao ano. Dentre as formas de controle

populacional de insetos-praga, os agrotóxicos ainda são muito empregados no Brasil, apesar dos impactos negativos já conhecidos no meio ambiente e na saúde humana. Estudos têm comprovado danos ao ecossistema como a contaminação de reservatórios de água, rios e mares, infertilidade do solo e mortalidade de abelhas imprescindíveis para a polinização. Os efeitos colaterais na saúde humana por agrotóxicos já foram destacados em diversas pesquisas que mostram o aumento de casos de transtornos mentais (LONDON et al., 2012; FARIA et al., 2014), dores no corpo (CARGNIN; ECHER; DA SILVA, 2017), doenças respiratórias e intoxicações (ARAÚJO; OLIVEIRA, 2017; MEDEIROS; MEDEIROS; SILVA, 2014), bem como a alteração nos mecanismos de defesa celular em trabalhadores rurais, grupo que constantemente entra em contato com tais substâncias (LOPES; DE ALBUQUERQUE, 2018).

O uso frequente de inseticidas sintéticos também tem levado ao desenvolvimento de populações de insetos resistentes. Já foi relatada resistência de *T. castaneum*, importante praga de grãos armazenados, contra os pesticidas fosfina, malation, fenitrotion e pirimifos-metil (KARANIKI et al., 2019).

Considerando os efeitos deletérios decorrentes de agroquímicos, cada vez mais o mercado internacional tem colocado restrições a estes defensivos, resultando em uma queda global de 6% na produção (US\$ 64 bilhões) de acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2019). Diante disto, a biodiversidade da flora brasileira apresenta grande potencial no setor de agronegócio na prospecção de compostos bioativos que podem atuar no controle de insetos-praga (BRAGA E SILVA; SATO; RAGA, 2019).

2.2 Aplicação de extratos e proteínas inseticidas vegetais em campo

A substituição de agrotóxicos por extratos vegetais tem se mostrado uma alternativa ecológica promissora, pois suas moléculas bioativas geralmente não são persistentes no meio ambiente (CAMAROTI et al., 2017). Além disso, podem também apresentar seletividade contra o inseto-praga, resultando em menos efeitos sobre inimigos naturais das pragas, organismos não-alvo e humanos em comparação aos inseticidas químicos (NAPOLEÃO et al., 2018). Pelo exposto, a descoberta e a investigação de novas substâncias provenientes de plantas também pode ser útil a

fim de elaborar modelos de síntese de novos inseticidas (DE MORAIS; MARINHO-PRADO, 2016).

Estudos feitos em campo ou em casa de vegetação já demonstraram a eficácia de extratos vegetais contra insetos de diversas ordens. Giehl et al. (2021) utilizaram o método de pulverização de extrato alcoólico de folhas de cinamomo (*Melia azedarach* L.) contra a mosca branca (*Bemisia tabaci*), comprovando efeito positivo no controle da população da praga. Outra estratégia comumente empregada é o método de “atrai-e-mata”, onde um inseticida pode ser misturado a um atrativo alimentar de origem vegetal que seja específico para o organismo alvo, sem afetar insetos benéficos como aqueles úteis para a polinização (BOTTON et al., 2014; DA ROSA et al., 2014; GOTTEMS, 2017).

A aplicação do inseticida botânico também pode ser realizada via água de irrigação no solo (DE CARVALHO et al., 2015) ou usufruindo da nanotecnologia para encapsular compostos bioativos, atuando na proteção do extrato contra pH, umidade relativa, volatilização, degradação enzimática e por radiação ultravioleta. Desta forma, a nanopartícula, podendo ter seu material de parede constituído de polímeros naturais, potencializa a ação do biopesticida com um sistema de liberação controlada, evitando desperdício do produto por pulverização (DA COSTA, 2020; DE OLIVEIRA et al., 2014).

O uso de proteínas inseticidas vegetais em plantas transgênicas tem apresentado resultados positivos no controle de insetos (MOREIRA; MANSUR; FIGUEIRA-MANSUR, 2012). O consumo de dietas artificiais contendo lectinas purificadas ou a sua expressão em plantas geneticamente modificadas afetaram de forma negativa o desempenho de insetos pertencentes às ordens Lepidoptera, Coleoptera, Diptera e Hemiptera (VANDENBORRE; SMAGGHE; VAN DAMME, 2011).

A lectina de *Allium sativum* (ASAL) foi incorporada a diversas espécies de plantas transgênicas por meio de engenharia genética, como tabaco e mostarda indiana (*Brassica juncea*) e demonstrou toxicidade para hemípteros. O peptídeo a ser inserido na planta é codificado por um gene artificial que pode ser introduzido numa bactéria ou levedura, a fim de produzir o peptídeo em tubo de ensaio, ou numa planta para a evolução do melhoramento genético. Desta forma, as lectinas estão recebendo

grande notoriedade contra pragas sugadoras de seiva, como agentes inseticidas (VASCONCELOS, 2005; CHETTRI et al., 2021).

2.3 Mecanismo de defesa das plantas

As plantas são constituídas por carboidratos, proteínas, lipídeos, minerais, dentre outros compostos, sendo assim uma excelente fonte de nutrientes (DALLAGNOL; DE ARAÚJO FILHO, 2018). Constantemente, estão sujeitas a estresses que afetam de forma negativa o seu crescimento, desenvolvimento e produtividade. No decorrer do processo evolutivo das plantas, foram desenvolvidas respostas de defesa com a finalidade de superar o estresse biótico causado por patógenos e insetos-praga (SOARES; MACHADO, 2007; NOMAN et al., 2021).

A relação entre plantas e insetos ao longo dos anos permitiu benefícios mútuos entre as espécies, como a polinização, mas também o consumo de plantas por insetos provoca respostas dos mecanismos de defesa que consistem em diversas estratégias que as plantas utilizam a fim de resistir ou escapar destes predadores. As plantas são capazes de sintetizar e acumular elevados níveis de fitoquímicos que atuam na defesa como redutores de digestibilidade ou toxinas (CHICUTA et al., 2021).

A peça bucal do inseto pode ser classificada em mastigadora e sugadora, esta última se caracteriza pela ausência de mandíbula e a presença de um bico alongado por onde o alimento líquido é sugado, não havendo assim a mastigação. A sucção da seiva elaborada pode acarretar danos que resultam no retardamento do crescimento da planta ou que facilitam a transmissão de viroses e a entrada de compostos tóxicos (AOYAMA; LABINAS, 2012).

O mecanismo de defesa das plantas pode ser constitutivo ou induzido, podendo atuar de forma direta ou indireta sobre os insetos. No caso do mecanismo de defesa constitutiva, são as estruturas e os compostos químicos, como espinhos, tricomas, metabólitos primários e secundários, naturalmente produzidos pelas plantas, que impossibilitam a aproximação dos insetos. Enquanto o mecanismo de defesa induzida está relacionado a qualquer mudança na fisiologia e morfologia da planta ou à produção de metabólitos em resposta ao ataque dos insetos. O estudo dos mecanismos endógenos de resistência apresentados pelas plantas contra os

herbívoros permite uma maior compreensão a fim de elaborar estratégias alternativas para prevenção e manejo de injúrias de pragas (JOÃO; RAGA, 2016; HOWE; SCHALLER, 2008; BAKAZE; DZOMEKU; WUNSCHE, 2020).

As moléculas bioativas de plantas quando ingeridas por herbívoros podem causar efeitos deletérios desde a inibição da alimentação, redução do consumo alimentar, atraso no desenvolvimento, deformações e esterilidade até a mortalidade dos insetos (MARINHO-PRADO et al., 2018). A diversidade de produtos químicos apresentada pelos vegetais pode ser classificada como metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários são aqueles compostos que atuam diretamente no crescimento e desenvolvimento da planta, como os açúcares, lipídeos, aminoácidos e nucleotídeos. Já os metabólitos secundários pertencem a uma das três principais classes de moléculas: terpenos, compostos fenólicos e nitrogenados, que desempenham uma variedade de benefícios para a sobrevivência, desenvolvimento e na interação com os seres vivos (BORGES; AMORIM, 2020).

Na parede de uma célula vegetal existem receptores que reconhecem moléculas associadas ao ataque de herbívoros. Algumas plantas podem resistir ao ataque se adaptando fisicamente, ao criar cutículas mais grossas ou tricomas a fim de reduzir a quantidade de tecido que serve de alimento para o inseto, por exemplo. E podem reagir quimicamente, produzindo compostos tóxicos para os insetos. As defesas químicas envolvem duas vias hormonais: a via do ácido salicílico, que defende contra organismos, como os fungos que se alimentam de tecidos vivos; e a via do ácido jasmônico, que atua contra aqueles que matam a planta e contra insetos herbívoros (OWENS, 2019).

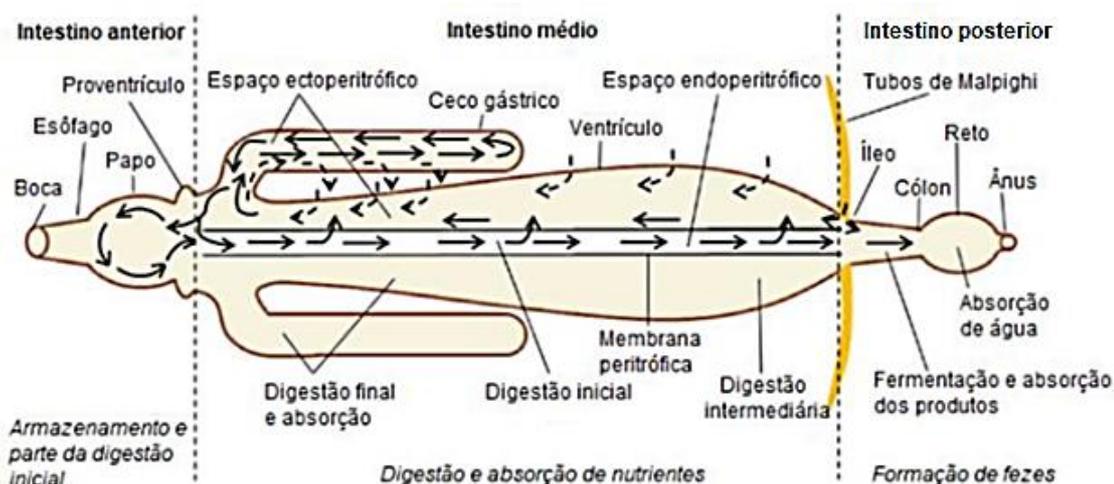
As plantas podem utilizar de seus compostos para tornarem-se menos atrativas resultando na dificuldade do inseto em localizá-la ou tornar o alimento inadequado. Os compostos produzidos durante o curso de crescimento e desenvolvimento do vegetal são acumulados e armazenados para que, quando atacado, atuem como um meio de dissuadir ou matar o inseto (JOÃO; RAGA, 2016). Plantas também utilizam compostos químicos para reduzir a disponibilidade de nutrientes para os insetos. Os taninos são exemplos de compostos secundários capazes de interferir no metabolismo e nos processos fisiológicos dos insetos. Aleloquímicos, como a nicotina ou furanocumarinas, e proteínas de defesa, como inibidores de proteases ou polifenol oxidases, podem interferir na digestão, ocasionando o retardo do crescimento dos

herbívoros (PINTO-ZEVALLOS et al., 2013; SHANTIBALA; LOKESHWARI; DEBARAJ, 2014).

2.4 Sistema digestório dos insetos

As funções digestivas em insetos representam um modelo riquíssimo de informações que possibilita a exploração de novos alvos moleculares (SILVA; LEMOS; DA SILVA, 2012). O tubo digestivo tem início na boca e termina no ânus e é dividido em três regiões funcionalmente distintas: intestino anterior, médio e posterior (Figura 2). O intestino anterior, localizado após a cavidade oral, é constituído de células achatadas e não diferenciadas e possui a função de ingestão, armazenamento, moagem e transporte de alimento até o intestino médio. Adicionalmente, a saliva apresenta enzimas que atuam sobre carboidratos, tais como amilases, maltase e invertase, auxiliando na digestão (CAMARGO et al., 2011).

Figura 2. Diagrama geral do intestino do inseto. Setas pontilhadas representam o fluxo contracorrente de água e as setas sólidas, a circulação de enzimas digestivas que são deslocadas e recuperadas gradativamente, evitando a sua eliminação.



Fonte: Adaptado de TERRA; FERREIRA, 2020.

No intestino médio ocorre a produção de enzimas digestivas e a absorção dos componentes mais simples derivados de proteínas, lipídeos e carboidratos. Os cecos gástricos encontrados na lateral possuem o formato de bolsas e age na manutenção de bactérias e outros microrganismos do tubo digestivo, além de preservar os produtores de enzimas e vitaminas. Os restos alimentares que não foram absorvidos

seguem para o intestino posterior, onde acontece a absorção de água e nutrientes essenciais antes que os excrementos sejam eliminados (GALLO et al., 2002).

Nos insetos da ordem Lepidoptera, pode-se observar células caliciformes no intestino médio que são responsáveis pelo alto pH nesta região e possui a função de eliminar o excesso de íons K^+ obtidos na ingestão de folhas pelas lagartas. A maioria dos lepidópteros adultos se alimentam exclusivamente de néctar, necessitando somente da α -glicosidase ou β -glicosidase para hidrolisar a sacarose presente no néctar, porém alguns deles apresentam ainda amilase nas glândulas salivares e várias peptidases no intestino médio (TERRA; FERREIRA, 2020).

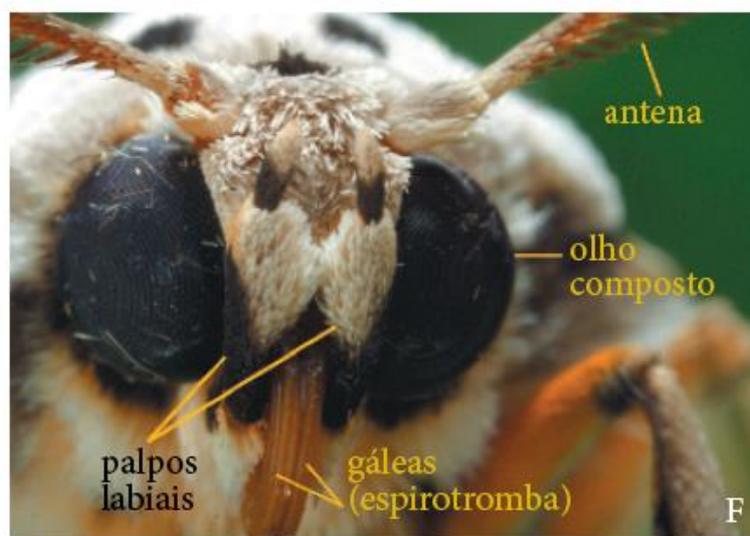
Os insetos mastigadores apresentam na região do intestino médio uma membrana acelular chamada membrana peritrófica composta por quitina e proteínas, a qual é considerada como uma barreira física complexa que possibilita a separação do bolo alimentar das células epiteliais, evitando danos à estrutura intestinal que poderiam ser causados pela abrasão decorrente da alimentação e de microrganismos. Já os insetos sugadores, como os adultos de lepidópteros, possuem uma membrana extracelular denominada membrana perimicrovilar. Sua função é semelhante à membrana peritrófica, entretanto é adaptada para o tipo de alimentação que estes consomem, como néctar, sangue e seiva (BOLOGNESI, 2005; PINTO, 2019). A membrana perimicrovilar envolve as células do intestino médio como dedos de luva (GAZARA et al., 2017) e atua como barreira protetora contra ataques de microrganismos e está envolvida na polimerização do heme, o qual previne o estresse oxidativo (ALVARENGA et al., 2016).

2.5 Ordem Lepidoptera

Os lepidópteros abrangem as borboletas e mariposas, as quais possuem asas membranosas cobertas por escamas, aparelho bucal sugador maxilar, que permanece enrolado enquanto está em repouso – espirotromba (Figura 3). A fêmea é, em geral, maior que o macho e o corpo destes insetos é densamente recoberto de pelos e escamas, enquanto seus olhos apresentam muitos omatídeos. O abdome possui formato cilíndrico, alongado, constituído por 10 urômeros, onde no primeiro urômero ou no metatórax estão situadas fendas no interior contendo o tímpano e órgãos responsáveis pela sensibilidade ao som. As lagartas que vivem dentro das

plantas abrindo câmaras são chamadas brocas e as suas glândulas labiais presentes entre o trato digestivo e a região lateral do corpo produzem o fio de seda que rapidamente se solidifica assim que entra em contato com o meio externo. Quando alcançam a última etapa larval, as lagartas param de se alimentar e vão em busca de um local apropriado a fim de passarem para a fase de pupa (GALLO, 2002).

Figura 3. Aparelho bucal sugador-maxilar característico dos lepidópteros.



Fonte: Adaptado de Fujihara et al., 2011.

A ordem Lepidoptera abrange cerca de 180.000 espécies distribuídas em 127 famílias e seu nome científico deriva de “*lepis*” que significa “escama” com “*pteron*”, que por sua vez quer dizer “asa”. A cor estrutural das asas das lepidópteras como aquelas com aparência metálica ocorre devido à difração da luz causada pela presença de estruturas microscópicas na superfície das asas e do corpo do inseto. Estas estruturas são células epidérmicas evaginadas e achatadas em forma imbricada, portanto o perfeito espaçamento entre as escamas interfere em suas cores que dependem da reflexão da luz incidida (ASSIS, 2013).

2.5.1 Espécie *Cerconota anonella*

Um dos fatores que limitam o cultivo das anonáceas são os insetos-praga que podem comprometer desde as sementes e frutos até a planta inteira. A *Cerconota anonella* é uma broca-do-fruto das anonáceas pertencente a ordem Lepidoptera (Depressaridae), responsável por causar danos expressivos ao fruto, reduzindo seu

valor comercial. Esta espécie de mariposa exibe coloração branco-acinzentada (Figura 4A) com reflexos prateados com três listras irregulares e curvas de coloração cinzenta nas asas (BITTENCOURT; SOBRINHO; PEREIRA, 2007).

O ciclo de vida total pode chegar a 30 dias. As lagartas quando emergem dos ovos protegem-se com fios de seda entre as fendas naturais dos frutos e após 3 a 4 dias, roem a superfície e se dirigem ao centro do fruto, alimentando-se da polpa e da semente em formação. O período larval é de 12 dias podendo apresentar coloração rosada a marrom ou verde-pardacenta se atacarem frutos apodrecidos. A duração da fase de pupa é de 10 dias e quando adulto, as fêmeas são capazes de depositar até 310 ovos nos frutos em diferentes estágios de desenvolvimento. A parte atacada torna-se enegrecida (Figura 4B), o que impossibilita a comercialização, e os frutos que ainda estão verdes apodrecem e caem. As câmaras construídas pelas lagartas para o interior do fruto favorecem a entrada de vários fungos patogênicos e insetos saprófitos (DA SILVA et al., 2017; SOBRINHO et al., 2011).

Figura 4. (A) Insetos adultos (fêmea e macho) de *Cerconota anonella*. (B) Fruto de graviola atacado por *C. anonella*.



Fonte: Adaptado de PIRES, 2013.

Dentre os inimigos naturais de *Cerconota anonella*, há registro da ocorrência de uma formiga arborícola, territorialista e agressiva conhecida por caçarema (*Azteca chartifex spiriti* Forel), em que foi possível observar que na presença da formiga não houve ataque da broca-do-fruto nos plantios de graviola. Entretanto, este controle biológico possui uma desvantagem, pois as caçaremas raspam os frutos, facilitando também a penetração de fungos (MOURA; BITTENCOURT, 2015). O método mais utilizado para proteção das anonáceas do ataque da *Cerconota anonella* é o ensacamento dos frutos (Figura 5), porém a alta exigência de mão de obra torna esse

procedimento inviável para os cultivos onde a quantidade de frutos é considerável (RAGA; GALDINO, 2019).

Figura 5. Invólucros de plástico, TNT vermelho e branco utilizados no ensacamento dos frutos das anonáceas.



Fonte: BRITO, 2010.

O controle químico ainda é bastante utilizado através de pulverizações com agrotóxicos à base de clorpirifós e cipermetrina (MOURA; BITTENCOURT, 2015). Apesar dos produtos químicos apresentarem eficácia e ação rápida, o uso destes compostos vem sendo reduzido devido à sua elevada toxicidade responsável por efeitos deletérios à saúde humana e ao meio ambiente. Além disso, o desenvolvimento de populações de insetos resistentes aos produtos disponíveis no mercado tem acelerado a busca por alternativas ecológicas capazes de atuar como controle de pragas a fim de amenizar os danos causados por inseticidas sintéticos (KARANIKÁ et al., 2019).

O interesse em extratos e proteínas vegetais tem sido crescente em consequência da comprovação de que biomoléculas podem atuar como bioinseticidas contra pragas de importância econômica (CHICUTA et al., 2021). Visto que a produção dos frutos das anonáceas tem grande destaque na fruticultura brasileira, são imprescindíveis estudos que estabeleçam métodos viáveis e sustentáveis para o controle de insetos-praga (CAVALCANTE et al., 2016).

2.6 A espécie *Genipa americana* L.

A *Genipa americana* L., conhecida popularmente como jenipapeiro, pertencente à família Rubiaceae, é uma árvore nativa da Amazônia, heliófita, semidecídua e seletivamente higrofítica, de copa estreita com até 14 m de altura (Figura 6A), seu tronco é liso e reto, medindo de 40 a 60 cm de diâmetro e suas folhas são simples, subcoriáceas e glabras de 15-35 cm de comprimento (Figura 6B). As flores são grandes de coloração branca (Figura 6C), inicialmente, passando para amarela após a fecundação e os frutos são bagas globosas tomentosas, de 8 a 10 cm de diâmetro, com exocarpo macio, fino e enrugado (Figura 6D). O mesocarpo é carnudo, amarelo e adocicado e as sementes são achatadas com coloração creme (LORENZI; MATOS, 2002; DE JESUS et al., 2019).

Figura 6. (A) Aspecto geral, (B) tronco, (C) flor e (D) fruto de *Genipa americana*.



Fonte: DA SILVA; LÉDO; DA SILVA JÚNIOR, 2020.

Amplamente distribuída na América Central e no Sul, incluindo no Brasil, não ocorrendo de forma natural somente no estado do Rio Grande do Sul (CNCFlora, 2012), o fruto de *Genipa americana* é utilizado na produção de licores, refrescos e doces, e o corante do fruto verde é empregado na pintura nos rituais indígenas. A madeira é usada na construção civil, naval e carpintaria. Todas as partes da planta são empregadas na medicina popular por terem propriedades antidiarreica, anti-inflamatória e diurética. Os frutos, folhas e cascas são indicados em casos de osteoporose, problemas estomacais, nervosismo, diabetes, colesterol além de combater mal-estar, fadiga e fraqueza. O chá das raízes é utilizado como purgativo e antigonorréico, a casca do tronco é considerada catártica e eficiente contra úlceras e

dores de várias origens. As folhas são indicadas contra sífilis e diarreia, enquanto os frutos maduros contra anemia, icterícia, asma, hidropsia e problemas do fígado e baço (ERBANO; DUARTE, 2010; ALVES, 2014; DE JESUS et al., 2019).

Muitos compostos fenólicos são descritos na literatura a partir dos frutos de *Genipa americana*, por exemplo, leucoantocianidinas, catequinas, flavanonas, antraquinonas, cumarinas e flavonóis, bem como triterpenóides e esteroides. A presença de flavonóides e iridóides no extrato da folha também foi associado com atividades biológicas (DE JESUS et al., 2020). O estudo fitoquímico da casca do caule revelou a presença de flavonas, flavonóis, xantonas, triterpenoides e saponinas (MENDES et al., 2017). Lima et al. (2020) comprovaram que o extrato da casca de *Genipa americana* é uma fonte de compostos inseticidas que afetam a mortalidade, fertilidade e os parâmetros nutricionais de adultos de *Tribolium castaneum*.

Dentre os compostos vegetais que podem apresentar atividades biológicas, destacam-se as proteínas e metabólitos secundários tais como compostos de nitrogênio (alcalóides, aminoácidos não-proteicos, aminas, alcalmidas, glicosídeos cianogênicos e glicosinolatos) e compostos não nitrogenados (monoterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos, sesquiterpenos, saponinas, flavonóides, esteróides, cumarinas). Dentre o grupo de proteínas, lectinas vêm sendo identificadas como princípio ativo da ação inseticida (PAIVA et al., 2012a).

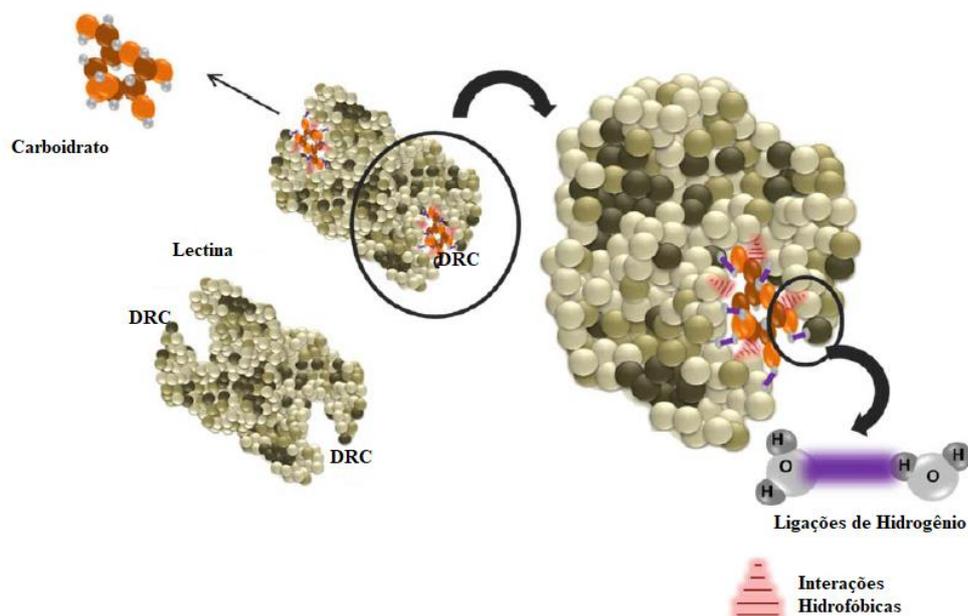
2.7 Lectinas

As lectinas são proteínas que possuem pelo menos um domínio não-catalítico capaz de se ligar a carboidratos com alta especificidade de maneira reversível, através de ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e de Van der Waals (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; COELHO et al., 2017).

A região na lectina em que ocorre estas interações é denominada Domínio de Reconhecimento a Carboidrato (DRC) (Figura 7), pelo qual as lectinas podem aglutinar células, como os eritrócitos, quando interagem com carboidratos da superfície celular. Esta classe de proteínas é de origem não imunológica, pois não são produtos de uma resposta imune, o que faz desta natureza uma característica que

difere de anticorpos anticarbohidratos os quais também apresentam a habilidade de promover a aglutinação das células (GOMES, 2013; DIAS et al., 2015).

Figura 7. Esquema ilustrativo da interação de lectina ao carboidrato através do Domínio de Reconhecimento a Carboidrato (DRC).



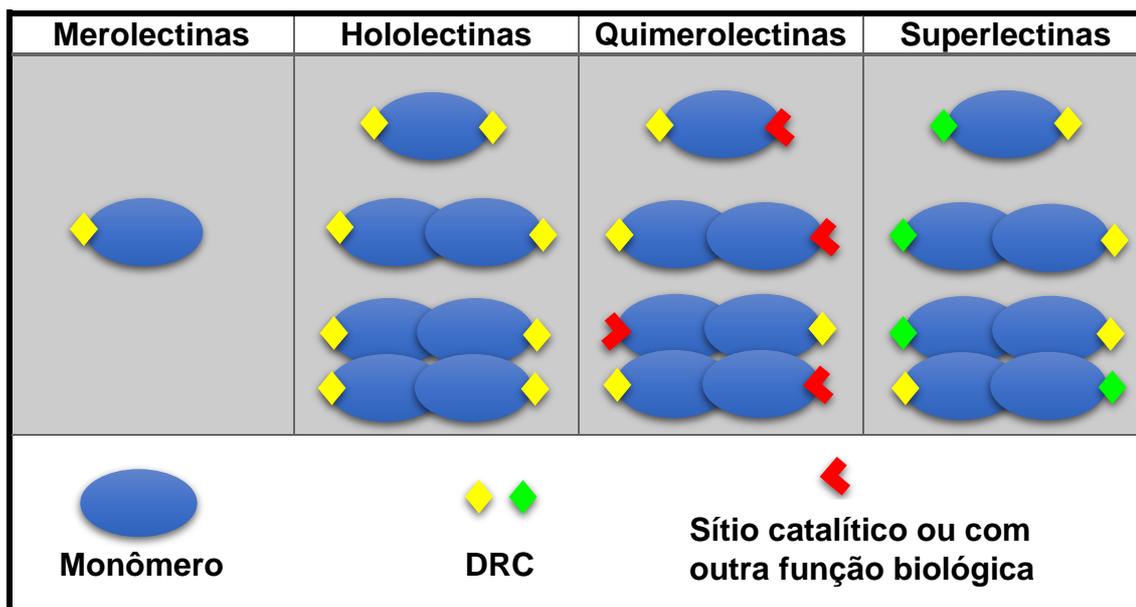
Fonte: Adaptado de Lino et al., 2013.

No que diz respeito à estrutura molecular, as lectinas além de diferir em relação à composição aminoacídica, apresentam diferenças quanto à massa molecular, estrutura tridimensional e dependência de metais a fim de se tornarem ativas para cumprir sua função biológica (VAN DAMME et al., 1998). Segundo Peumans e Van Damme (1998), as lectinas de plantas são classificadas, com base na sua estrutura geral, em merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas.

As merolectinas contêm exclusivamente um único domínio de ligação a carbohidratos, o qual se liga a açúcares simples, e não tem capacidade aglutinante devido ao seu caráter monovalente. As hololectinas possuem dois ou mais domínios de ligação semelhantes ou idênticos, sendo, portanto, di ou polivalentes com habilidade de aglutinar células e precipitar glicoconjugados. Enquanto as quimerolectinas consistem de um domínio de ligação a carboidrato e um domínio que apresenta função catalítica ou outra atividade biológica, atuando de forma independente do DRC. O grupo de lectinas com pelo menos dois domínios de ligação

distintos capazes de interagir com açúcares diferentes corresponde às superlectinas (Figura 8).

Figura 8. Classificação estrutural de lectinas de plantas.



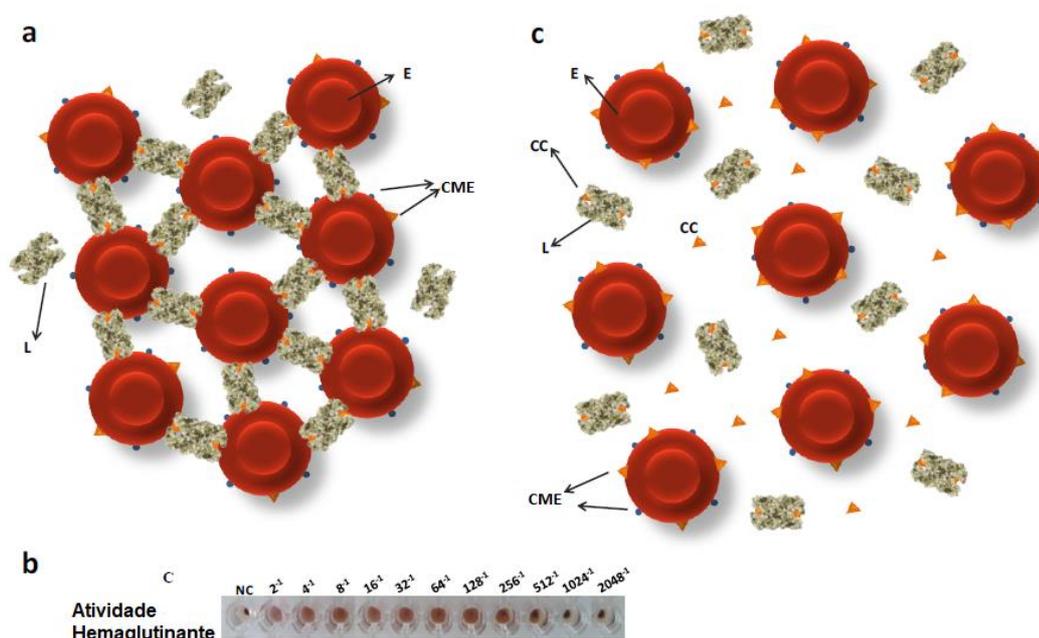
Fonte: Adaptado de Peumans; Van Damme, 1998.

A presença de lectinas pode ser detectada por meio do teste da atividade hemaglutinante (AH), que consiste na realização de uma diluição em série da amostra, seguida da adição de eritrócitos humanos ou de animais em placa de microtitulação. As lectinas, que possuem dois ou mais domínios (di ou polivalentes), se ligam aos carboidratos da superfície celular, formando uma rede entre os eritrócitos (Figura 9a e 9b). Assim, a atividade hemaglutinante corresponde ao inverso da última diluição em que ainda apresenta hemaglutinação e a atividade hemaglutinante específica (AHE), à razão entre a AH e a concentração de proteína (mg/mL) (CORREIA; COELHO, 1995; SHARON; LIS, 2001).

O efeito aglutinante não é suficiente para comprovar a presença da lectina, devido à possibilidade da existência de alguns compostos como taninos, lipídios ou íons bivalentes na amostra, os quais também possuem a habilidade de aglutinar células. A confirmação que o agente aglutinante é uma lectina é feita através do teste de inibição da AH, em que são utilizadas soluções de carboidratos livres que interagem com os domínios de ligação das lectinas, impossibilitando a interação com os carboidratos da superfície dos eritrócitos (Figura 9c). Por conseguinte, a formação da reticulação das células é impedida e os eritrócitos precipitam. Além de confirmar a presença de lectina, o teste revela os carboidratos específicos da lectina definidos

como aqueles que inibiram mais efetivamente a atividade hemaglutinante (SILVA, 2015).

Figura 9. Hemaglutinação e teste de inibição da atividade hemaglutinante. (a) A presença de lectina é detectada pela formação de uma rede de hemaglutinação. (b) O teste de AH é executado em placas de microtitulação. (c) A inibição da AH é revelada quando a ligação específica da lectina a carboidrato desfaz a formação da rede. C – Controle, CC – Carboidrato Competidor, CME – Carboidrato da Membrana de Eritrócito, E – Eritrócito, L – Lectina.



Fonte: Adaptado de Procópio et al., 2017.

O primeiro passo para a purificação da lectina é a preparação do extrato em solução aquosa, salina ou tampão (PAIVA et al., 2010). O extrato é frequentemente submetido ao processo de fracionamento salino que se baseia na adição de um sal que possibilita a precipitação seletiva de algumas proteínas, enquanto outras permanecem em solução (NELSON; COX, 2014). O sulfato de amônio é comumente utilizado por ser altamente hidrofílico, capaz de retirar a camada de solvatação das proteínas, fazendo com que elas precipitem e, posteriormente, sejam separadas (SILVA, 2015). O isolamento da lectina presente em uma mistura de proteínas pode ser realizado por métodos cromatográficos conforme a especificidade a carboidratos (cromatografia de afinidade), carga (cromatografia de troca iônica) ou tamanho (cromatografia de exclusão molecular) da molécula (PAIVA et al., 2011).

2.7.1 Funções biológicas de lectinas

Lectinas são amplamente distribuídas na natureza e têm sido isoladas de vírus, fungos, bactérias, invertebrados, organismos unicelulares, animais e plantas (DIAS et al., 2015). Devido à alta especificidade que as lectinas apresentam a carboidratos, estas proteínas agem como moléculas de reconhecimento no interior de uma célula, entre as células ou entre os organismos (CHRISPEELS; RAIKHEL, 1991).

Em plantas, lectinas estão presentes principalmente em cascas e sementes, mas também em bulbo, grão, raiz, folha, fruto, haste e flor (CORREIA; COELHO; PAIVA, 2008). Elas atuam no desenvolvimento e sinalização celular, participam do mecanismo de defesa contra o ataque de microrganismos, insetos e animais predadores, além de inibirem o crescimento de vários fungos fitopatogênicos e não patogênicos (SHARON; LIS, 2004; DIAS et al., 2015).

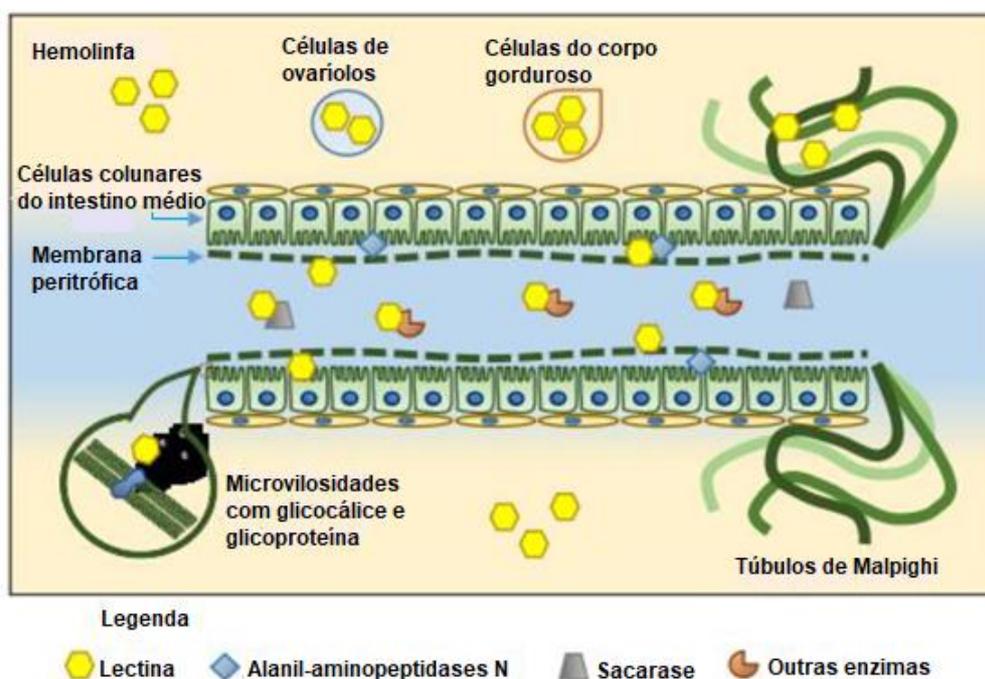
As lectinas possuem a habilidade de reconhecer carboidratos em células, seções de tecido, fluidos biológicos e, por isso, têm sido utilizadas como importantes ferramentas em biotecnologia no agronegócio, bem como em áreas de saúde humana e animal. Entre as diversas atividades das lectinas, alguns exemplos de aplicações são como agentes antitumorais, anti-inflamatórios, anti-helmínticos, antimicrobianos, biossensores de doenças e inseticidas (CARVALHO et al., 2015; DIAS et al., 2015; COELHO et al., 2017).

2.7.2 Atividade inseticida de lectinas vegetais e seus mecanismos de ação

Embora a estrutura do intestino dos insetos apresente várias estratégias defensivas, sua organização e função estão sujeitas a sofrer modificações por alguns compostos de plantas que são capazes de atuar como agentes inseticidas, incluindo proteínas bioativas a exemplo das lectinas. Considerando a sua especificidade e habilidade de se ligar à carboidratos de forma reversível, os possíveis alvos das lectinas são diversos (Figura 10) visto a variedade de estruturas de glicano que estão presentes nos corpos dos insetos, o que pode afetar parâmetros biológicos como peso larval, fecundidade, pupação e sobrevivência (MACEDO; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2015).

Lectinas inseticidas são geralmente resistentes à degradação proteolítica, podendo interagir com células e moléculas glicosiladas encontradas no intestino médio, comprometendo a síntese e a integridade da membrana peritrófica (MP), borda em escova bem como da camada de células secretoras de enzimas digestivas. Portanto, perturbação da integridade e redução da viabilidade das células intestinais digestivas podem levar a menores atividades enzimáticas no intestino médio dos insetos (CHETTRI et al., 2021; KARIMI; ALLAHYARI; BANDANI, 2012; VANDENBORRE; SMAGGHE; VAN DAMME, 2011; NAPOLEÃO et al., 2018).

Figura 10. Representação das principais estruturas e moléculas como possíveis alvos para a ligação de lectina em insetos.



Fonte: Adaptado de MACEDO; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2015.

Adultos de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera) que ingeriram uma lectina de folhas de *Myracrodruon urundeuva* (MuLL) tiveram atividades reduzidas de endoglucanase e fosfatase alcalina em seus intestinos (NAPOLEÃO et al., 2013). Para os insetos da ordem Lepidoptera, foi comprovado que a atividade das enzimas digestivas (α -amilase, α -glucosidase, lipase, tripsina, elastase e exopeptidase) das lagartas de *Helicoverpa armigera* que se alimentaram da lectina extraída de *Polygonum persicaria* inserida na dieta artificial foram significativamente menores comparado ao controle, bem como a quantidade de proteínas totais e glicogênio (RAHIMI et al., 2018). A lectina de *Dioclea violacea* causou a diminuição da atividade do tipo tripsina,

quimotripsina e α -amilase em lagartas de *Anagasta kuehniella*. Esta lectina ainda demonstrou ser resistente à proteólise por proteases do intestino médio por até 24 horas e, através da fluorescência, foi possível observar a ligação da lectina à membrana peritrófica (OLIVEIRA et al., 2015).

Após romper a matriz e as microvilosidades, as lectinas podem adentrar no epitélio intestinal e se acumular na hemolinfa, túbulos de Malpighi, ovários e corpos gordurosos (CHETTRI et al., 2021; NAPOLEÃO et al., 2018). A eficiência da lectina em atravessar a matriz peritrófica pode ser analisada por microscopia confocal e depende das dimensões da molécula, carga e tamanho dos poros da MP, sendo estas características que determinam a toxicidade dessas proteínas (WALSKI; VAN DAMME; SMAGGHE, 2014).

Estudos demonstraram que dietas contendo lectinas da casca, cerne ou folha de *Myracrodruon urundeuva* (MuBL, MuHL e MuLL, respectivamente), quando ingeridas por operárias de *Nasutitermes corniger*, causaram desorganização no epitélio do intestino médio como também foram observados detritos e células deformadas no lúmen e rompimento da borda do pincel (LIMA et al., 2017).

A lectina PF2 de sementes de *Olneya tesota* apresentou atividade inseticida contra larvas de *Zabrotes subfasciatus*, neste estudo foi possível identificar glicoproteínas como alvos para o reconhecimento da PF2 através da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LAGARDA-DIAZ et al., 2016). Além disso, foi possível verificar que PF2 pode-se ligar a proteínas envolvidas no metabolismo do ATP e, assim, afetar diretamente o metabolismo energético das células intestinais. A lectina isolada de *Schinus terebinthifolius* afetou na conversão dos alimentos em biomassa nos insetos (CAMAROTI et al., 2018). De Oliveira e colaboradores (2020) avaliaram que a lectina das sementes de *Moringa oleifera* foi capaz de afetar negativamente a fisiologia nutricional de adultos de *Sitophilus zeamais*.

Lectinas inseticidas foram também capazes de induzir apoptose e estresse oxidativo. A morte induzida por caspase foi detectada em um estudo *in vitro* avaliando os efeitos das lectinas de *Sambucus nigra* (SNA-I e SNA-II) em células do intestino médio da mariposa da espécie *Choristoneura fumiferana* (SHAHIDI-NOGHABI et al., 2011).

A microbiota simbiote presente no intestino anterior e médio de insetos pode afetar a nutrição do inseto (via produção de enzimas e metabolização de alguns nutrientes), desintoxicação e proteção contra patógenos. Portanto, a ação antimicrobiana de lectinas sobre os simbiotes pode ter relação com a sobrevivência dos insetos, consistindo em mais um mecanismo de ação. As lectinas termiticidas MuBL, MuHL e MuLL foram capazes de inibir o crescimento e matar o simbiote bacteriano encontrado no intestino de *N. corniger* (NAPOLEÃO et al., 2013).

A ação inseticida de lectinas não está restrita aos seus efeitos decorrentes da ligação direta a porção sacarídica de diferentes moléculas, podendo também dar-se de modo indireto, através da inibição na transcrição de diversos genes. 61 transcritos foram relatados como diferencialmente expressos em larvas de *Drosophila melanogaster* (Diptera) alimentadas com dieta contendo a lectina de gérmen de trigo (WGA). Esses genes estavam associados à organização do citoesqueleto, metabolismo da quitina, enzimas digestivas, reações de desintoxicação e metabolismo energético (LI et al., 2009).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade inseticida do extrato, da fração enriquecida de lectina e da lectina purificada da casca de *Genipa americana* contra *Cerconota anonella*.

3.2 Objetivos específicos

- Preparar o extrato da casca de *Genipa americana*;
- Realizar o fracionamento salino do extrato;
- Purificar a lectina da casca de *G. americana* a partir de protocolo pré-estabelecido;
- Avaliar o efeito do extrato da casca de *G. americana* contra lagartas de *Cerconota anonella* em condições de laboratório;
- Avaliar o efeito do extrato, fração lectínica e lectina isolada da casca de *G. americana* adultos de *Cerconota anonella* em condições de laboratório;
- Calcular parâmetros nutricionais (taxa relativa de ganho de biomassa, taxa de consumo relativo e eficiência de conversão do alimento ingerido) de lagartas e adultos de *C. anonella* que ingeriram a dieta artificial contendo as amostras de *G. americana*;
- Analisar os efeitos de *G. americana* sobre o perfil bioquímico (proteínas totais, triglicerídeos, colesterol e glicose) de *C. anonella*;
- Testar extrato e fração lectínica em semi-campo.

4. METODOLOGIA

4.1 Coleta do material biológico

4.1.1 Obtenção da casca de *Genipa americana* L.

As cascas do caule de *Genipa americana* L. foram coletadas de diferentes espécimes situados no município de Coruripe, Alagoas, e armazenadas em sacos plásticos transparentes. O material vegetal foi transportado para o Laboratório de Metabolômica e Proteômica da Universidade Federal de Alagoas (LAMP/UFAL), onde foi limpo e triturado em liquidificador para a obtenção de um pó fino. Após a secagem, o pó resultante foi acondicionado no freezer a -20°C.

Esta coleta foi autorizada pelo Instituto Chico Mendes (ICMBIO), número de processo 61847-2, e a identificação das exsiccatas de *G. americana* foi realizada previamente no herbário do Instituto de Meio Ambiente de Alagoas – IMA.

4.1.2 Obtenção de *Cerconota anonella*

Os insetos de *Cerconota anonella* utilizados neste trabalho foram obtidos em frutos de *Annona muricata* (graviola) infestados, coletados em pomares na Cooperativa Pindorama, localizada no município de Coruripe, Alagoas (10°09'54"S; 36°21'07"W). Os frutos maduros e verdes que apresentavam sinais que tinham sido atacados pela praga foram conduzidos para o Laboratório de Ecologia Química (LEQ) da UFAL, onde foram depositados em gaiolas de madeira (30 cm de largura x 30 cm de comprimento x 30 cm de altura) com tela nas laterais.

Sete dias após a coleta, os frutos foram abertos para a remoção das lagartas, com o auxílio de luvas e pinças, e então separadas em três estágios: estágio inicial, que corresponde a 1 a 4 dias de idade, denominada T1; estágio intermediário, de 5 a 9 dias, sendo nomeada de T2; e estágio final representando a fase de 10 a 14 dias, T3. Quanto aos adultos, assim que emergiram, rapidamente foram separados para a realização dos bioensaios.

4.2 Preparação das amostras utilizadas nos bioensaios

Todas as amostras (extrato, fração proteica e lectina) empregadas nos bioensaios foram preparadas conforme foi descrito por Costa e colaboradores (2018). Para a obtenção do extrato, na proporção de 1:4 (m/v), 10 g do pó foram pesados e adicionados a 40 mL de Tris-HCl 50 mM pH 8,0, sob agitação suave por 12 h circundado por gelo. Após a filtração da mistura, o precipitado foi descartado e o filtrado, submetido à centrifugação por 15 min, 15000 × g a 4 °C. O precipitado resultante foi descartado e o sobrenadante denominado extrato bruto, mantido então sob refrigeração.

O extrato foi submetido ao fracionamento salino com sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) 0-20% de saturação para a obtenção da fração enriquecida de lectinas. Após 1 h na geladeira, a solução resultante foi centrifugada por 15 min, 15000 × g a 4 °C e o precipitado, separado do sobrenadante. A este precipitado foi adicionado 1000 µL de Tris-HCl 50 mM pH 8,0 e, então, denominado de F0-20% (fração proteica), utilizada para obter a lectina isolada de *G. americana* (GaBL) por meio da cromatografia de gel filtração em matriz Sephacryl S-100.

4.3 Teste de hemaglutinação

O ensaio de atividade hemaglutinante foi executado em placa de 96 poços de microtitulação de acordo com a metodologia descrita por Paiva e Coelho (1992). Nos poços foram adicionados 50 µL de solução NaCl 0,15 M e, posteriormente, 50 µL do extrato bruto foi acrescentado no primeiro poço, homogeneizado e diluído serialmente. Desta forma, partindo de um volume total de 100 µL, 50 µL foi transferido para o poço seguinte até o último a fim de reduzir a sua concentração pela metade. Em seguida, 50 µL de uma suspensão de 2,5% (v/v) de eritrócitos de coelho em NaCl 0,15 M, tratados com solução Alsever (anticoagulante), foi adicionado em cada poço e mantida em repouso durante 45 min a temperatura ambiente. O cálculo da atividade hemaglutinante foi realizado considerando o inverso da última diluição que ainda apresentou hemaglutinação.

4.4 Quantificação de proteínas

A concentração de proteínas (mg/mL) foi determinada através do método de Bradford (1976) utilizando a curva-padrão de albumina de soro bovino. Neste procedimento, foram utilizados 5 µL das amostras (extrato bruto, F0-20% e GaBL), 5 µL de tampão (Tris-HCl 50 mM pH 8,0) e 190 µL de reagente de Bradford, resultando em uma amostra de 200 µL incubada por 5 min, medida a absorbância a 595 nm em uma placa de microtitulação.

4.5 Bioensaios

Os bioensaios foram realizados no Laboratório de Ecologia química da UFAL, em sala climatizada (24,1°C ± 1,2 e 65% UR ± 1,9), com fotoperíodo invertido (12:12h), através de uma adaptação do método descrito por Da Silva (2012) para lagartas e Dos Santos (2017) para adultos de *C. anonella*.

A dieta artificial para as lagartas nos três diferentes estágios foi composta pelos seguintes ingredientes: gérmen de trigo (20,25 g), cloridrato de colina (0,675 g), sais de Wesson (6,75 g), ácido ascórbico (2,70 g), farelo de soja (26,25 g), açúcar (33,75 g), nipagin (1,125 g), ácido sórbico (0,50 g), ágar-ágar (11,00 g), solução vitamínica (7,5 mL), formol (0,75 mL), ambrasinto (0,30 mL), vita gold (0,25 mL) e água destilada (600 mL). Na preparação do controle, foi adicionado Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (50 mL), enquanto para as lagartas que receberam o tratamento, foi acrescentado o extrato (50 mL) em Tris-HCl 50 mM pH 8,0 na concentração de 25%. Todos os bioensaios foram realizados com 20 repetições, depositando uma lagarta por placa de Petri, tendo sua sobrevivência e peso larval observados durante 7 dias.

Em relação aos adultos, foram realizadas 30 repetições (15 fêmeas e 15 machos), colocando em cada câmara de vidro (9 cm de largura x 16 cm de comprimento x 9,5 cm de altura) um inseto adulto e a dieta contendo 3 mL de solução de mel em água destilada (10%) e Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (10%) em um frasco penicilina de vidro para o controle. Para o tratamento com a amostra, foi preparada uma solução com 10 mL de mel, 10 mL do extrato bruto, F0-20% ou GaBL em Tris-HCl 50 mM pH 8,0 em diferentes concentrações e 80 mL de água destilada, o que resulta em uma solução de 100 mL distribuídos igualmente para as 30 repetições

(Figura 11). A sobrevivência e a pesagem dos adultos também foram avaliadas ao longo de 7 dias.

Figura 11. Representação de um bioensaio com adulto de *Cerconota anonella* (repetição 21), onde mostra o inseto se alimentando em um vidro de penicilina contendo um pedaço de algodão molhado com o tratamento em uma câmara de vidro.



Fonte: Autora, 2021.

Em todos os tratamentos foram utilizados 10 mL da amostra para compor a solução total de 100 mL na proporção de 1:10. A alteração para as diferentes dosagens era feita com a diluição com Tris-HCl 50 mM pH 8,0, modificando desta forma a concentração de proteínas (Tabela 1).

Tabela 1. Tratamentos em diferentes concentrações de proteínas contra adultos de *C. anonella*.

Concentração (μg de proteínas/mL de dieta)	Extrato			Fração			Lectina		
	E1	E2	E3	F1	F2	F3	L1	L2	L3
	30,00	50,00	70,00	15,00	25,00	35,00	7,00	10,00	16,00

Fonte: Autora, 2022.

4.6 Aspectos nutricionais

Após 7 dias de avaliação, foi possível determinar o índice de deterrência (ID) através da fórmula: $ID (\%) = 100 \times (A-B)/(A)$, 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 ($ID < 20\%$), fraca deterrência alimentar ($20\% < ID < 50\%$), moderada deterrência alimentar ($50\% < ID < 70\%$), ou forte deterrência alimentar ($ID > 70\%$) (LIU; GOH; HO, 2007).

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

4.7 Efeitos de *G. americana* 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 foram avaliados com o intuito de conhecer os possíveis efeitos da ingestão das preparações de *G. americana*. Para isto, 6 insetos adultos (3 machos e 3 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 Teste em semi-campo

Em um dos galhos de uma pinheira (*Annona squamosa*), localizada atrás do Laboratório de Ecologia Química/UFAL, cercada por tela em um espaço de 2,00 m x 2,00 m x 2,10 m, foi colocada uma armadilha tipo delta contendo um vidro de penicilina com algodão molhado por solução de 1 mL de mel, 1 mL de extrato ou fração proteica

e 3 mL de água destilada. Em seguida, foram colocados 10 insetos de *C. anonella* e após 24h, houve a verificação se algum inseto tinha sido capturado.

Figura 12. Teste em semi-campo com extrato e fração proteica enriquecida de lectinas de *G. americana* colocada em armadilha tipo delta, indicada pela seta.



Fonte: Autora, 2022.

4.10 Análise estatística

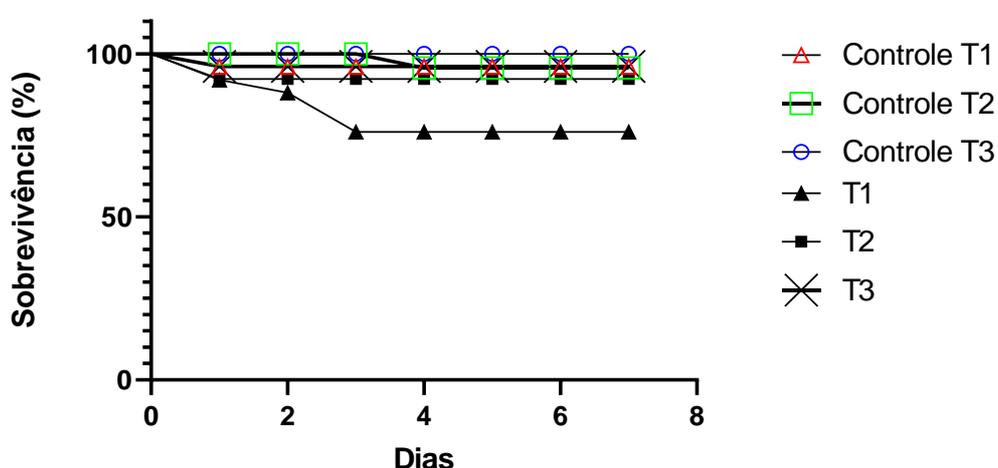
Os dados foram analisados pela ANOVA seguida de teste de *Tukey* para detecção de diferença significativa e comparação entre diferentes tratamentos. Os dados da mortalidade obtidos durante os 7 dias de observação foram utilizados para traçar a curva de sobrevivência de Kaplan-Meier. Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 6.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Efeito do extrato da casca de *G. americana* sobre lagartas de *C. anonella*

A ingestão do extrato da casca de *Genipa americana* pelas lagartas de *Cerconota anonella* resultou na mortalidade de 25%, 10% e 5% para as lagartas dos estágios T1, T2 e T3, respectivamente (Figura 13). Todos os outros insetos passaram para fase de pupa e, em seguida, emergiram sem defeito aparente. Assim, o extrato apresentou maior interferência na sobrevivência no estágio inicial de até 4 dias de vida da lagarta.

Figura 13. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier das lagartas de *C. anonella* mantidas em dieta artificial com extrato da casca de *G. americana* a 25%.

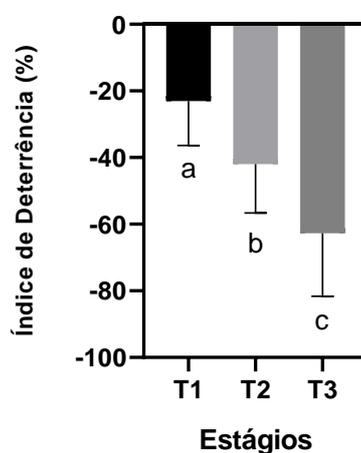


Fonte: Autora, 2021.

Em estudos com outras espécies de Lepidoptera, Biermann (2009) testou o extrato aquoso *Nicotiana tabacum* a 10% (m/v) contra lagartas de *Ascia monuste orseis*, onde foi observado que em laboratório a mortalidade chegou a 100% e em campo alcançou 91,43% em 7 dias. Os resultados obtidos por Tulashie e colaboradores (2021) mostraram que o extrato metanólico de folhas de nim e o extrato de óleo de semente de nim a concentração de 3% (v/v) e 5% (v/v) para ambos, resultaram na mortalidade larval acima de 80% para o primeiro extrato e 100% para o segundo contra *Spodoptera frugiperda*.

De Moraes e Marinho-Prado (2016) destacam que em lagartas de lepidópteros, um dos modos de ação está relacionado à capacidade de terpenos do tipo drimano bloquear os efeitos estimuladores de glicose, sacarose e inositol em células quimiorreceptoras presentes na parte bucal do inseto. O extrato da casca de *G. americana* na concentração de 25% não apresentou efeito deterrente nas lagartas (Figura 14). É possível que a presença de vários outros constituintes na dieta possa ter inibido biomoléculas no extrato ou a concentração da amostra não tenha sido suficiente para provocar o efeito deterrente, sendo necessário realizar alterações na constituição ou proporção da dieta artificial.

Figura 14. Efeito deterrente do extrato de casca de *G. americana* a 25% sobre lagartas de *C. anonella* em diferentes estágios (T1, T2 e T3).



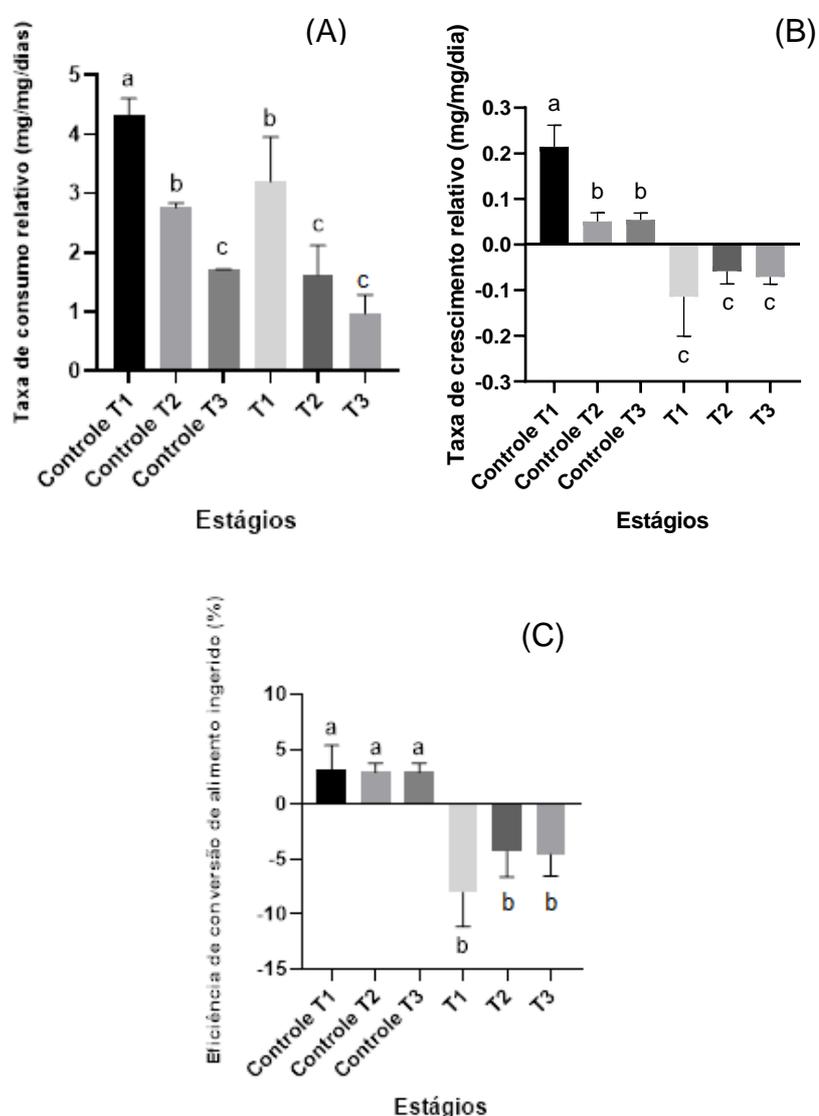
Fonte: Autora, 2021. Cada barra corresponde à média \pm DP de vinte repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos pelo teste de Tukey.

Substâncias oriundas de plantas podem apresentar atividade deterrente, sendo esta uma propriedade relevante pelo motivo de que algumas pragas possuem especificidade a determinadas espécies vegetais. Considera-se como deterrente alimentar qualquer substância capaz de reduzir a alimentação do inseto. Depois de provar o alimento, o inseto pode ser estimulado a seguir se alimentando (fagoestimulante) ou para parar de se alimentar (fagoinibitória). Essa ação deterrente pode ser consequência de uma ação direta dos metabólitos secundários sobre os receptores gustativos (MACHADO et al., 2009; MARINHO-PRADO et al., 2018).

Na avaliação dos parâmetros nutricionais das lagartas (Figura 15), foi possível observar que houve redução no consumo relativo da dieta em relação ao controle para

os três estágios testados. Além disso, a conversão de alimento consumido em biomassa também foi afetada pelo extrato, porém apesar de ser significativa a alteração no crescimento relativo em biomassa, as lagartas foram capazes de se desenvolverem, realizando sua metamorfose completa.

Figura 15. Parâmetros nutricionais de lagartas de *C. anonella* mantidas em dieta artificial contendo ou não extrato a 25% da casca de *G. americana*. (A) TCR = Taxa de consumo relativo indica a quantidade de dieta ingerida em mg por mg de massa corporal de insetos por dia; (B) TCRE = Taxa de crescimento relativo corresponde a quantidade de biomassa em mg adquirida por mg de massa corporal de insetos por dia; (C) ECI = Eficiência de conversão do alimento ingerido indica a quantidade de alimento ingerido pelos insetos convertido em biomassa em porcentagem.



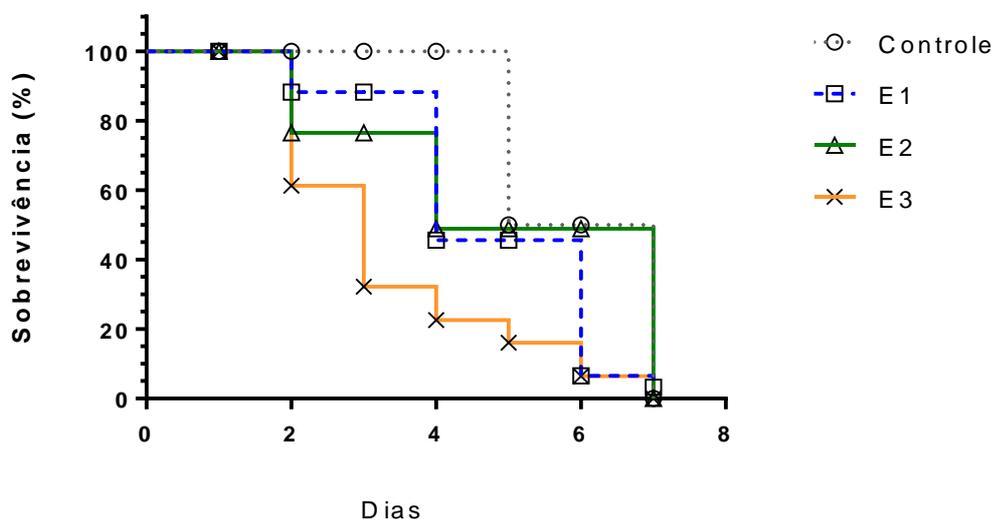
Fonte: Autora, 2021. Cada barra corresponde à média \pm DP de 20 repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos pelo teste de Tukey.

Datta e colaboradores (2019) obtiveram resultado semelhante ao testar o extrato bruto de *Alpinia galanga* em *Spodoptera litura* (Lepidoptera). Os autores comprovaram que o tratamento inserido na dieta artificial dos insetos afetou significativamente no crescimento e eficiência de conversão em biomassa. Oliveira e colaboradores (2015) ao testarem a lectina de *Dioclea violacea* em lagartas de *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera) constataram retardo no desenvolvimento e diminuição da massa larval sem afetar a sobrevivência.

5.2 Efeito do extrato da casca de *G. americana* sobre adultos de *C. anonella*

Nos bioensaios com os adultos de *C. anonella*, o extrato da casca de *G. americana* inserido na dieta artificial provocou a mortalidade de 10%, 25% e 40% em 2 dias nas concentrações a 30,0 (E1), 50,0 (E2) e 70,0 (E3) μg de proteínas/mL de dieta, respectivamente. A dose mais alta (E3) resultou na mortalidade de 70% já no terceiro dia, enquanto que no branco da amostra todos os insetos adultos ainda estavam vivos, apresentando mortalidade apenas a partir do quinto dia de experimento (Figura 16). Este resultado aponta que a porcentagem de adultos mortos é diretamente proporcional a concentração do extrato testado.

Figura 16. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de adultos de *C. anonella* mantidas em dieta artificial com diferentes doses do extrato da casca de *G. americana*.



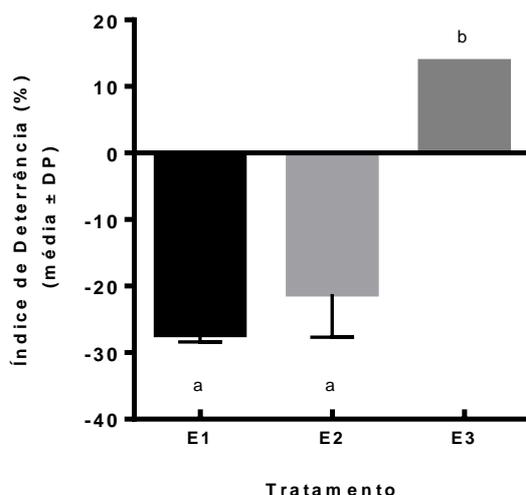
Fonte: Autora, 2021.

Ainda são escassos os estudos sobre *C. anonella*, especialmente em relação à busca de compostos bioativos para substituir agrotóxicos e o ensacamento de frutos que exige elevada mão de obra para o controle da praga. Brito (2010) testou o efeito bioinseticida por meio da pulverização de extratos aquosos de *Piper cf. aduncun* (10,0%), do pedúnculo do botão floral do craveiro-da-índia (*Syzygium aromaticum*) (5,0% e 10,0%), e do óleo emulsionável a base de nim (Neemseto©) (1,0%) sobre lagartas de *C. anonella* em laboratório. O uso do extrato aquoso de *P. cf. aduncun* (10,0%) resultou na mortalidade de 3,0% das lagartas, enquanto a aplicação do tratamento com o pedúnculo do botão floral do craveiro-da-índia (10,0%) ocasionou a morte de 10,71%, e 17,86% quando tratado com óleo emulsionável a base de nim (1%) após 12 horas de aplicação.

Brito ainda destaca que, em campo, no município de Marau (BA), além de terem sido testados os extratos por pulverização das duas espécies vegetais que apresentaram melhores resultados em laboratório, foram também avaliados o ensacamento com TNT vermelho, como também os dois métodos em conjunto (ensacamento do fruto pulverizado), onde o uso do TNT vermelho juntamente com o óleo emulsionável de nim a 1,0% demonstrou ser mais eficiente para proteger os frutos de graviola contra o ataque de *C. anonella*, correspondendo a 0,0% de frutos com danos, enquanto que o método empregado somente com a pulverização acarretou em 93,3% de frutos danificados pela praga. Os resultados apresentados neste trabalho apontam o extrato de *G. americana* como uma excelente alternativa para ser testado em campo associado com outras ferramentas para o controle do inseto.

A fim de elucidar os mecanismos que o extrato de *G. americana* promoveu em adultos de *C. anonella*, foram avaliados a deterrência alimentar e os parâmetros nutricionais. Conforme exposto na figura 17, apenas a maior dose (E3) apresentou taxa de inibição alimentar equivalente a 15%, no entanto de acordo com Liu e colaboradores (2007) não é classificada como efeito deterrente por estar abaixo de 20%.

Figura 17. Efeito deterrente do extrato de casca de *G. americana* sobre adultos de *C. anonella*.

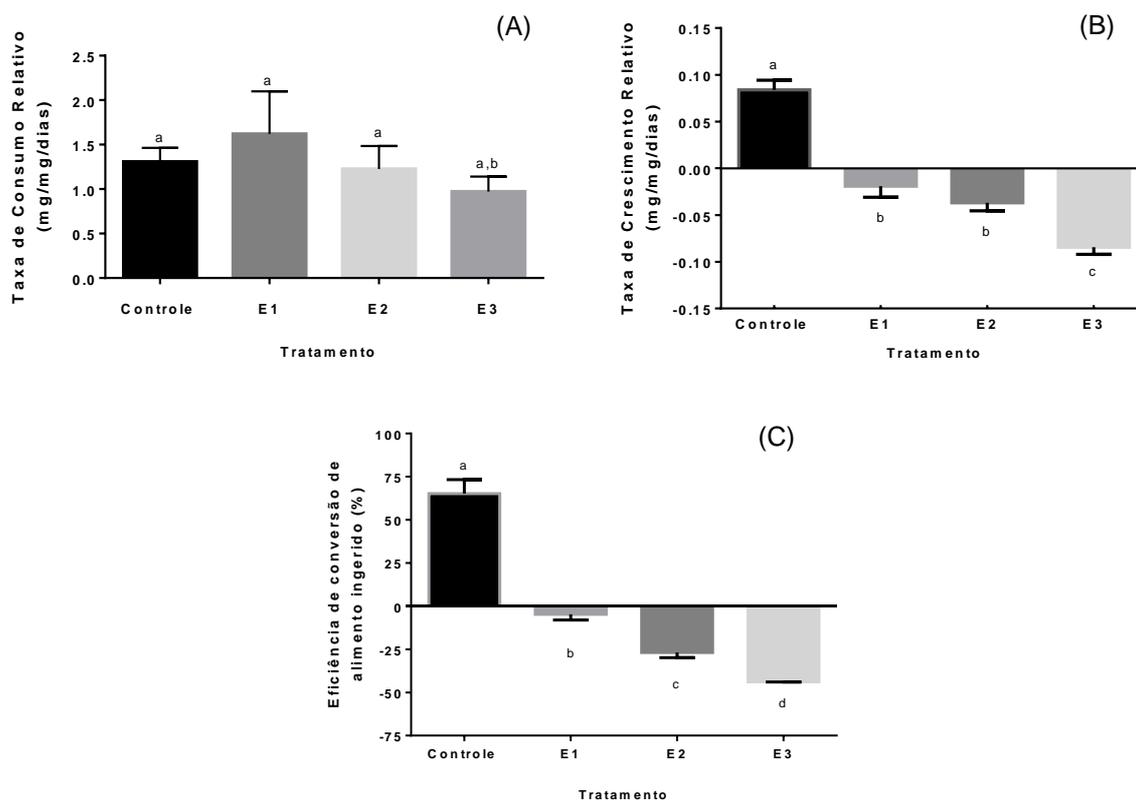


Fonte: Autora, 2021. Cada barra corresponde à média \pm DP de 10 repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos pelo teste de Tukey.

A análise dos parâmetros nutricionais de adultos de *C. anonella* evidenciou os efeitos deletérios causados pela ingestão do extrato. A taxa de consumo relativo (Figura 18A) não apresentou 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 ($P < 0,05$) menor do que no tratamento controle. Os valores negativos apresentados em (B) e (C) da figura 18 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, maiores eram os efeitos negativos no crescimento do inseto, comprovando o potencial antinutricional de *G. americana*. De acordo com Napoleão e colaboradores (2013), uma possível explicação para esses resultados é que altos níveis de extrato danificam os processos de digestão e absorção de nutrientes, dessa forma, os insetos são induzidos a metabolizar suas reservas corporais para sua sobrevivência, o que leva a perda de peso.

Figura 18. Parâmetros nutricionais de adultos de *C. anonella* mantidos em dieta artificial preparada com Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (controle) ou com extrato em diferentes doses da casca de *G. americana*. (A) TCR = Taxa de consumo relativo indica a quantidade de dieta ingerida em mg por mg de massa corporal de insetos por dia; (B) TCRE = Taxa de crescimento relativo corresponde a quantidade de biomassa em mg adquirida por mg de massa corporal de insetos por dia; (C) ECI = Eficiência de conversão do alimento ingerido indica a quantidade de alimento ingerido pelos insetos convertido em biomassa em porcentagem.



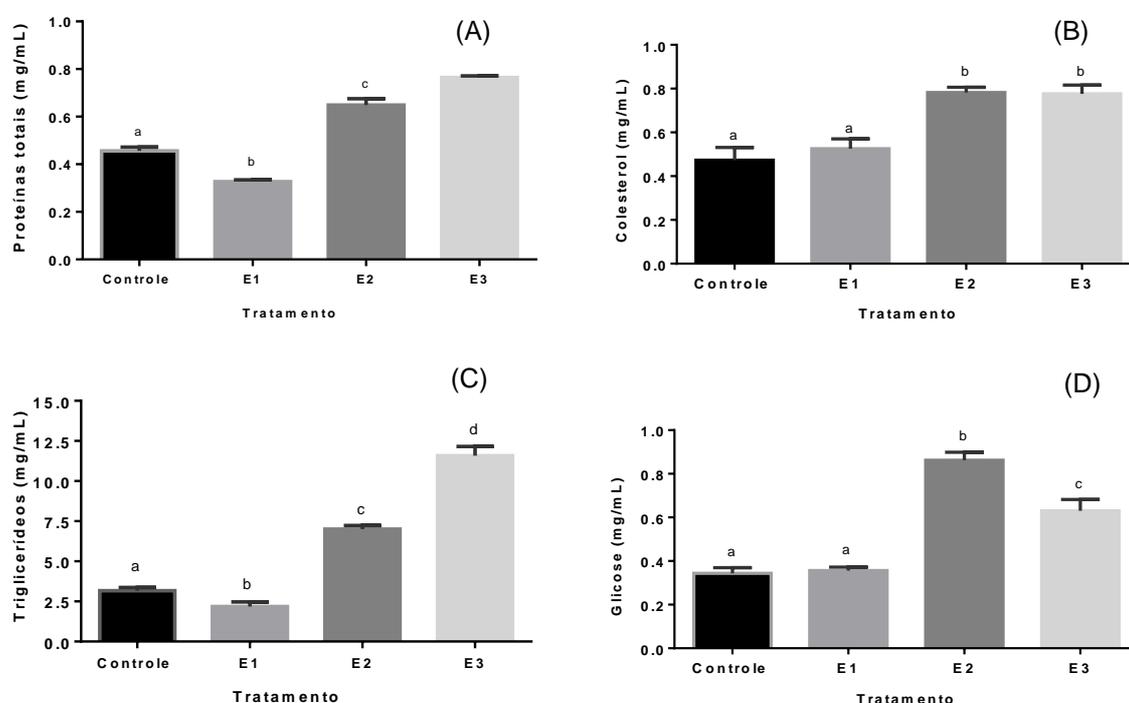
Fonte: Autora, 2021. Cada barra corresponde à média \pm DP de 10 repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos pelo teste de Tukey.

Com o intuito de avaliar a interferência do extrato de casca de *G. americana* nas principais moléculas utilizadas no metabolismo do inseto (ARRESE; SOULAGES, 2010), foram calculados os níveis totais de proteínas, colesterol, triglicerídeos e glicose. Os dados obtidos (Figura 19) mostraram que a ingestão do extrato provocou alterações nos perfis bioquímicos de *C. anonella*. Foi possível constatar que os níveis de proteínas aumentaram significativamente na dosagem E2 e, especialmente, E3, o que sugere ser consequência da ingestão de uma dieta rica em proteínas.

De maneira geral, quando as proteínas estão presentes em níveis elevados são decompostas em aminoácidos por enzimas proteolíticas, sendo as serino proteases

predominantes no intestino dos insetos pertencentes a ordem Lepidoptera, representando em torno de 95% da atividade proteolítica total (TREMACOLDI, 2009). Os insetos quando se alimentam de inibidores de proteases introduzidos na dieta artificial ou encontrados naturalmente no tecido da planta, geralmente têm seu crescimento, desenvolvimento e/ou sobrevivência afetados de forma negativa. Além disso, taninos, saponinas e terpenos são descritos como interferentes na estrutura e função das proteínas (PAIVA et al., 2012b; CHÁVEZ, 2016).

Figura 19. Perfil bioquímico do corpo macerado de adultos de *C. anonella* mantidos em dietas artificiais preparadas com Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (controle) ou com extrato de casca de *G. americana* em diferentes doses. (A) Proteínas totais em mg/mL; (B) colesterol em mg/mL; (C) triglicerídeos em mg/mL; (D) glicose em mg/mL.



Fonte: Autora, 2021. Cada barra corresponde à média \pm DP de 6 repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos pelo teste de Tukey.

Os níveis de colesterol também elevaram consideravelmente no tratamento com as duas maiores concentrações. Nos insetos, os lipídeos podem constituir estruturas celulares, atuar como hormônios e ainda ser fonte de reserva energética (AGUILAR, 2021). Os ácidos graxos absorvidos na dieta são convertidos a diacilgliceróis (DAG) nas células do intestino, e no corpo gorduroso, órgão central para o metabolismo, os DAG são convertidos a triacilgliceróis (TAG) para armazenamento. Os triglicerídeos armazenados podem ser usados para produção de energia por meio

da β -oxidação. Como as reservas de gordura são utilizadas pelos insetos a fim de fornecer energia em situação que exigem alta demanda metabólica, como períodos de postura das fêmeas e de voos prolongados (ARRESE et al., 2001; ATELLA; MAJEROWICZ; GONDIM et al., 2012), sugere-se que o elevado nível de triglicérides foi devido a algum componente do extrato ter provocado no organismo do inseto o reconhecimento sobre a urgência de mobilizar suas reservas para suprir suas necessidades fisiológicas.

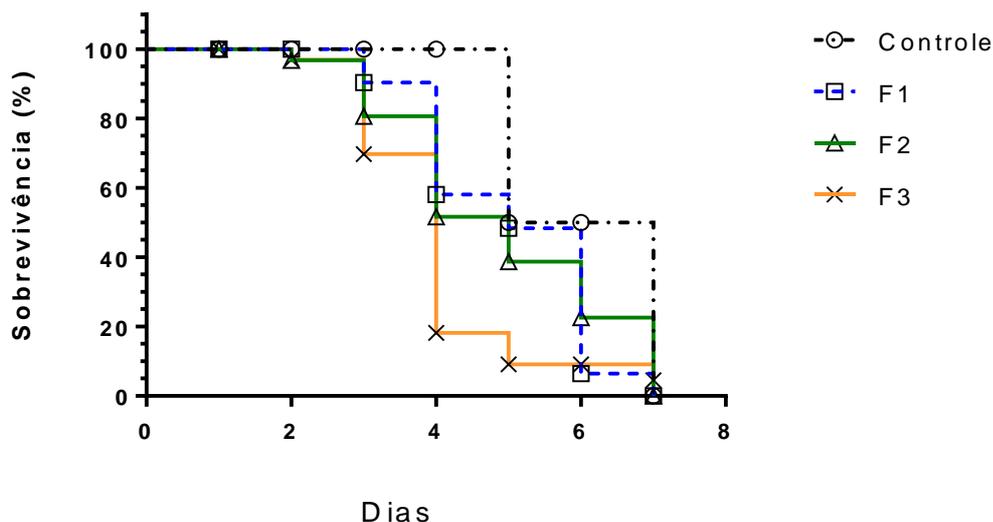
A dosagem que apresentou maior nível de glicose foi a E2. A quantidade de glicose revela a disponibilidade desse açúcar para o metabolismo de carboidratos em células do inseto. Logo, os resultados aqui apresentados apontam a possibilidade de que o elevado nível de glicose em comparação ao controle pode ser devido ao aumento no metabolismo de carboidratos ocasionado por estresse tóxico (SHEKARI et al., 2008).

5.3 Efeito da fração proteica da casca de *G. americana* sobre adultos de *C. anonella*

A fração enriquecida de lectinas (AHE 1219) obtida a partir do fracionamento salino com sulfato de amônio (F0-20%) foi testada nas concentrações 15,0 (F1), 25,0 (F2) e 35,0 (F3) μg de proteínas/mL de dieta. Após 3 dias de análise, foi possível observar (Figura 20) que os tratamentos F1, F2 e F3 provocaram uma mortalidade de 10%, 20% e 30%, respectivamente.

Em comparação aos dados obtidos com o extrato (Figura 16), constatou-se que houve uma redução dos efeitos sobre a sobrevivência, que pode ser causada pela ausência de metabólitos secundários eliminados no processo de fracionamento salino. Como visto na literatura, estes metabólitos apresentam importantes funções e potencial para atuar na defesa dos vegetais (CHICUTA et al., 2021). No entanto, no quarto dia de observação, a maior dosagem provocou a mortalidade de 80%.

Figura 20. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de adultos de *C. anonella* mantidas em dieta artificial com diferentes doses da fração proteica da casca de *G. americana*.

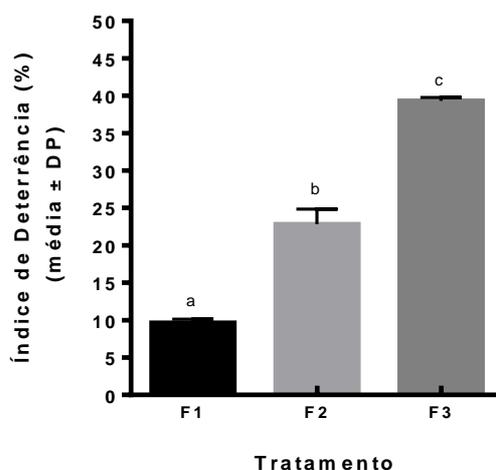


Fonte: Autora, 2022.

O estudo dos efeitos de frações proteicas sobre a sobrevivência dos insetos ainda é escasso. Por isso, este trabalho foi desenvolvido para discussão desta abordagem analisando parâmetros nutricionais e alterações no perfil bioquímico dos insetos que ingeriram a dieta artificial contendo diferentes doses da fração.

Diferentemente do resultado obtido com o extrato (Figura 17), as três dosagens da fração proteica apresentaram taxa de inibição alimentar, porém somente as duas maiores podem ser classificadas como tendo promovido fraca deterrência alimentar, de acordo com Isman e colaboradores (1990), pois o índice de deterrência (ID) foi superior a 20%, mas inferior a 50% (Figura 21).

Figura 21. Efeito deterrente da fração proteica de casca de *G. americana* sobre adultos de *C. anonella*.

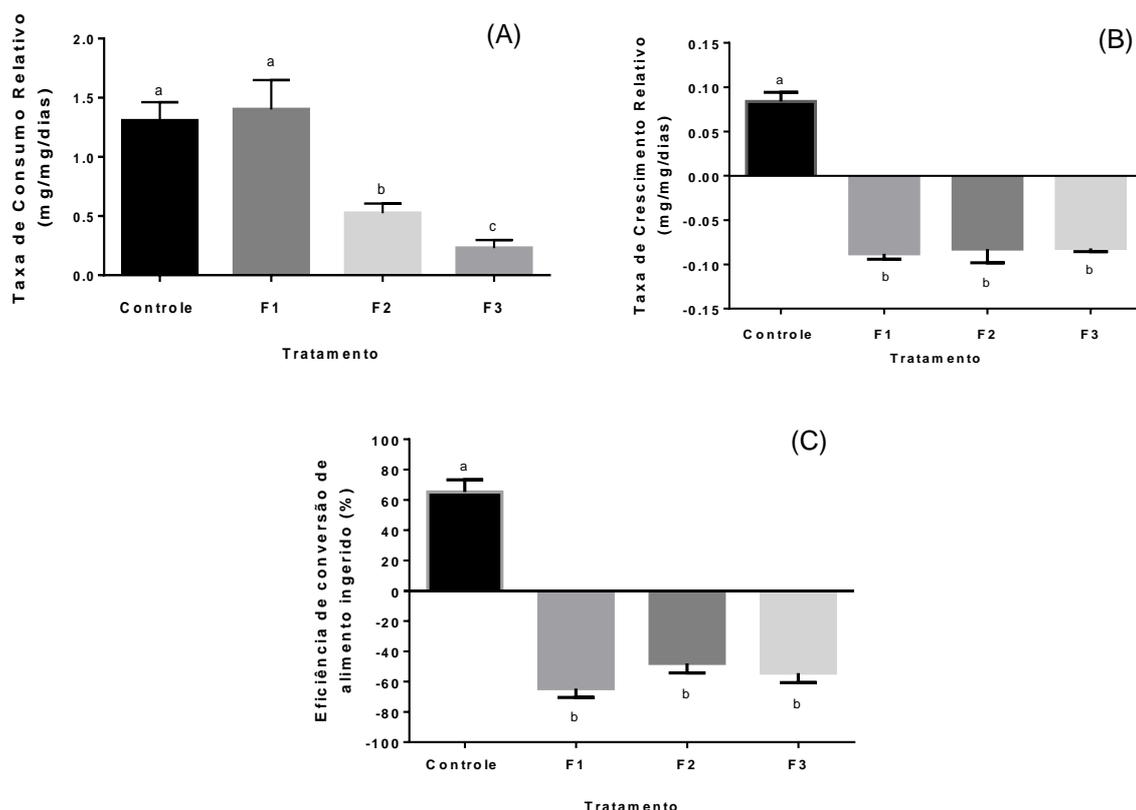


Fonte: Autora, 2022. Cada barra corresponde à média \pm DP de 10 repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos pelo teste de Tukey.

Ao analisar os efeitos, desta vez, sobre os parâmetros nutricionais, é possível observar que os dados referentes à taxa de consumo relativo apresentados na figura 22A corroboram com o ID, pois o consumo alimentar foi reduzido em comparação ao controle à medida que aumentava a dosagem da fração proteica na dieta artificial. Os resultados quanto ao crescimento relativo (Figura 22B) e à taxa de conversão do alimento (Figura 22C) não demonstraram diferença significativa nas diferentes dosagens testadas, sendo todos os valores negativos para os tratamentos, afirmando a perda de biomassa dos insetos.

Resultados semelhantes foram obtidos por Lima (2019) que também testou a fração proteica da mesma parte e espécie de planta em *Tribolium castaneum* e demonstraram que o inseto não conseguiu converter o alimento em biomassa. Chicuta (2019) analisou o efeito da fração proteica de sementes de *Crotalaria stipularia* em *T. castaneum* e constatou que houve diminuição no seu peso corporal. A fração em análise neste trabalho apresentou atividade hemaglutinante de 2048, o que corrobora com a hipótese de que as lectinas sejam o componente principal responsável pelo efeito antinutricional proporcionado por *G. americana*.

Figura 22. Parâmetros nutricionais de adultos de *C. anonella* mantidos em dieta artificial preparada com Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (controle) ou com diferentes concentrações da fração 0-20% da casca de *G. americana*. (A) TCR = Taxa de consumo relativo indica a quantidade de dieta ingerida em mg por mg de massa corporal de insetos por dia; (B) TCRE = Taxa de crescimento relativo corresponde a quantidade de biomassa em mg adquirida por mg de massa corporal de insetos por dia; (C) ECI = Eficiência de conversão do alimento ingerido indica a quantidade de alimento ingerido pelos insetos convertido em biomassa em porcentagem.

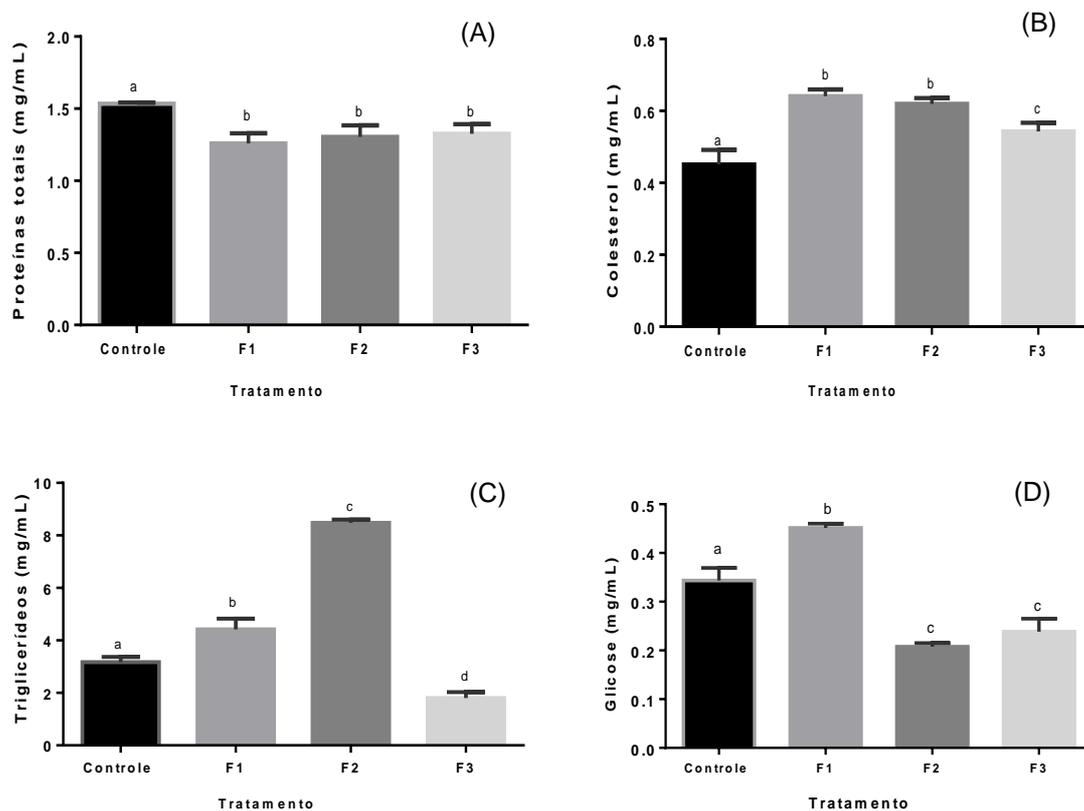


Fonte: Autora, 2022. Cada barra corresponde à média \pm DP de 10 repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos pelo teste de Tukey.

Os níveis totais de proteínas, colesterol, triglicerídeos e glicose foram analisados para melhor compreender o efeito da fração proteica de *G. americana* sobre *C. anonella*. O nível de proteínas diminuiu em todos os tratamentos, não havendo diferença significativa entre as dosagens testadas (Figura 23A). Esta redução pode ser explicada pelo fato de as lectinas também serem capazes de se ligar a enzimas digestivas glicosiladas, interferindo em sua atividade, o que pode prejudicar na captação de proteínas e, como consequência, inibir a digestão e absorção de alimentos (NUNES et al., 2015).

A Figura 23B mostra o aumento considerável dos níveis de colesterol para todos os tratamentos contendo a fração proteica. Nos insetos, o colesterol atua como componente estrutural das membranas celulares e como precursor de hormônios. Sabe-se que os insetos não são capazes de sintetizar colesterol, sendo necessário a sua obtenção a partir da dieta ou de microrganismos simbiotes (HOUK; GRIFFITHS, 1980; HIROSE; PANIZZI, 2009). O colesterol deve ser absorvido pelo intestino e, através da hemolinfa, transportado pela lipoforina (Lp) que o distribui, por exemplo, ao corpo gorduroso e aos ovócitos. Além disso, em alguns insetos foram identificadas proteínas da família SCP (proteínas transportadoras de esteróis) que possuem um domínio de transferência de colesterol com grande afinidade (ATELLA; MAJEROWICZ; GONDIM, 2012; IGARASHI et al., 2018).

Figura 23. Perfil bioquímico do corpo macerado de adultos de *C. anonella* mantidos em dietas artificiais preparadas com Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (controle) ou com diferentes concentrações da fração 0-20% de casca de *G. americana*. (A) Proteínas totais em mg/mL; (B) colesterol em mg/mL; (C) triglicerídeos em mg/mL; (D) glicose em mg/mL.



Fonte: Autora, 2022. Cada barra corresponde à média \pm DP de 6 repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos pelo teste de Tukey.

A absorção de colesterol envolve transferência intracelular, realizada pela SCP que permite a redistribuição do colesterol dentro de uma célula, e transporte intercelular, onde o colesterol é distribuído entre as células, sendo a lipoforina a lipoproteína responsável por este transporte. No entanto, a desorção do colesterol ligado à membrana celular é lenta sem o auxílio de uma proteína transportadora (KIM; LAN, 2010). Na literatura, existem discussões sobre a capacidade das lectinas também se ligarem a proteínas transportadoras encontradas no intestino médio dos insetos, alterando a absorção de nutrientes. Uma hipótese para justificar o aumento significativo do nível de colesterol é que a lectina pode se ligar a lipoforina e/ou a SCP, interferindo na absorção e transporte de lipídeos (NAPOLEÃO et al., 2018).

O tratamento com a maior concentração (F3) apresentou maior nível de colesterol em comparação ao controle, porém menor em relação aos tratamentos com menor concentração (F1 e F2). Este resultado pode estar relacionado ao fato dos insetos de F3 terem se alimentado menos, portanto menos lectinas foram ingeridas.

O corpo gorduroso da mariposa *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae), enquanto lagarta, estoca enormes quantidades de lipídeos que, posteriormente, serão utilizados na fase adulta para o voo e durante a ovogênese (ZIEGLER, 1991). No entanto, neste trabalho foi notória a dificuldade de voar dos insetos submetidos ao tratamento com maior concentração (F3). Este fato foi perceptível ao terceiro dia de experimento quando a pesagem se tornou mais fácil, uma vez que o máximo que todos os insetos que restaram vivos das 30 repetições faziam era realizar pequenos saltos na tentativa de voar.

Como já discutido, os triglicerídeos atuam como fonte de energia metabólica, portanto os dados demonstrados na figura 23C sugerem o motivo desta dificuldade apontada nos insetos, onde apresenta que F3 foi o tratamento que apresentou o menor nível de triglicerídeos. Ramzi; Sahragard; Zibae (2014) testaram a lectina de *Citrullus colocynthis* em lagartas *Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) e também constataram a diminuição de triglicerídeos em relação ao controle.

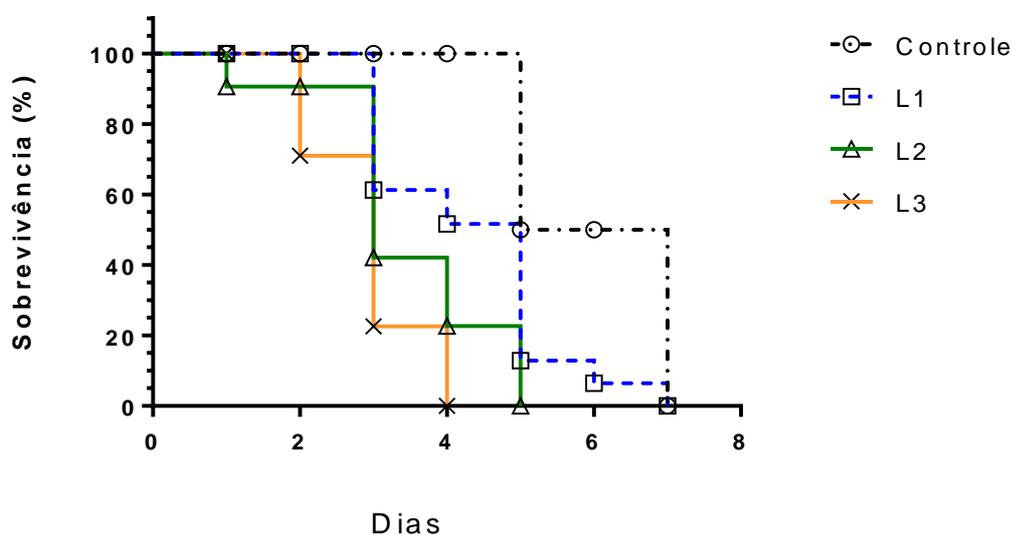
O tratamento F1 apresentou um aumento nos níveis de glicose, enquanto F2 e F3 provocaram redução significativa. Esta redução sugere que a glicose tenha sido consumida em consequência da privação alimentar. Quando carboidratos são

ingeridos, a glicose não utilizada de imediato é estocada na forma de glicogênio, um polissacarídeo de armazenamento em insetos que é depositado nos músculos de voo, no corpo gorduroso e ao redor do trato digestivo. O glicogênio armazenado é fosforilado e liberado como trealose na hemolinfa no momento em que as concentrações de açúcares diminuem a níveis críticos (KLOWDEN, 2013; NATION, 2008).

5.4 Efeito da lectina purificada (GaBL) da casca de *G. americana* sobre adultos de *C. anonella*

As lectinas constituem um importante campo de pesquisa devido à sua diversidade estrutural e afinidade por carboidratos, sendo úteis para inúmeras aplicações biológicas. A realização de bioensaios empregando dietas artificiais nos primeiros testes apresentou avanços a fim de potencializar os efeitos inseticidas, desenvolvendo em etapas posteriores ferramentas com estratégias integradas de controle de insetos-praga, como o melhoramento de plantas (MACEDO; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2015). Sendo assim, a lectina de *G. americana* foi aplicada em dieta artificial nas dosagens 7,0 (L1), 10,0 (L2), 16,0 (L3) μg de proteínas/mL para *C. anonella*.

Figura 24. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de adultos de *C. anonella* mantidas em dieta artificial com diferentes doses da lectina da casca de *G. americana*.



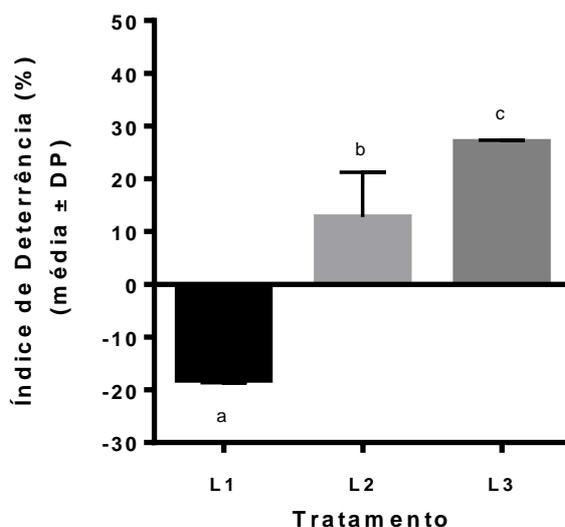
No segundo dia de experimento, o tratamento L2 reduziu a sobrevivência em 10% e L3, em 30% enquanto em L1 e controle, todos os insetos permaneceram vivos. Após 3 dias, os tratamentos L1, L2 e L3 apresentaram 40%, 60% e 80% de mortalidade, respectivamente. No quarto dia, todos os insetos submetidos ao tratamento L3 estavam mortos (Figura 24).

Quanto aos conhecimentos sobre a reprodução de *C. anonella*, sabe-se que o acasalamento acontece entre o segundo e o quinto dia de vida (MOURA; BITTENCOURT, 2015), sendo que os machos copulam 5 vezes neste período e o intervalo mínimo entre cópulas é de 24h (PEREIRA, 2001). Considerando que a longevidade desta espécie na fase adulta pode durar até 7 dias, os tratamentos aqui testados demonstraram ter grande potencial para o controle da praga, uma vez que são capazes de afetar a sobrevivência no período fértil, diminuindo a quantidade de deposição de ovos na superfície dos frutos.

A lectina de *Galanthus nivalis* (GNA) expressa em cana-de-açúcar transgênica provocou a redução da longevidade da fêmea adulta nas espécies *Eoreuma loftini* e *Diatraea saccharalis*, ambas da ordem Lepidoptera (SÉTAMOU et al., 2002). Como a capacidade de interferir na absorção e digestão de nutrientes é um dos principais mecanismos relacionados à atividade inseticida das lectinas (NAPOLEÃO et al., 2018), este trabalho avaliou os efeitos da GaBL inserida em dieta artificial sobre a alimentação, os parâmetros nutricionais e o perfil bioquímico de *C. anonella*.

Na figura 25 são apresentados os valores referentes ao efeito deterrente que as três dosagens contendo a lectina causaram aos insetos. O tratamento L1 não provocou inibição alimentar, enquanto L3 apresentou fraca deterrência, de acordo com Liu e colaboradores (2007). No entanto, foi observado que em L2 o desvio padrão foi significativo, este resultado se justifica pelo fato de que houve diferença na ingestão entre fêmeas e machos. Quando comparado ao controle, o consumo das fêmeas reduziu em aproximadamente 22%, mas para os machos a redução foi menos de 5%. De Albuquerque e colaboradores (2020) também detectaram efeito deterrente da lectina de *Microgramma vacciniifolia* sobre *Sitophilus zeamais* e Lima (2019) demonstrou efeito deterrente da lectina de *G. americana* sobre *Tribolium castaneum*.

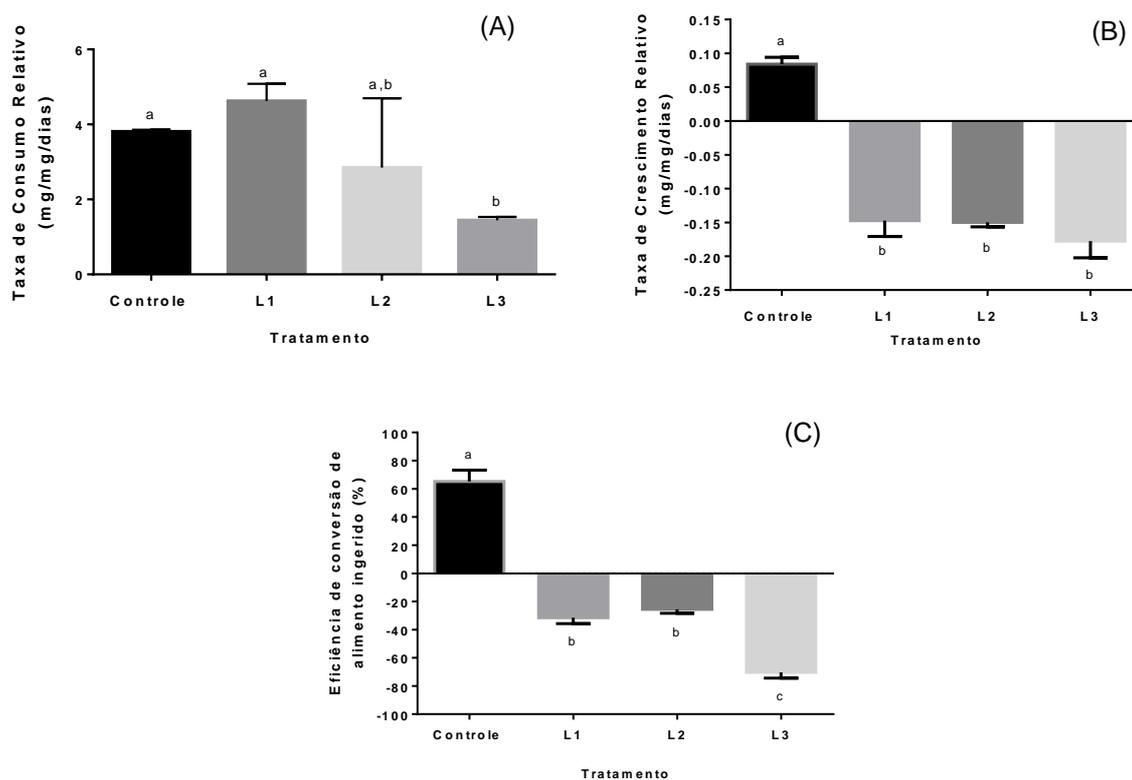
Figura 25. Efeito deterrente da lectina de casca de *G. americana* sobre adultos de *C. anonella*.



Fonte: Autora, 2022. Cada barra corresponde à média \pm DP de 10 repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos pelo teste de Tukey.

Os dados relacionados aos parâmetros nutricionais apresentados na figura 26 mostram que em L1 não houve diferença significativa em relação ao consumo alimentar do controle. No caso de L2, os machos consumiram mais que as fêmeas, como já mencionado anteriormente, e em L3 houve redução no consumo alimentar, corroborando com o resultado do ID (Figura 25). Nas três dosagens, os insetos não conseguiram ganhar biomassa. Em L2, embora os machos tenham consumido mais a dieta, eles não foram capazes, assim como as fêmeas, de realizar a conversão do alimento ingerido. Os resultados utilizando a dieta artificial contendo a lectina das folhas de *Schinus terebinthifolius* também apresentaram a diminuição de biomassa e da eficiência da conversão de alimentos em *Sitophilus zeamais* (CAMAROTI et al., 2018).

Figura 26. Parâmetros nutricionais de adultos de *C. anonella* mantidos em dieta artificial preparada com Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (controle) ou com diferentes concentrações da lectina da casca de *G. americana*. (A) TCR = Taxa de consumo relativo indica a quantidade de dieta ingerida em mg por mg de massa corporal de insetos por dia; (B) TCRE = Taxa de crescimento relativo corresponde a quantidade de biomassa em mg adquirida por mg de massa corporal de insetos por dia; (C) ECI = Eficiência de conversão do alimento ingerido indica a quantidade de alimento ingerido pelos insetos convertido em biomassa em porcentagem.



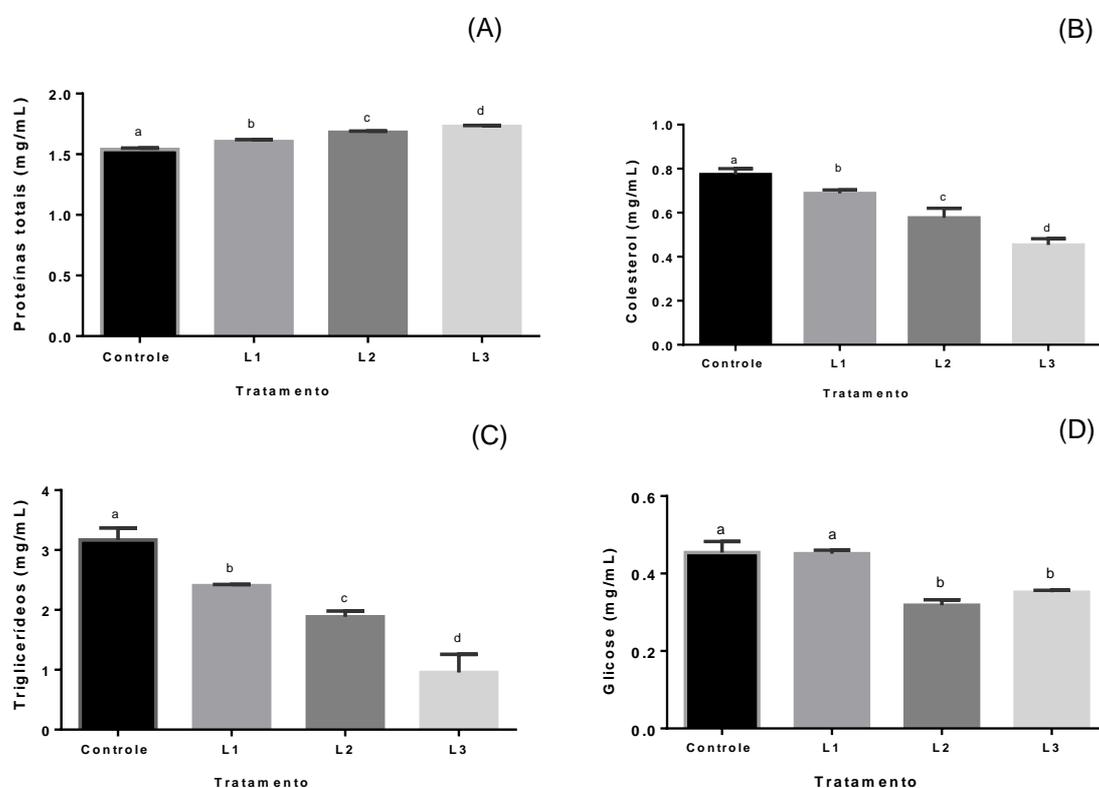
Fonte: Autora, 2022. Cada barra corresponde à média \pm DP de 10 repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos pelo teste de Tukey.

Ao analisar a perda considerável na biomassa dos insetos, é possível afirmar que tenham sido metabolizadas suas reservas energéticas. Com o propósito de compreender melhor a atividade inseticida da lectina, foram avaliados os níveis totais de proteínas, colesterol, triglicerídeos e glicose (Figura 27).

Na análise para proteínas, foi constatado que L1, L2 e L3 apresentaram um leve aumento em relação ao controle. Os dados para colesterol mostram que em L1, L2 e L3 houve diminuição significativa. Sabe-se que o colesterol é absorvido no intestino médio para ser transportado na hemolinfa pela lipoforina ao corpo gorduroso (ATELLA; MAJEROWICZ; GONDIM, 2012; IGARASHI et al., 2018). Essa redução nos

níveis de colesterol aponta para a possibilidade de a lectina ter provocado uma perturbação na membrana peritrófica ou atuado como agente antimicrobiano contra simbiontes do intestino de *C. anonella*, já que microrganismos podem sintetizar lipídeos e suprir a deficiência nutricional (HOUK; GRIFFITHS, 1980; HIROSE; PANIZZI, 2009). Napoleão e colaboradores (2013) investigaram o mecanismo inseticida da lectina de folhas de *Myracrodruon urundeuva* e descobriram que ela foi capaz de matar o simbionte bacteriano encontrado no intestino de *N. corniger*.

Figura 27. Perfil bioquímico do corpo macerado de adultos de *C. anonella* mantidos em dietas artificiais preparadas com Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (controle) ou com diferentes concentrações da lectina de casca de *G. americana*. (A) Proteínas totais em mg/mL; (B) colesterol em mg/mL; (C) triglicerídeos em mg/mL; (D) glicose em mg/mL.



Fonte: Autora, 2022. Cada barra corresponde à média \pm DP de 6 repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos pelo teste de Tukey.

Os níveis de triglicerídeos foram reduzidos em todas as dosagens testadas, sendo perceptível, assim como na fração proteica, a dificuldade de voar dos insetos submetidos ao tratamento com maior concentração (L3). Para os níveis de glicose, houve diminuição nos tratamentos L2 e L3, mas não houve diferença entre eles.

Nos insetos, as vias de sinalização do peptídeo semelhante à insulina (ILP) desempenham um importante papel na regulação do metabolismo de carboidratos e lipídeos, crescimento e desenvolvimento, fecundidade, resistência ao estresse e vida útil. Os ILPs são codificados por famílias multigênicas que são expressas em órgãos nervosos e não nervosos, como o intestino médio, glândulas salivares, corpo gorduroso e cérebro. Os sinais nutricionais demonstraram ser os fatores mais importantes que afetam a liberação de ILPs de IPCs (células produtoras de peptídeo semelhante à insulina) cerebrais (WU; BROWN, 2006; ERION; SEHGAL, 2013; CHOWANSKI et al., 2021).

O alvo dos peptídeos da família insulina são os receptores de insulina (IR), que quando ativados dão início a uma cascata de reações de sinalização intracelular, causando mudanças na atividade celular. O principal substrato energético acumulado nos músculos dos insetos é o glicogênio. Semelhante aos vertebrados, o controle da síntese de glicogênio em insetos ocorre nos músculos pela sinalização ILP. Além disso, a participação dos ILPs acontece também na liberação de energia pela quebra do glicogênio em glicose. O número de ILP varia de acordo com a espécie e na ordem Lepidoptera, por exemplo, foram identificados 38 ILPs em *Bombyx mori* (bicho-da-seda) (CHOWANSKI et al., 2021).

Ainda não há estudos sobre o efeito de lectinas sobre peptídeos semelhantes à insulina de insetos, porém já foi demonstrada que a lectina do gérmen de trigo (WGA) produziu várias alterações na capacidade das células adiposas de ratos se ligarem e responderem a insulina. A WGA foi capaz de inibir a ativação do sistema de transporte pela insulina em concentrações altas. Ao diminuir a concentração, a lectina aumentou a afinidade de ligação do receptor da insulina (LIVINGSTON; PURVIS, 1980).

Neste trabalho, as discussões que tratam dos possíveis mecanismos de ação da lectina da casca de *G. americana* contra *C. anonella* são hipóteses baseadas na literatura, sendo necessários estudos específicos de partes diferentes do corpo do inseto, quantificação de metabólitos e atividade enzimática. Em futuros estudos, é válido realizar testes com a tripsina isolada comercial ou utilizar o intestino de *C. anonella* para verificar de forma mais clara a atuação da lectina de *G. americana* frente a enzimas digestivas dos lepidópteros.

5.5 Aplicação da dieta artificial com extrato e fração proteica em semi-campo

A dieta artificial contendo o extrato ou a fração enriquecida com lectinas foi colocada em uma armadilha Delta plástica amarrada em uma pinheira (*Annona squamosa*). Após 24 h, em nenhum dos tratamentos testados foi possível capturar insetos da espécie *C. anonella*. No entanto, constatou-se que ao final do experimento com o extrato a armadilha e o vidro de penicilina com o algodão estavam repletos de formigas vivas e mortas. Por outro lado, nenhuma formiga foi vista após 24h com a fração proteica. Este resultado confirma os dados apresentados na Figura 21, onde mostra o índice de deterrência da fração equivalente a aproximadamente 40%.

De acordo com Maciel e colaboradores (2010), a deterrência é um distúrbio associado a mecanismos sensoriais e provoca redução do consumo alimentar. Como consequência, a deficiência nutricional diminui a capacidade de movimentação do inseto, na busca por alimentos de melhor qualidade, de locais para abrigo ou reprodução, tornando-o presa fácil para inimigos naturais. O efeito deterrente alimentar que a fração proteica apresenta pode ser capaz de impedir a ação danosa de insetos. Portanto, a dieta artificial descrita neste trabalho associada a outras práticas, como a utilização de atrativos, tem grande potencial de agir positivamente para o manejo integrado da praga.

Com base nos resultados do presente trabalho, a lectina de *G. americana* tem demonstrado grande potencial para atuar em estratégias para o manejo integrado de pragas contra *C. anonella*, sendo capaz de interferir em parâmetros nutricionais e perfil bioquímico do inseto. Portanto, também são incentivados experimentos para analisar a integridade da membrana peritrófica dos insetos que ingeriram a lectina através de microscopia confocal e estudos futuros com a lectina expressa em plantas transgênicas.

6. CONCLUSÕES

- A dieta artificial contendo extrato de casca de *Genipa americana* a 25% para as lagartas em três estágios diferentes (T1, T2 e T3) apresentou taxa de mortalidade de até 25% em *Cerconota anonella*;
- Os resultados dos bioensaios com adultos de *C. anonella* demonstraram que o extrato de *G. americana* apresentou taxa de mortalidade de até 70% em 3 dias;
- Os extratos testados para lagartas e adultos de *C. anonella* não apresentaram efeito deterrente, porém afetaram nos parâmetros nutricionais (taxa de consumo relativo, taxa de crescimento relativo e eficiência de conversão do alimento ingerido) dos insetos tratados;
- A mortalidade dos insetos adultos foi de 80% após 4 dias de observação com a fração proteica e depois de apenas 3 dias com a lectina;
- Fração proteica e lectina apresentaram efeito deterrente e alterações em todos os parâmetros nutricionais avaliados, além de os insetos apresentarem, na maior concentração, dificuldade de voar ao terceiro dia do bioensaio;
- O extrato, fração proteica e lectina de *G. americana* também afetaram o perfil bioquímico dos adultos de *C. anonella*, principalmente com as duas maiores doses testadas, interferindo nos níveis de proteínas, colesterol, triglicérides e glicose quando comparados ao controle;
- No teste em semi-campo, foi observado que somente as amostras com extrato e fração proteica não são o suficiente para capturar os insetos em armadilha, sendo necessários a associação com outras ferramentas para o manejo da praga, porém foi possível notar que enquanto no extrato houve a presença de formigas, com a fração nenhuma formiga foi encontrada, corroborando com o resultado de efeito deterrente apresentado nos bioensaios em condições de laboratório.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Realizar testes inseticidas com bactérias do intestino de *C. anonella*;
- Avaliar a ação de lectinas em enzimas digestivas do inseto;
- Avaliar a integridade da membrana peritrófica dos insetos que ingeriram dieta artificial contendo a lectina;
- Avaliar o efeito de *G. americana* sobre os fungos oportunistas que causam danos diretos ao fruto.

REFERÊNCIAS

AGUILAR, J. G. dos S. An overview of lipids from insects. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 33, p. 1-9, 2021.

ALVARENGA, E. S. L. et al. Chitin is a component of the *Rhodnius prolixus* midgut. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 69, p. 61-70, 2016.

ALVES, J. S. F. **Estudo químico e biológico de *Genipa americana* L. (jenipapo)**. Dissertação de mestrado. Ciências farmacêuticas. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2014.

AOYAMA, E. M.; LABINAS, A. M. Características estruturais das plantas contra a herbivoria por insetos. *Enciclopédia Biosfera*, v. 8, n. 15, p. 365-386, 2012.

ARAÚJO, I. M. M., OLIVEIRA, A. G. R. C. Agronegócio e agrotóxicos: impactos à saúde dos trabalhadores agrícolas no nordeste brasileiro. **Trab. Educ. Saúde**, v. 15, n. 1, p. 117-129, 2017.

ARRESE, E. L. et al. Lipid storage and mobilization in insects: Current status and future directions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, p. 7- 17, 2001.

ARRESE, E. L.; SOULAGES, J. L. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. **Annu. Rev. Entomol.** 55, 207-225, 2010.

ASSIS, O. B. G. A asa da borboleta e a nanotecnologia: cor estrutural. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 35, n. 2, 2013.

ATELLA, G. C.; MAJEROWICZ, D.; GONDIM, K. C. **Metabolismo de lipídeos**. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular INCT – EM. Cap. 06. 2012.

BAKAZE, E.; DZOMEKU, B. M.; WUNSCH, J-N. Banana defense responses to *Cosmopolites sordidus* feeding and methyl jasmonate application. **Annals of Applied Biology**, v. 178, n. 1, p. 98-108, 2020.

BIERMANN, A. C. S. **Bioatividade de inseticidas botânicos sobre *Ascia monuste orseis* (Lepidoptera: Pieridae)**. Dissertação de mestrado. Agronomia. Santa Maria, RS: Universidade Federal de Santa Maria, 2009.

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

BORGES; L. P.; AMORIM, V. A. Metabólitos secundários de plantas. **Revista Agrotecnologia**, Ipameri, v. 11, n. 1, p. 54-67, 2020.

BOTTON, M. et al. Supressão necessária. **Revista Cultivar Hortaliças e Frutas**, n. 87, p. 10-13, 2014.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAGA E SILVA, S.; SATO, M. E.; RAGA, A. Uso de extratos naturais no controle de insetos, com ênfase em moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae). **Biológico**, São Paulo, v. 81, n. 1, p. 1-30, 2019.

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.

BROGLIO-MICHELETTI., et al. Controle de *Cerconota anonella* (SEPP.) (Lep.: Oecophoridae) e de *Bephratelloide spomorum* (Fab.) (Hym.: Eurytomidae) em frutos de graviola (*Annona muricata* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, p. 722-725, 2001.

BUSTILLO, A.E., PEÑA, J. E. Biology and control of the *Annona* fruit borer *Cerconota anonella* (Lepidoptera: Oecophoridae). **Fruits**, v. 47, p. 81-84, 1992.

CAMARGO, R. da S. et al. Morfologia Interna. In: FUJIHARA, R. T. et al. (ed.). **Insetos de importância econômica: guia ilustrado para identificação de famílias**. FEPAF, p. 43-68, 2011.

CAMAROTI, J. R. S. L. et al. Phytoinsecticides for controlling pests and mosquito vectors of diseases. In: Biocontrol agents: types, applications and research insights, ed. by V. Green, **Nova Science Publishers Inc.**, New York, 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.

CARGNIN, M. C. S.; ECHER, I. C.; DA SILVA, D. R. Fumicultura: uso de equipamento de proteção individual e intoxicação por agrotóxico. **Rev Fund Care Online**, v. 9, n. 2, p. 466-472, 2017.

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.

CAVALCANTE, L. F. et al. Produção e qualidade da graviola sob irrigação e cobertura do solo com resíduo de sisal. **Magistra**, Cruz das Almas – BA, v. 28, n. 1, p. 91-101, 2016.

CHATROU, L. W. et al. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 169, n. 1, p. 5-40, London, 2012.

CHÁVEZ, C. Y. L. **Efeito dos inibidores de proteases benzamidinas nas respostas bioquímico-fisiológicas de *Coffea arabica* e da cochonilha *Coccus viridis***. Dissertação de mestrado. Entomologia. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2016.

CHEATTRI, D. et al. Lectins: Biological significance to biotechnological application. **Carbohydrate Research**, v. 506, 2021.

CHICUTA, C. P. de 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 de mestrado. Química e Biotecnologia. Maceió: Universidade Federal de Alagoas, 2019.

CHICUTA, C. P. de L. et al. Extratos de plantas com potencial inseticida do Bioma Brasileiro: um referencial teórico. In: MELO, J. O. F. (org.). **Ciências agrárias: o avanço da ciência no Brasil**. Guarujá: Científica Digital, 2021, v. 1, p. 330-347.

CHOWANSKI, S. et al. Insulin-like peptides and cross-talk with other factors in the regulation of insect metabolism. **Frontiers in Physiology**, v. 12, p. 1-21, 2021.

CHRISPEELS, M. J.; RAIKHEL, N. V. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. **Plant Cell**, v. 3, n.1, p. 1-9, 1991.

CNCFlora. *Genipa americana* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em: [http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Genipa americana](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Genipa%20americana). Acesso em: 1 ago. 2021.

COELHO, L. C. B. B. et al. Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/ Pharmacological and Therapeutic Applications. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 22 p., 2017.

CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Purification of a Glucose/Mannose Specific Lectin, Isoform 1, from Seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu Bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 55, p. 261-273, 1995.

CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Lectins, carbohydrate recognition molecules: are they toxic?. In: SIDDIQUE, Y. H. (ed.), **Recent Trends in Toxicology**. Kerala, India: Transworld Research Network, v. 37, p. 47-59, 2008.

COSTA, R. B. et al. Purification and characterization of a lectin with refolding ability from *Genipa americana* bark. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 517-523, 2018.

DA COSTA, I. C. **Nanopartículas poliméricas preenchidas com óleo essencial de *Piper nigrum*: Caracterização Química e Morfológica**. Dissertação de mestrado. Ciência e Engenharia de Materiais. Manaus: Universidade Federal do Amazonas, 2020.

DALLAGNOL, L. J.; DE ARAÚJO FILHO, J. V. Uma visão geral da resistência genética da planta a microrganismos. In: DALLAGNOL, L. J. (org.). **Resistência genética: de plantas a patógenos**. Pelotas: Ed. UFPel, p. 13-64, 2018.

DA ROSA, J. M. et al. **Repelência de iscas tóxicas usadas para a supressão populacional de mosca-das-frutas sobre *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)**. In: XXV Congresso Brasileiro de Entomologia, Universidade Federal de Pelotas – UFPel, 2014.

DA SILVA, A. V. C.; LÉDO, A. da S.; DA SILVA JÚNIOR, J. F. Descritores para jenipapeiro. Brasília, DF: Embrapa, 2020.

DA SILVA, L. S. et al. Manejo de *Cerconota anonella* e *Bephratelloides pomorum*: um desafio para os anonicultores. **Revista Mirante**, v. 10, n. 5, 2017.

DA SILVA, R. C. C. Influência dos constituintes voláteis de pinha (*Annona squamosa* L.) e graviola (*Annona muricata* L.), no comportamento da broca-do-fruto *Cerconota anonella*. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Alagoas. Maceió: 56 p. 2012.

DATTA, R. et al. Effect of crude extracts and purified compounds of *Alpinia galanga* on nutritional physiology of a polyphagous lepidopteran pest, *Spodoptera litura* (Fabricius). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 168, p. 324-329, 2019.

DE ALBUQUERQUE, L. P. et al. Antinutritional effects of the chitin-binding lectin from *Microgramma vacciniifolia* rhizome (MvRL) on *Sitophilus zeamais*. **Journal of Stored Products Research**, v. 88, p. 1-6, 2020.

DE CARVALHO, S. S. et al. Efeito inseticida sistêmico de nanoformulações à base de nim sobre *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) biótipo B em tomateiro. **Bragantia**, v. 74, n. 3, p. 298-306, 2015.

DE JESUS, A. S. et al. Conservation, utilization, genetic and chemodiversity of germplasm of genipap (*Genipa americana* L.) in Brazil. **Current Trends in Biomedical Engineering & Biosciences**, v. 18, n. 4, 2019.

DE JESUS, A. S. et al. Bioactivity of iridoids of *Genipa americana* against the coconut mite *Aceria guerreronis* Keifer (Acari: Eriophyidae). **Revista de Protección Vegetal**, v. 35, n. 1, 2020.

DE MORAIS, L. A. S.; MARINHO-PRADO, J. S. Plantas com atividade inseticida. In: HALFELD-VIEIRA, B. de A. et al. (org.). **Defensivos agrícolas naturais: Uso e perspectivas**. Brasília: Embrapa, p. 542-593, 2016.

DE OLIVEIRA, A. P. S. et al. Evaluation of the insecticidal activity of *Moringa oleifera* seed extract and lectin (WSMoL) against *Sitophilus zeamais*. **Journal of Stored Products Research**, v. 87, 2020.

DE OLIVEIRA, J. L. et al. Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: Prospects and promises. **Biotechnology Advances**, v. 32, p. 1550-1561, 2014.

DIAS, R. de O. et al. Insights into Animal and Plant Lectins with Antimicrobial Activities. **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 519-541, 2015.

DOS SANTOS, C. C. **Atraentes para fêmeas de *Cerconota anonella* (Lepidoptera: Oecophoridae) em frutos de graviola**. Dissertação de mestrado. Química e Biotecnologia. Maceió: Universidade Federal de Alagoas, 2017.

ERBANO, M.; DUARTE, M. R. Morfoanatomia de folha e caule de *Genipa americana* L., Rubiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 825-832, 2010.

ERION, R.; SEHGAL, A. Regulation of insect behavior via the insulin-signaling pathway. **Frontiers in Physiology**, v. 4, p. 1-6, 2013.

FARIA, N. M. X. et al. Occupational exposure to pesticides, nicotine and minor psychiatric disorders among tobacco farmers in southern Brazil. **NeuroToxicology**, v. 45, p. 347-354, 2014.

FUJIHARA, R. T. et al. **Insetos de importância econômica: guia ilustrado para identificação de famílias**. FEPAF, 2011.

GALLO, D. et al. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002, 920 p.

GAZARA, R. K. et al. *De novo* transcriptome sequencing and comparative analysis of midgut tissues of four non-model insects pertaining to Hemiptera, Coleoptera, Diptera and Lepidoptera. **Gene**, v. 627, p. 85-93, 2017.

GIEHL, C. J. et al. Estratégias de manejo da mosca branca (*Bemisia tabaci*) do tomateiro em ambiente protegido com extrato alcoólico de cinamomo (*Melia azedarach* L.). In: SOUSA, C. da S.; LIMA, F. de S.; SABIONI, S. C. (org.). Agroecologia: métodos e técnicas para uma agricultura sustentável. v. 4. Guarujá, SP: **Científica Digital**. p. 156-168. 2021.

GOMES, F. S. **Purificação e caracterização de lectinas e inibidor de tripsina presentes em tecidos de *Myracrodruon urundeuva* e *Schinus terebinthifolius*: ação antimicrobiana de preparações**. Tese (Doutorado em Bioquímica e Fisiologia). Centro de Ciências Biológicas. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2013.

GOTTEMS, L. Isca Tecnologias apresenta Anamed para controle da mosca-das-frutas. Isca, Agrolink, 2017. Disponível em: <http://www.isca.com.br/pt/noticias/c6c75a3f-f6bc-4cc3-ae7b-812779d43426/isca-tecnologias-apresenta-anamed-para-controle-da-mosca-das-frutas>. Acesso em: 05 jun. 2021.

HIROSE, E.; PANIZZI, A. R. Os simbioses e a nutrição dos insetos. In: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. **Bioecologia e nutrição de insetos: base para o manejo integrado de pragas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Londrina: Embrapa Soja, p. 251-276, 2009.

HOUK, E. J.; GRIFFITHS, G. W. Intracellular symbiotes of the Homoptera. **Annual Review of Entomology**, v. 25, p. 161-187, 1980.

HOWE, G. A.; SCHALLER, A. **Direct defenses in plants and their induction by wounding and insect herbivores**. In: Induced plant resistance to herbivory: Springer, Science., p. 7-29, 2008.

IGARASHI, F. et al. Cholesterol internalization and metabolism in insect prothoracic gland, a steroidogenic organ, via lipoproteins. **Steroids**, v. 134, p. 110-116, 2018.

ISMAN, M. B. et al. Insecticidal and antifeedant bioactivities of neem oils and their relationship to azadirachtin content. **J. Agric Food Chem**, v. 38, p. 1406-1411, 1990.

JOÃO, R. E. S.; RAGA, A. Mecanismo de defesa das plantas contra o ataque de insetos sugadores. Instituto Biológico – APTA, Documento Técnico 23, p. 1-13, 2016.

KARANIKA, C. et al. Insecticidal efficacy of a binary combination of cyphenothrin and prallethrin, applied as surface treatment against four major stored-product insects. **Journal of Stored Products Research**, v. 80, p. 41-49, 2019.

KARIMI, J.; ALLAHYARI, M.; BANDANI, A. R. Lectins and their roles in pests control. In: BANDANI, A. R. (ed.). **News perspectives in plant protection**. InTech, p. 207-228, 2012.

KIM, M-S; LAN, Q. Sterol carrier protein-x gene and effects of sterol carrier protein-2 inhibitors on lipid uptake in *Manduca sexta*. **BMC Physiology**, v. 10, n. 9, p. 1-15, 2010.

KLOWDEN, M. J. **Physiological Systems in Insects**. 3. ed. Londres: Elsevier, 2013, 682 p.

LAGARDA-DIAZ, I. et al. Identification of membrane proteins of the midgut of *Zabrotes subfasciatus* larvae associated with the insecticidal mechanism of PF2 lectin. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 19, p. 677-682, 2016.

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

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.

LIMA, J. K. A. **Atividade inseticida e mecanismos de ação de *Genipa americana* L. contra adultos de *Tribolium castaneum* (Herbst)**. Tese (Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular). Escola de Enfermagem e Farmácia. Maceió: Universidade Federal de Alagoas, 2019.

LIMA, J. K. A. et al. Biototoxicity of aqueous extract of *Genipa americana* L. bark on red flour beetle *Tribolium castaneum* (Herbst). **Industrial Crops & Products**, v. 156, p. 1-6, 2020.

LIMA, T. A. et al. Termiticidal lectins from *Myracrodruon urundeuva* (Anacardiaceae) cause midgut damages when ingested by *Nasutitermes corniger* (Isoptera; Termitidae) workers. **Pest Manag Sci**, v. 73, p. 991 – 998, 2017.

- LINO, M. A. da S. et al. Fish lectins: a brief review. In: JENKINS, O. P. (ed.), **Advances in Zoology Research**, v. 5. New York: Nova Science Publishers, Inc., p. 95-114, 2013.
- 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.
- LIVINGSTON, J. N.; PURVIS, B. J. Effects of wheat germ agglutinin on insulin binding and insulin sensitivity of fat cells. **The American Journal of Physiology**, v. 238, n. 3, p. 267-275, 1980.
- LONDON, L. et al. Neurobehavioral and neurodevelopmental effects of pesticide exposures. **NeuroToxicology**, v. 33, p. 887-896, 2012.
- LOPES, C. V. A.; DE ALBUQUERQUE, G. S. C. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde debate**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 117, p. 518-534, 2018.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.
- MACEDO, M. L. R.; OLIVEIRA, C. F. R.; OLIVEIRA, C. T. Insecticidal activity of plant lectins and potential application in crop protection. **Molecules**, v. 20, p. 2014-2033, 2015.
- MACHADO, Y. et al. **Triagem de deterrentes alimentares em diversos cultivares de milho naturais e submetidos ao ataque de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)**. In: 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Fortaleza, 2009.
- MACIEL, M. V. et al. Extratos vegetais usados no controle de dípteros vetores de zoonoses. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 12, n. 1, p. 105-112, 2010.
- MAPA. Mercado de bio defensivos cresce mais de 70% no Brasil em um ano, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/feffmercado-de-bio defensivos-cresce-em-mais-de-50-no-brasil>. Acesso em: 05 jul. 2021.

MARINHO-PRADO, J. S. et al. Bioatividade de extratos de plantas sobre lagartas de *Anticarsia gemmatalis* e *Helicoverpa armigera*. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 78. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2018.

MEDEIROS, M. N. C., MEDEIROS, M. C., SILVA, M. B. A. Intoxicação aguda por agrotóxicos anticolinesterásicos na cidade do Recife, Pernambuco, 2007-2010. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 23, n. 3, p. 509-518, 2014.

MENDES, W. B. S. et al. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antiacetilcolinesterásica da folha e casca do jenipapeiro (*Genipa americana* L.)**. In: 57° Congresso Brasileiro de Química, Resumo, Gramado, 2017.

MITCHELL, C. et al. Plant defense against herbivorous pests: exploiting resistance and tolerance traits for sustainable crop protection. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1-8, 2016.

MOREIRA, M. F.; MANSUR, J.F.; FIGUEIRA-MANSUR, J. **Resistência e Inseticidas: Estratégias, Desafios e Perspectivas no Controle de Insetos**. In: Tópicos Avançados em Entomologia Molecular Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular INCT – EM – 2012.

MOURA, J. I. L.; BITTENCOURT, M. A. L. **Manejo integrado das pragas da gravioleira no sul da Bahia**. Ilhéus, BA: Editus, 2015, 60 p.

NAPOLEÃO, T. H. et al. 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. et al. Insect midgut structures and molecules as targets of plant-derived protease inhibitors and lectins. **Pest Management Science**, v. 75, n. 5, p. 1212-1222, 2018.

NATION, J. L. **Insect Physiology and Biochemistry**. 2. ed. Londres: CRC Press, 2008, 560 p.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014, 1220 p.

NOMAN, A. et al. Insects-plants-pathogens: Toxicity, dependence and defense dynamics. **Toxicon**, v. 197, p. 87-98, 2021.

NUNES, N. N. S. et al. Potential of the lectin/inhibitor isolated from *Crataeva tapia* bark (CrataBL) for controlling *Callosobruchus maculatus* larvae development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 48, p. 10431-10436, 2015.

OLIVEIRA, A. da S. et al. Efficacy of insecticides in fruit borer control and residues on sugar apple fruit. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 64, n. 2, p. 132-137, 2017.

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.

OWENS, B. How plants and insects inherit immunity from their parents. **Nature Outlook: Vaccines**, v. 575, 2019.

PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Purification and Partial Characterization of Two Lectin Isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu Bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 36, p. 113-118, 1992.

PAIVA, P. M. G. et al. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. In: MENDEZ-VILAS, A. (ed.). **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, p. 396-406, 2010.

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 Science Publishers, Inc., p. 269-294, 2011.

PAIVA, P. M. G. et al. Insecticide activity of lectins and secondary metabolites. In: **Insecticides-advances in integrated pest management**. IntechOpen, 2012a.

PAIVA, P.M.G. et al. Effects of plant lectins and trypsin inhibitors on development, morphology and biochemistry of insect larvae. In: Pourali, K., Raad, V.N. (Eds.), **Larvae: Morphology, Biology and Life Cycle**. Nova Science Publishers Inc., New York, p. 37-55, 2012b.

PASSOS, A. Produção em crescimento. Mais grãos. **Safra: Revista do Agronegócio**, n. 191, p. 39-43, 2017.

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

PEREIRA, M. J. B. **Biologia, exigências térmicas e inimigos naturais da broca-da-polpa das anonáceas *Cerconota anonella* (SEPP, 1830) (Lepidoptera: Oecophoridae)**. Tese (Doutorado em Entomologia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba: USP, 2001.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as Plant Defense Proteins. **Plant Physiology**, v. 109, n. 2, p. 347-352, 1995.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Plant Lectins: Versatile Proteins with Important Perspectives in Biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 15, p. 199-228, 1998.

PINTO, C. P. G. A digestão dos insetos mastigadores: fisiologia e potencial uso no manejo integrado de pragas (MIP). **Biológico**, São Paulo, v. 81, n. 1, p. 1-13, 2019.

PINTO-ZEVALLOS, D. M. et al. Compostos orgânicos voláteis na defesa induzida das plantas contra insetos herbívoros. **Química Nova**, v. 36, n. 9, p. 1395-1405, 2013.

PIRES, E. V. **Extração e identificação dos componentes do feromônio sexual da broca dos frutos da pinha e da graviola, *Cerconota anonella* (Sepp., 1830) (Lepidoptera: Oecophoridae)**. Tese (Doutorado em Bioquímica). Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió: Universidade Federal de Alagoas, 2013.

PROCÓPIO, T. F. et al. Antibacterial lectins: action mechanisms, defensive roles and biotechnological potential. In: COLLINS, E. (ed.), **Antibacterials: Synthesis, Properties and Biological Activities**. New York: Nova Science Publishers, Inc., p. 69-89, 2017.

RAFAEL, J. A.; AGUIAR, A. P.; AMORIM, D. de S. Knowledge of insect diversity in Brazil: challenges and advances. **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 5, p. 565-570, 2009.

RAFAEL, J. A. et al. **Insetos do Brasil: diversidade e taxonomia**. Ribeirão Preto: Holos, 2012, 810 p.

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

RAHIMI, V. et al. Toxicity and physiological effects of na extracted lectin from *Polygonum persicaria* L. on *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Physiological and molecular plant pathology**, v. 101, p. 38-44, 2018.

RAMZI, S.; SAHRAGARD, A.; ZIBAE, A. Effects of *Citrullus colocynthis* agglutinin on intermediary metabolism of *Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 17, p. 273-279, 2014.

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.

SHAHIDI-NOGHABI, S. et al. Internalization of *Sambucus nigra* agglutinins I and II in insect midgut CF-203 cells. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 76, n. 4, p. 211–222, 2011.

SHANTIBALA, T.; LOKESHWARI, R. K.; DEBARAJ, H. Nutritional and antinutritional composition of the five species of aquatic edible insects consumed in Manipur, India. **Journal of Insect Science**, v. 14, n. 14, 2014.

SHARON, N.; LIS, H. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. In: **The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates**, v. 2, p. 1-16, 2001.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53-62, 2004.

SHEKARI, M. et al. Effects of *Artemisia annua* L. (Asteracea) on nutritional physiology and enzyme activities of elm leaf beetle, *Xanthogaleruca luteola* Mull. (Coleoptera: Chrysomellidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 91, p. 66-74, 2008.

SILVA, C. P.; LEMOS, F. J. A.; DA SILVA, J. R. **Digestão em Insetos**. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular INCT – EM – 2012.

SILVA, P. M. **Caracterização estrutural e avaliação da atividade antimicrobiana da lectina da testa de *Punica granatum* L.** Dissertação de mestrado. Bioquímica e Fisiologia. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica** – Ciências Agrárias e Biológica. v.1, n. 1, p.9, 2007.

SOBRINHO, R. B. Integrated production of Annonaceae in Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 1, p. 102-107, 2014.

SOBRINHO, R. B. et al. Identificação e Monitoramento de Pragas na Produção Integrada da Graviroleira. Fortaleza: **Embrapa Agroindústria Tropical**, Documentos 142, 2011.

SUJII, E. R. et al. Controle de artrópodes-praga com insetos predadores. In: FONTES, E. M. G.; VALADARES-INGLIS, M. C. (ed.). **Controle Biológico de Pragas da Agricultura**. Brasília, DF: Embrapa, 2020.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Evolutionary trends of digestion and absorption in the major insect orders. **Arthropod Structure & Development**, v. 56, 2020.

TREMACOLDI, C. R. Proteases e inibidores de proteases na defesa de plantas contra pragas. Belém, PA: **Embrapa Amazônia Oriental**, 2009, 44p.

TULASHIE, S. K. et al. Potential of neem extracts as natural insecticide against fall armyworm (*Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)). **Case Studies in Chemical and Environmental Engineering**, v. 4, p. 1-7, 2021.

VAN DAMME, E. J. M. et al. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, n. 6, p. 575-692, 1998.

VANDENBORRE, G.; SMAGGHE, G.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry**, v. 72, p. 1538-1550, 2011.

VASCONCELOS, Y. Inseticida de proteína: nova toxina vegetal é eficaz no combate às pragas da agricultura. **Bioquímica, Pesquisa FAPESP**, ed. 116, p. 76-77, 2005.

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.

WU, Q.; BROWN, M. R. Signaling and function of insulin-like peptides in insects. **Annu. Rev. Entomol.** V. 51, p. 1-24, 2006.

ZIEGLER, R. Changes in lipid and carbohydrate metabolism during starvation in adult *Manduca sexta*. **J. Comp. Physiol. [B]** 161, 125-131. 1991.