



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL
ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA – ESENFAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA
MOLECULAR - PPGBqBM

JANAÍNA KÍVIA ALVES LIMA

ATIVIDADE INSETICIDA E MECANISMOS DE AÇÃO DE CASCAS de *Genipa americana* L. CONTRA *Tribolium castaneum* (Herbst).

MACEIÓ

2020

JANAÍNA KÍVIA ALVES LIMA

ATIVIDADE INSETICIDA E MECANISMOS DE AÇÃO DE CASCAS de *Genipa americana* L. CONTRA *Tribolium castaneum* (Herbst).

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Alagoas, como requisito necessário para a aprovação e obtenção do título de Doutora em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Francis Soares Gomes

Coorientador: Prof. Dr. Hatsabura Masuda (UFRJ)

MACEIÓ

2020

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

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

L732a Lima, Janáina Kívia Alves.
Atividade inseticida e mecanismos de ação de cascas de *Genipa americana* L. contra *Tribolium castaneum* (Herbst) / Janáina Kívia Alves Lima. – 2020.
113 f. : il. color., graf., tabs.

Orientador: Francis Soares Gomes.
Co-orientador: Hatsabura Masuda.
Tese (doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Universidade Federal de Alagoas. Escola de Enfermagem e Farmácia. Maceió, 2020.

Bibliografia: f. 83-100.
Anexos: f. 101-113.

1. Proteína inseticida. 2. Plantas - Efeito dos inseticidas. 3. Pragas - Controle. 4. Bioquímica. I. Título.

CDU: 577

Folha de Aprovação

JANAÍNA KÍVIA ALVES LIMA

ATIVIDADE INSETICIDA E MECANISMOS DE AÇÃO DE CASCAS de *Genipa americana* L. CONTRA *Tribolium castaneum* (Herbst).

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Alagoas, como requisito necessário para a aprovação e obtenção do título de Doutora em Bioquímica e Biologia Molecular.



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

Banca examinadora:



Profa. Dra. Aldenir Feitosa dos Santos – UNEAL (Examinadora externa)



Profa. Dra. Ruth Rufino do Nascimento – UFAL (Examinadora externa)



Profa. Dra. Adriana de Lima Mendonça – UNIT (Examinadora externa)



Prof. Dr. Luciano Aparecido M. Grillo
Coordenador PPGCF / UFAL
SIAPE 1653558

Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo - UFAL (Examinador Interno)

Sem Amor eu nada seria...

E é com todo esse amor que dedico esta
tese àqueles que sonharam comigo e me
possibilitaram alcançar, Minha família!

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, pelas oportunidades vividas, pela certeza da tua proteção e teu amor onipresentes.

À minha filha, Malu, que sofreu com a minha ausência, e me fez resiliente mesmo sem entender tudo o que se passava, que todos os dias me faz entender a importância e as consequências das minhas escolhas e por quem eu desejo ser cada dia melhor.

Aos meu pais, Edmilson e Nilva, meus irmãos, Everton e Nicoli, que sempre foram o meu porto seguro, o meu lar, que acreditam em mim e não me permitem desistir. Por cuidar da minha família, por aceitar (mesmo sem entender) toda minha ausência. Que sonharam junto comigo e propiciaram que eu alcançasse. Mais uma vez essa vitória é NOSSA!

Ao meu marido, Aldo, por ser o melhor companheiro que poderia ter. Sempre sereno, amoroso, acolhedor. Que entendeu e acreditou nas minhas escolhas e fez dos meus sonhos os dele. Que construiu comigo o nosso bem mais precioso, a nossa família. Você é parte fundamental dessa trajetória, e esse momento não faria sentido sem você comigo.

À minha cunhada Kelly e ao filho que a vida me deu Igor, por serem sempre compreensivos, atenciosos e prestativos, que aceitaram e amenizaram as minhas ausências e se alegram com a minha presença.

Aos demais familiares e aos amigos, por celebrarem junto comigo cada conquista alcançada.

À minha GRANDE parceira nessa trajetória, Camila Chicuta. Qualquer palavra que escreva não conseguirá expressar tudo o que você representa para mim, e para este momento, você não desistiu de mim e nem deixou que eu desistisse, foi meu braço direito, minha fiel escudeira. Foi a minha razão nos momentos em que eu só conseguia ser emoção. Uma amiga que Deus caprichosamente colocou em meu caminho para torna-lo mais leve.

À Andreia Barros, nosso girassol, que tornou os meus dias mais coloridos, afetuosos e otimistas. Que com o seu astral trouxe mais leveza, alegria e

cumplicidade. Obrigada pela delicadeza e ao mesmo tempo firmeza nos teus ensinamentos.

Aos amigos, Beth, Cláudio e Cledson por serem inspiração, exemplos de competência, integridade, empatia e acima de tudo humildade.

Aos Professores, amigos e colegas do Laboratório de Metabolômica e Proteômica - LAMP, UFAL, Professor Dr. Hugo Juarez, Professora Dra. Edma, Lucélia, Laís, Marta, Dávida, Tatiele, Fabiana, Roberta, Alexsandra, Anny, Monizy, Ricardo e Stella, pelos momentos de aprendizado, descontração, angústias e confraternizações.

Ao Professor Dr. Luciano Grillo, e amigos e parceiros do Laboratório de Bioquímica Metabólica - LBM, no qual desenvolvi boa parte dos experimentos desta tese. Em especial, Tomaz, Camilla, Mariana e Josiel, amigos queridos que a Bioquímica e o Tribolium me presentearam.

A Professora Dra. Aldenir Feitosa, minha orientadora da graduação, que mais uma vez me acolheu nesta trajetória e Marília Layse, que me auxiliaram no Laboratório de Ensino de Química – UNEAL, Campus Arapiraca.

Ao Professor Dr. José Vieira, Sivaldo Paulino e ao amigo Anderson Carnaúba, pela atenção e disponibilidade que me receberam no Laboratório de Fisiologia Vegetal – UFAL, Campus Arapiraca.

A Universidade Federal de Alagoas e ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular por viabilizar esta conquista.

A CAPES e FAPEAL, pelo apoio financeiro.

E por fim, ao meu Orientador, Professor Dr. Francis Soares Gomes, por sua competência, serenidade, profissionalismo e pela confiança depositada em mim. Por me desafiar e me servir de exemplo profissional e humano. Serei eternamente grata pela oportunidade de aprender, e de ter tido o senhor como Guia.

Gratidão a todos!

Eu sempre tive planos. Mas, nenhum deles eram melhores do que os planos que Deus tinha para mim.

RESUMO

Para ampliar os conhecimentos acerca do uso de bioinseticidas botânicos, a busca por produtos botânicos que apresentem mecanismos de ação com menores efeitos residuais e baixa toxicidade aos demais animais têm tido um aumento considerável. Na literatura não existem relatos acerca do potencial inseticida do jenipapo (*Genipa americana* L.) para insetos pertencentes a ordem coleoptera, especialmente para o besouro *Tribolium castaneum*, uma das principais pragas de grãos e produtos armazenados no mundo. Neste contexto, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos do extrato, da fração lectínica e da lectina isolados da casca de *G. americana* sobre *T. castaneum*. Para isso, foi preparado o extrato aquoso (Tris-HCl) da casca de *G. americana* a partir do qual se obteve a fração proteica, oriunda do fracionamento salino com sulfato de amônio, e a lectina (GaBL) isolada por cromatografia de gel filtração. Foi realizada análise fitoquímica do extrato e da fração proteica de *G. americana*. Os bioensaios “*in vivo*” foram realizados utilizando adultos de *T. castaneum* analisou a sobrevivência, ação deterrente, os efeitos sobre os parâmetros nutricionais e bioquímicos e os efeitos sobre a reprodução dos insetos mantidos ao longo de 28 dias com a metodologia da dieta artificial contendo o extrato, a fração ou GaBL. Pode-se observar que o extrato aquoso de *G. americana* tem como principais compostos secundários as saponinas, taninos e esteóides, estes com ação inseticida já descrita para diferentes ordens de insetos. Observou-se, que o extrato de *G. americana* apresentou maior efeito na sobrevivência de *T. castaneum* na concentração de 250mg/g. O extrato também apresentou efeito deterrente e interferência nos parâmetros nutricionais e bioquímicos demonstrados pela redução do consumo alimentar e ineficiência na conversão de alimento, ocasionando perda de biomassa. A fração 20%, também exerceu efeito inseticida em *T. castaneum* nas concentrações de 50 e 100mg/g, não foi observado efeito deterrente, entretanto, mesmo consumindo de forma satisfatória o alimento, os insetos não conseguiram converter este em biomassa, e em reservas energéticas evidenciando o efeito antinutricional. GaBL é um dos princípios ativos da ação inseticida, demonstrado pelo aumento considerável nos efeitos deterrentes e sobre a sobrevivência e todos os parâmetros nutricionais e bioquímicos analisados nas concentrações testadas. Com base nos dados obtidos, este trabalho representa uma contribuição promissora para a busca por métodos alternativos para o controle de insetos-pragas, sendo este o primeiro relato sobre a ação de *G. americana* sobre *T. castaneum* e um dos primeiros utilizando uma fração proteica com potencial para uso no manejo de pragas.

Palavras-chave: proteína inseticida, manejo de pragas, bioquímica.

ABSTRACT

In order to increase knowledge about the use of botanical bioinsecticides, the search for botanical products that have mechanisms of action with less residual effects and low toxicity to other animals has increased considerably. There are no reports in the literature about the insecticidal potential of genipap (*Genipa americana* L.) for insects belonging to the order Coleoptera, especially for the beetle *Tribolium castaneum*, one of the main pests of grains and products stored in the world. In this context, the present study aimed to evaluate the effects of the extract, lectin fraction and lectin isolated from the bark of *G. americana* on *T. castaneum*. For this purpose, the aqueous extract (Tris-HCl) of the *G. americana* bark was prepared from which the protein fraction was obtained, derived from the saline fractionation with ammonium sulfate, and the lectin (GaBL) isolated by filtration gel chromatography. Phytochemical analysis of the extract and protein fraction of *G. americana* was performed. The "in vivo" bioassays were carried out using adults of *T. castaneum* analyzed the survival, deterrent action, the effects on the nutritional and biochemical parameters and the effects on the reproduction of insects kept over 28 days with the artificial diet methodology containing the extract, the fraction or GaBL. It can be observed that the aqueous extract of *G. americana* has saponins, tannins and steroids as main secondary compounds, these with insecticidal action already described for different orders of insects. It was observed that the extract of *G. americana* had a greater effect on the survival of *T. castaneum* at a concentration of 250mg / g. The extract also showed a deterrent effect and interference in the nutritional and biochemical parameters demonstrated by the reduction of food consumption and inefficiency in food conversion, causing loss of biomass. The 20% fraction also exerted an insecticidal effect on *T. castaneum* at concentrations of 50 and 100mg / g, but no deterrent effect was observed, however, even though the food was satisfactorily consumed, the insects were unable to convert it into biomass, and in reserves energies showing the anti-nutritional effect. GaBL is one of the active principles of the insecticidal action, demonstrated by the considerable increase in the deterrent effects and on the survival and all the nutritional and biochemical parameters analyzed in the tested concentrations. Based on the data obtained, this work represents a promising contribution to the search for alternative methods for the control of insect pests, this being the first report on the action of *G. americana* on *T. castaneum* and one of the first using a protein fraction with potential for use in pest management.

Key words: insecticidal protein, pest management, biochemistry.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Representação do ciclo de vida holometábolo do *T. castaneum*, destacando as 4 fases principais do seu desenvolvimento: A: ovo; B: larva; C: pupa e D: adulto. 24
- Figura 2 - Principais classes de metabólitos expressos em plantas estimulados pela herbivoria. 29
- Figura 3 - Classificação estrutural das lectinas de plantas, com ênfase para os DRC. 35
- Figura 4 – Representação dos ensaios de hemaglutinação. (A) detecção de lectinas. (B) inibição da atividade hemaglutinante por carboidratos. 36
- Figura 5 – Representação das principais estruturas e moléculas relacionadas como sítios de ligação das lectinas de plantas nos insetos. 37
- Figura 6 - Esquema ilustrativo dos possíveis alvos moleculares e os mecanismos de ação associados às lectinas vegetais e seus efeitos antinutricionais. 39
- Figura 7 – Estrutura do intestino dos insetos, onde estão representados, A: intestino anterior; B: intestino médio e C: intestino posterior. Onde destaca-se 1. Células regenerativas; 2. Células enteroendócrinas que separa o lúmen intestinal em dois espaços 3: endoperitrófico e 4: ectoperitrófico, os destinos dos nutrientes ingeridos, proteínas, lipídeos e carboidratos. 42
- Figura 8 – *Genipa americana* L. (A): planta adulta; (B) flor e fruto. 46

Figura 9 – Dieta artificial utilizada nos bioensaios destacando cada unidade experimental com as 5 alíquotas contendo a dieta;	53
Figura 10 - curva de sobrevivência de Kaplan-Meier dos adultos de <i>T. castaneum</i> mantidos em dieta artificial com: A: extrato aquoso, B: fração proteica e C: GaBL isolada de cascas de <i>G. americana</i> .	59
Figura 11 - Efeito deterrente de <i>G. americana</i> sobre adultos de <i>T. castaneum</i> . A: extrato aquoso, B: fração proteica e C: GaBL.	61
Figura 12 - Parâmetros nutricionais de adultos de <i>T. castaneum</i> mantidos em dieta artificial contendo ou não extrato de <i>G. americana</i> . A: RCR = Taxa de consumo relativo (mg); B: RGR = Taxa de crescimento relativo (mg); C: ECI = eficiência de conversão do alimento ingerido (mg).	65
Figura 13 – Parâmetros nutricionais de adultos de <i>T. castaneum</i> mantidos em dieta artificial contendo uma fração proteica de <i>G. americana</i> . A: RCR = Taxa de consumo de alimento (mg); B: RGR = Taxa de crescimento relativo (mg); C: ECI = eficiência de conversão do alimento ingerido (mg).	66
Figura 14 - Parâmetros nutricionais de adultos de <i>T. castaneum</i> mantidos em dieta artificial contendo GaBL (500µg, 1mg, 2mg ou 4mg). A: RCR = Taxa de consumo de alimento (mg); B: RGR = Taxa de biomassa relativa do inseto (mg); C: ECI = eficiência de conversão do alimento ingerido (mg).	67
Figura 15 - Perfil bioquímico total de adultos de <i>T. castaneum</i> mantidos em dieta artificial contendo ou não extrato de <i>G. americana</i> . A: proteínas totais; B: glicose total; C: TAG total; D: colesterol total.	71

- Figura 16 - Perfil bioquímico total de adultos de *T. castaneum* mantidos em dieta artificial contendo ou não F20% de *G. americana*. A: proteínas totais; B: glicose total; C: TAG total; D: colesterol total. 73
- Figura 17 - Perfil bioquímico total de adultos de *T. castaneum* mantidos em dieta artificial contendo ou GaBL. A: proteínas totais; B: glicose total; C: TAG total; D: colesterol total. 75
- Figura 18 – Eclosão de larvas de *T. castaneum* mantidos 28 dias em dieta artificial contendo ou não *G. americana*. A: extrato aquoso, B: fração proteica e C: GaBL. 77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais insetos-praga de grãos e produtos armazenados e seu status praga (primária ou secundária) baseado no hábito alimentar.	21-22
	27
Tabela 2 – Fatores de resistência constitutivos e fatores induzíveis por herbivoria em plantas.	
Tabela 3 - Principais nutrientes e agentes antinutrientes derivados dos mecanismos de defesa das plantas em resposta aos insetos fitófagos.	44
Tabela 4. Análise qualitativa dos principais componentes fitoquímicos do extrato aquoso e da fração proteica de <i>G. americana</i> .	56

LISTA DE ABREVIATURAS

AaIT - neurotoxina de escorpião *Androctonus australis*

BmoLL - lectina das folhas de *Bauhinia monandra*

Bt – *Bacillus thuringiensis*

CEA - lectina de *Colocasia esculenta* Tuber

Con A - *Canavalia ensiformis*

cMoL - lectina de sementes *Moringa oleifera* Lamarck

DDT - Dicloro-difenil-tricloroetano

DRC - Domínios de reconhecimento a carboidratos

ECI - eficiência da conversão do alimento ingerido

FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura

FPLC - Cromatografia líquida de alta resolução

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

HAMPs - moléculas sinalizadoras semelhantes a eliciadores derivados de herbívoros

Lp - Lipoforina

MP – membrana ou matriz peritrófica

MIP – Manejo Integrado de Pragas

ONU – Organização das Nações Unidas

RCR - taxa de consumo relativo

RGR - taxa de biomassa relativa

RIPs - Proteínas Inativadoras de Ribossomos

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
2.	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	Insetos-praga	20
2.1.1	Insetos-praga de grãos armazenados	21
2.1.2	<i>Tribolium castaneum</i> (Herbst)	23
2.2	Controle de Pragas de produtos armazenados	25
2.3	Interação Inseto-planta	27
2.4	Bioinseticidas no controle de pragas	30
2.5	Proteínas aplicadas à proteção de plantas	32
2.6	Lectinas	34
2.6.1	Lectinas vegetais com potencial inseticida e seus mecanismos de ação	36
2.7	Nutrição e digestão nos insetos	39
2.7.1	Agentes antinutricionais no controle de insetos-praga	43
2.8	<i>Genipa americana</i> L.	45
3.	OBJETIVOS	48
3.1	Objetivo Geral	48
3.2	Objetivos Específicos	48
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1	Insetos e Material vegetal	49
4.2	Obtenção das amostras utilizadas nos bioensaios	49
4.3	Dosagem de proteínas	50
4.4	Atividade hemaglutinante	50

4.5	Análise fitoquímica	51
4.5.1	Testes para fenóis, taninos pirogálicos e taninos flobatênicos	51
4.5.2	Testes para para antocianina e antocianidina, flavonas, flavonóis e xantonas, chalconas e auronas, flavononóis	51
4.5.3	Teste para leucoantonocianidinas, catequinas e flavanonas	52
4.5.4	Testes para flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas	52
4.5.5	Teste para esteróides e triterpenóides	52
4.5.6	Teste para saponinas	52
4.6	Bioensaios	53
4.6.1	Análise da sobrevivência	53
4.6.2	Avaliação dos efeitos de <i>G. americana</i> sobre a alimentação e índices nutricionais de <i>T. castaneum</i>	54
4.7	Efeitos bioquímicos	54
4.8	Efeitos sobre a reprodução	55
4.9	Análise estatística	55
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	56
5.1	Análise fitoquímica do extrato aquoso e fração proteica de <i>G. americana</i>	56
5.2	Efeitos de <i>Genipa americana</i> sobre adultos de <i>Tribolium castaneum</i>	57
5.2.1	Avaliação da sobrevivência de <i>T. castaneum</i> mantidos em dieta artificial com o extrato, a fração proteica e a lectina de <i>G. americana</i> .	58
5.2.2	Efeitos de <i>G. americana</i> sobre a alimentação de <i>T. castaneum</i>	60
5.2.3	Efeitos de <i>G. americana</i> sobre os parâmetros nutricionais de <i>T. castaneum</i> .	63

5.2.4	Parâmetros bioquímicos de <i>T. castaneum</i> mantidos em dieta artificial contendo <i>G. americana</i>	69
5.3	Inibição da oviposição de <i>T. castaneum</i> mantido em dieta artificial contendo <i>G. americana</i>	76
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
7.	PRODUÇÕES CIENTÍFICAS	82
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

ANEXO A – produção referente à tese
Apresentação de trabalho na forma de banner durante a XIV Reunião regional da SBBq realizada em Salvador em 2018.

ANEXO B - produção referente à tese
Prêmio SBBq de melhores cartazes apresentados durante a XIV Reunião regional da SBBq realizada em Salvador em 2018.

ANEXO C – produção referente à tese
Patente oriunda da atividade inseticida de GaBL sobre *T. castaneum* depositada no INPI (BR 10 2020 005977 7).

ANEXO D – produção não referente à tese
Preparações com atividade inseticida contra insetos adultos do besouro *Tribolium castaneum* (Herbst 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae).

ANEXO E - produção não referente à tese
Obtenção de inseticida a partir do colmo de *Guadua angustifolia* Kunth (Poaceae: Bambusoideae) contra o besouro *Tribolium castaneum* (Herbst 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae).

1. INTRODUÇÃO

Os insetos-praga configuram um problema relevante na agricultura, e constituem o principal fator de perda de grãos do cultivo ao armazenamento, em especial, nas nações onde a agricultura tem maior relevância para a economia, e onde as práticas agrícolas ainda não atingiram altos padrões técnicos e processuais (KUMAR;KALITA, 2017; LUNDSTRÖMA et al, 2017).

Estimativas sugerem que 251,9 milhões de toneladas de grãos foram produzidos nas safras brasileiras em 2019 (CONAB, 2019). Entretanto, sendo o Brasil um país tropical, com o clima que favorece a proliferação de diversas pragas, cerca de 10% da produção de grãos/ano são perdidas quantitativa e qualitativamente nas safras nacionais (LORINI, et al., 2015). Estratégias de controle destes insetos, são de interesse das indústrias agrícolas e alimentícias, uma vez que se estima que 67000 espécies de pragas acometem as culturas de interesse socioeconômico e, que grande parte destas já apresentam resistência aos produtos disponíveis no mercado (CAMAROTI et al., 2017; CHANDLER et al., 2011).

Os insetos da ordem Coleoptera, especificamente, pragas de produtos armazenados e cereais, são um problema sob o aspecto de danos econômicos e comercialização. O *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae), é uma dessas pragas e tem apresentado alta resistência a pesticidas sintéticos, das classes dos organofosforados e piretróides (BOSSOU et al., 2015; CABALLERO-GALLARDO, 2010).

Além do aumento da resistência aos inseticidas convencionais, a expansão do mercado orgânico aumentou a busca por novos produtos botânicos para controlar pragas, com enfoque em alternativas com modos de ação, que não apresentem efeito residual sobre o produto aplicável, ao ambiente e a saúde humana (KIRAN; PRAKASH, 2015).

As plantas, em resposta ao ataque de insetos e microrganismos, produzem vários metabólitos que podem ser responsáveis pela resistência ou tolerância ao ataque destas pragas. Com relação aos produtos de origem natural muitos extratos, óleos essenciais e outros derivados de plantas têm sido testados quanto ao seu potencial de combate a pragas (CABALLERO-GALLARDO et al. 2010; ISMAN, 2006). Estes produtos apresentam desde efeitos

comportamentais (repelência, deterrência alimentar, deterrência de oviposição) como efeitos tóxicos, alterações bioquímicas e fisiológicas, inibição do desenvolvimento e inibição do crescimento (ISMAN, 2017; NUNES et al., 2015).

Entre os produtos do metabolismo das plantas, a atividade inseticida de proteínas tem sido descrita para diversas ordens de insetos, em especial, dos inibidores de protease e lectinas. No entanto, os mecanismos pelos quais as proteínas exercem seus efeitos são pouco conhecidos e tem despertado grande interesse nos últimos anos (PAIVA et al. 2011; WALSKI et al. 2014).

O jenipapo, *Genipa americana* L., uma árvore da família Rubiaceae, é considerado uma espécie de importância econômica, seja pela sua essência ou utilização na produção de alimentos, tais como o licor e geleias. Na medicina popular, é descrito com atividades analgésica, antimalárica, antipirética e inseticida (MOURA, et al., 2016; SILVA et al, 1998). Considerando a escassez de relatos na literatura acerca do potencial inseticida desta planta para insetos da ordem coleoptera, especificamente sobre o *T. castaneum*, a avaliação destes efeitos pode contribuir para o avanço na busca de métodos alternativos de controle de insetos praga de grãos armazenados. Neste contexto, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos do extrato, da fração lectínica e da lectina de cascas de *G. americana* sobre adultos de *T. castaneum*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Insetos Pragas

Os insetos são os organismos eucariotos mais abundantes, diversos e adaptáveis na natureza, ocupando uma ampla variedade de habitats e nichos ecológicos. Devido ao hábito herbívoro, em pelo menos uma fase do seu desenvolvimento, apresentam um papel ecológico importante, podendo agir como predadores, parasitoides, polinizadores, fitófagos e outros (GALLO et al., 2002). Por outro lado, essas mesmas características aliadas aos hábitos alimentares e comportamentais levaram os insetos, ao longo da evolução, a se tornarem pragas devido aos prejuízos causados em diversas culturas, aos danos estruturais nos ambientes rurais e urbanos, além de serem vetores de doenças para humanos e outros animais (SÃO JOÃO; RAGA, 2016).

No contexto do Manejo Integrado de Pragas (MIP), para fins de controle, os insetos são classificados como praga quando atingem o nível populacional capaz de causar dano econômico (PICANÇO, 2010). Os prejuízos, variam desde a perda do valor comercial devido a alterações no sabor, cheiro ou aspecto visual, até a morte da planta (GALLO et al, 2002; GURU-PIRASANNA-PANDI et al, 2018).

Estima-se que existam mais de um milhão de espécies de insetos descritas no mundo, das quais ao menos 10% já são relatadas como pragas. Entre as principais ordens de insetos que causam danos econômicos, sociais e/ou ambientais destacam-se: Coleoptera, Lepidoptera, Diptera, Orthoptera, Heteroptera e Hemiptera. Desses, 40% são insetos da ordem Coleoptera. (GALLO et al, 2002; IMENES; IDE, 2002; LORINI et al, 2015).

Conhecida como uma das ordens de maior importância econômica e de interesse agrícola, na ordem coleoptera já foram descritas mais de 300.000 espécies de besouros, as quais estão organizadas em seis subordens (LORINI et al, 2015). Ela é constituída por insetos de tamanho e ecologia alimentar muito variados, que apresentam desenvolvimento holometabólico, e caracterizam-se por possuir um par de asas endurecidas, denominadas élitros. Os adultos e as larvas possuem aparelho bucal mastigador, apresentando grande variação nos

hábitos alimentares que fazem deles importantes pragas, em especial de grãos e produtos armazenados (GALLO et al., 2002; IMENES; IDES, 2002).

2.1.1 Insetos-praga de grãos armazenados

O Brasil é um país cujo grande potencial de produção de grãos ainda não foi plenamente explorado. Segundo a FAO (Food and Agriculture Organization), 70% da produção agrícola é armazenada por agricultores para diferentes fins (LORINI et al, 2015). Os insetos que se desenvolvem em produtos armazenados (tabela 1), sejam eles, pragas primárias (atacam grãos saudáveis e inteiros) ou secundárias (atacam grãos danificados), apresentam características de acordo com o ambiente em que se encontram, sendo geralmente pequenos e adaptados a ambientes muito secos e escuros (LORINI, 2000; LORINI, 2002; LORINI, 2008). Insetos e ácaros são os principais responsáveis pela deterioração dos alimentos armazenados, e causam perdas anuais estimadas em cerca de 30% de 1. 800 milhões de toneladas de grãos armazenados (BOYER et al, 2012).

Tabela 1 – Os principais insetos-praga de grãos e produtos armazenados e seu status de praga (primária ou secundária) baseado no hábito alimentar.

Espécie	Ordem	Família	Status da praga
<i>Rhyzopertha dominica</i> (Fabricius, 1972)	Coleoptera	Bostrychidae	Primária
<i>Sitophilus oryzae</i> (Linnaeus, 1763)	Coleoptera	Curculionidae	Primária
<i>Sitophilus zeamais</i> (Motschulsky, 1855)	Coleoptera	Curculionidae	Primária
<i>Tribolium castaneum</i> (Herbst, 1797)	Coleoptera	Tenebrionidae	Secundária
<i>Tribolium confusum</i> (Du Val, 1863)	Coleoptera	Tenebrionidae	Secundária
<i>Oryzaephilus</i> <i>surinamensis</i> (Linnaeus, 1758)	Coleoptera	Silvanidae	Secundária

<i>Cryptolestes ferrugineus</i> (Stephens, 1831)	Coleoptera	Cucujidae	Secundária
<i>Sitotroga cerealella</i> (Oliver, 1789)	Lepidoptera	Gelechiidae	Primária
<i>Plodia interpunctella</i> (Hübner, 1813)	Lepidoptera	Pyralidae	Primária
<i>Ephestia kuehniella</i> (Zeller, 1879)	Lepidoptera	Pyralidae	Secundária
<i>Ephestia elutella</i> (Hübner, 1796)	Lepidoptera	Pyralidae	Secundária
<i>Lasioderma serricorne</i> (Fabricius, 1792)	Coleoptera	Anobiidae	Secundária
<i>Acanthoscelides obtectus</i> (Say, 1831)	Coleoptera	Curculionidae	Secundária
<i>Tenebrio molitor</i> (Linnaeus, 1758)	Coleoptera	Tenebrionidae	Secundária
<i>Callosobruchus maculatus</i> (Fabricius, 1775)	Coleoptera	Bruchinae	Secundária

Autor, 2019.

As pragas dos produtos armazenados podem ainda destruir materiais (livros), seja a caminho de locais de pupação (prédios históricos), ou porque os materiais contêm ingredientes adequados para o seu desenvolvimento, o que favorece ainda mais a adaptabilidade destes insetos (SCHÖLLER, 2010).

Existem dois importantes grupos de pragas que atacam os grãos e sementes armazenadas, que são besouros e traças, e estão organizados em duas ordens principalmente, os insetos da ordem Coleoptera e os da ordem Lepidoptera. Os coleópteros, apresentam características como alta resistência, que lhes permite movimentar-se por reduzidos espaços entre os grãos, e nas grandes profundidades dos silos e graneleiros. Por sua vez, os lepidópteros são frágeis e, geralmente, localizam-se na superfície dos grãos, provocando, assim, menos prejuízos que os coleópteros (FARONI; SOUZA, 2006). Os danos causados pelos lepidópteros estão associados principalmente as larvas, os coleópteros tanto larvas como adultos são responsáveis por graves danos. Por

essas características, os coleópteros tornaram-se ainda mais adaptáveis aos ambientes de armazenagem, sendo então os principais insetos-praga dos grãos e produtos armazenados (BOYER et al, 2012; MOHAPATRA et al, 2015).

Pertencem a ordem coleoptera a maior parte dos besouros encontrados no feijão, no arroz, na soja, no trigo, e que são comumente chamados de gorgulhos ou carunchos. Os relatórios da Organização das Nações Unidas (ONU) sugerem que os besouros das espécies *Sitophilus oryzae* (Linnaeus, 1763) (Coleoptera: Curculionidae) e *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae), são os dois principais insetos praga de arroz em todo o mundo, sendo as pragas de grãos mais devastadoras, podendo causar de 30 a 40% de perdas de peso dos materiais (GURU-PIRASANNA-PANDI et al, 2018).

A família Tenebrionidae, com mais de 10.000 espécies de insetos já descritas, apresenta 100 destas espécies associadas com os produtos armazenados. Dentre as espécies mais representativas destacam-se duas espécies de *Tribolium*, *T. castaneum*, *T. confusum* e duas espécies de *Tenebrio*, *T. molitor* e *T. obscurus*, todas bem adaptadas a ambientes muito secos, sendo consideradas as importantes pragas secundárias de produtos armazenados (FARONI; SOUSA, 2012; LORINI et, al 2015).

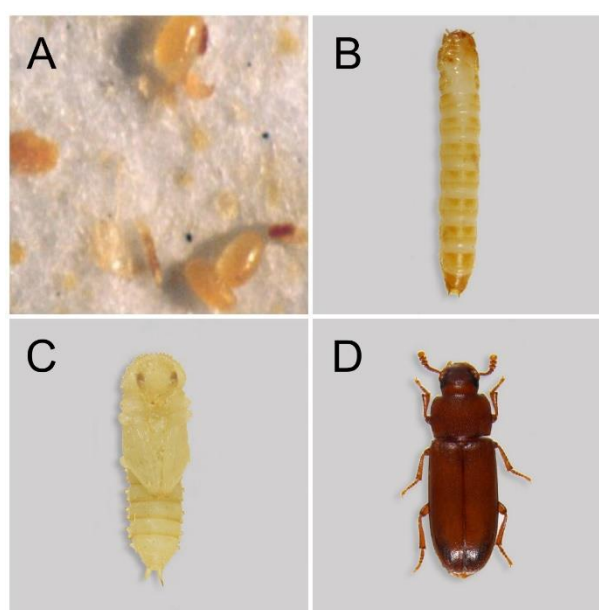
2.1.2 *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797)

Junto às espécies de *Tenebrio*, as espécies do gênero *Tribolium* são pragas bastante comuns de grãos armazenados, farinha e outros produtos de cereais. O *T. castaneum*, conhecido como o besouro vermelho da farinha, classifica-se como uma das mais sérias pragas devido a sua abundância nos locais de estocagem, bem como sua capacidade de danificar os grãos tanto na fase larval como na fase adulta, onde podem causar redução do peso dos grãos (DISSANAYAKA et al, 2018; KARANIKI et al, 2019; HU et al, 2019).

O *T. castaneum* é um inseto holometábolo, com metamorfose completa (figura 1). Os adultos têm coloração castanho avermelhada, medem de 3 a 3,8 mm. As larvas são branco-amareladas, cilíndricas, medindo 7 mm de comprimento. Os ovos são pequenos e claros. As fêmeas depositam de 300 a 500 ovos durante a sua vida, ovipositam nas fendas das paredes dos armazéns,

na sacaria e sobre os grãos. Em condições de temperatura (35 °C) e umidade favoráveis (70%), o ciclo do ovo ao adulto se completa entre 30 e 40 dias. As fases de ovo e pupa (estado intermediário entre larvas e fase adulta) apresentam maior resistência à ação dos inseticidas, sendo uma das primeiras espécies a reinfestar os grãos após o tratamento (BELCHOL; TEIXEIRA, 2007; BROWN et al, 2009; GALLO et al, 2002).

Figura 1 – representação do ciclo de vida holometábolo do *T. castaneum*, destacando as 4 fases principais do seu desenvolvimento: A: ovo; B: larva; C: pupa e D: adulto.



Fonte: Adaptada de KHAN et al., 2016; LEELAJA et al., 2007.

Ao longo do tempo, o controle de *T. castaneum* tem se baseado no uso de produtos químicos promovendo o surgimento e desenvolvimento de altos níveis de resistência a inseticidas no gênero *Tribolium*. Dentre os inseticidas químicos já existe relatos na literatura sobre a resistência a inseticidas organofosforados e piretróides, tais como, malatim, pirimifosmetil, fenitrotiona para diferentes espécies entre elas, *T. castaneum* (BOSSOU et al, 2015; BOYER et al, 2012).

Vários são os mecanismos associados a resistência aos inseticidas. A desintoxicação mediada pelo citocromo P450 é um dos mecanismos mais importantes envolvidos. Por apresentar sequenciamento completo, possibilitando assim o estudo mais específico de novos alvos moleculares para

ação dos agentes inseticidas, o *T. castaneum* tornou-se um organismo modelo ideal para pesquisa sobre novos inseticidas e sobre a resistência aos inseticidas já descritos (ZHU et al, 2010).

2.2 Controle de pragas de produtos armazenados

O uso excessivo de agrotóxicos na agricultura brasileira tornou-se um problema de saúde pública, devido as contaminações no ambiente, aos alimentos e as intoxicações causadas ao homem. As moléculas relativamente simples do final da década de 1940 e início da década de 1950 como o DDT, ciclodienos e os inseticidas organofosforados foram gradativamente substituídas pelas quimicamente mais complexas, porém menos tóxicas como os piretróides sintéticos que surgiram no final dos anos 1970, e eram oriundos de plantas (LORINI; BECKEL, 2002; SPARKS; LORSBACH, 2016).

A continuidade no uso de inseticidas sintéticos levou ao aumento da resistência aos inseticidas. Mais de 15.000 espécies já demonstram resistência a um ou mais ingredientes disponíveis no mercado (SPARKS; LORSBACH, 2016). Muitos insetos tais como *T. castaneum*, *S. zeamais* e *S. oryzae*, todos da ordem Coleoptera e importantes pragas de grãos armazenados, já apresentam raças resistentes, o que estimula a busca por novos agentes e a adoção do MIP para estes tipos de praga (SPARKS; NAUEN, 2015; PIGNATI et al, 2017).

O controle de insetos-praga visa reduzir as populações, a níveis que não causem problemas aos demais animais e abaixo do nível de dano econômico. Todos os fatores relativos as espécies em questão devem ser consideradas, mais especificamente, aspectos ecológicos, comportamentais e climáticos (ISMAN, 2006). O conhecimento do seu hábito alimentar em especial constitui um elemento importante para definir o manejo adequado a ser realizado (LORINI, 2008).

Dentre os métodos empregados para o controle de pragas de grãos e produtos armazenados têm-se principalmente três: os físicos, químicos e biológicos. Os métodos físicos incluem: temperatura, radiação, umidade do ar, atmosfera, remoção física, luz e som. Em geral, envolvem a manipulação dos fatores físicos do ambiente para reduzir o nível populacional da praga a um

nível tolerável ou eliminá-la, podendo ser utilizados isoladamente ou combinados a fim de obter um melhor resultado (CAMPANHOLA, 1990; LORINI et al, 2015).

Os métodos químicos são ainda os métodos mais utilizados, podem ser aplicados de forma preventiva, quando os inseticidas são aplicados sobre os grãos que serão armazenados até 90 dias e que não apresentam insetos. Os produtos mais utilizados são pirimiphos-methyl, fenitrothion, deltamethrin, bifenthrin ou lambdacyhalothrin (LORINI et al, 2015; PICANÇO, 2010). A forma curativa, se baseia na fumigação principalmente de fosfina e brometo de metila, gases altamente tóxicos de ação biocida geral. Entretanto, a resistência, principalmente à fosfina é um problema global que tem alertado desde agricultores até as grandes indústrias (KARANIKI et al, 2019; LORINI, 2005; RAJENDRAN; SRIRANJINI, 2008).

Os métodos biológicos consistem em estratégias de controle biológico, uso de microrganismos e plantas. O controle biológico em si é pouco eficiente em locais de armazenagem, sendo mais comuns em ambientes de campo (LORINI et al, 2015). De acordo com HANSEN (2007), há três perspectivas para o uso do controle biológico como componente do MIP para produtos armazenados. Estas perspectivas incluem, tratamento de sala vazia; tratamento preventivo dos produtos contra os gorgulhos (*Sitophilus* sp.) e os ácaros; e na aplicação preventiva de parasitoides de ovos contra mariposas.

Outros métodos de controle também tem sido utilizados e estudados ao longo dos anos. Assim como para os demais insetos-pragas, estes incluem táticas como o uso de insetos estéreis, o uso de feromônios (ex. “serricornin”, utilizado no controle de *L. Serricorne* em galpões de fumo), reguladores de crescimento (IGRs) e métodos genéticos (MOREIRA, et al 2006; PICANÇO, 2010).

Os produtos botânicos são alternativas promissoras para proteção de grãos armazenados devido à sua natureza “biodegradável” ao ambiente. Os produtos vegetais são abundantemente disponíveis e possuem amplo espectro de ação como agentes inseticidas, anti-alimentares, repelentes, larvicidas, ovicidas e reguladores de crescimento de insetos (GURU-PIRASANNA-PANDI et al, 2018). Extratos, óleos essenciais, semioquímicos, proteínas, inibidores de

proteínas e outros têm sido bastante utilizados como fumigantes e repelentes para produtos armazenados em todo o mundo. Para as espécies do gênero *Tribolium*, estudos demonstraram que extratos botânicos e óleos essenciais funcionam como repelentes ou inseticidas naturais (LIU et al, 2011; MOHAPATRA et al, 2015; STEFANAZZI et al, 2011).

2.3 Interação inseto-planta

Plantas e insetos coexistem a milhões de anos, e desenvolveram uma série de relações que afetam esses organismos a nível, bioquímico, fisiológico, genético e ecológico (SÃO JOÃO; RAGA, 2016).

Os insetos são os organismos mais diversos que existem, e quase metade dos mais de um milhão de espécies existentes são herbívoros, o que gerou ao longo da evolução a necessidade das plantas desenvolverem mecanismos de defesa para combater o ataque desses insetos (MACEDO et al, 2015). Esses mecanismos são geralmente categorizados em dois grupos, os mecanismos pré-formados, denominados defesas constitutivas e os mecanismos de defesa induzíveis (CHEN, 2008; PINTO et al, 2011). Na tabela 2, estão representados esses mecanismos e algumas características associadas a eles .

Tabela 2 – Fatores de resistência constitutivos e fatores induzíveis por herbivoria em plantas.

Tipo de mecanismo	Modo de expressão	Modo de ação	componentes
Físico	Constitutivo	Defesa direta	Espinhas, tricoma, metabólitos
Químico/Bioquímico	Induzido	Defesa indireta	Metabólitos primários e secundários
Ecológico	Induzido	Defesa indireta (interação tritrófica)	Semioquímicos

Adaptado de: SCHALLER, 2008.

A defesa constitutiva ou direta, é representada por características das plantas tais como espinhos, tricomas, metabólitos primários e secundários, que por si já interferem na susceptibilidade das plantas e reduzindo a interação destas espécies com os herbívoros (KESSLER; BALDWIN, 2002). Essas características tornam-se fatores naturais de resistência uma vez que afetam negativamente o comportamento, a preferência alimentar, a oviposição e o desenvolvimento dos insetos (HOWE; SCHALLER, 2008).

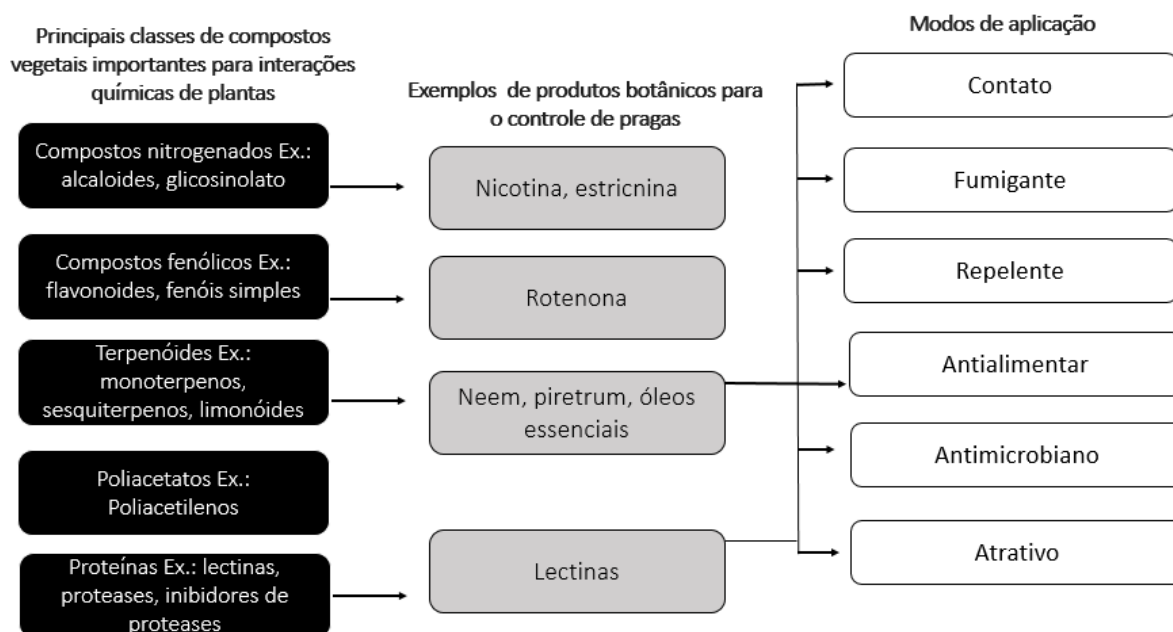
A defesa induzível ou indireta, relaciona-se com os metabólitos que são produzidos em resposta ao ataque de insetos herbívoros. Esses metabólitos foram relatados como mecanismo de resistência para os herbívoros, a partir de interações tritróficas (KESSLER; BALDWIN, 2002). O reconhecimento do ataque ocorre a partir de moléculas sinalizadoras semelhantes a eliciadores derivados de herbívoros (HAMPs), que interagem com as plantas hospedeiras específicas (ZAKIR, 2011). O mecanismo de expressão é mediado por diferentes vias de transdução de sinais e podem envolver alterações transcricionais no metabolismo primário e secundário dessas plantas (BRUINSMA; DICKE, 2008).

As interações planta-herbívoro são caracterizadas pela maior independência fisiológica de ambos. Muitos dos compostos que são gerados a partir desta interação atuam contra os insetos, desempenhando ação repelente, deterrente ou antimicrobiana. Entre os principais compostos cinco grupos químicos se destacam como produtos do metabolismo dos vegetais: os terpenóides, os compostos nitrogenados, os compostos fenólicos e os poliacetatos do metabolismo secundário (figura 2) e as proteínas de defesa do metabolismo primário (BOIÇA JÚNIOR et al, 2016; MIRESMALLI; ISMAN, 2014).

Os terpenóides, são os mais representativos e um dos mais diversos grupos de metabólitos de origem vegetal e geralmente ocorrem em misturas complexas (SCHOONHOVEN, 2005). Podem também existir constitutivamente, mas são sintetizados em maior quantidade de forma induzida. Estudos bioquímicos e moleculares sugerem que os compostos terpênicos (monoterpenóides e sesquiterpenóides), que participam dos mecanismos de defesa de plantas coníferas, podem ser detoxificados e convertidos em feromônios com auxílio das enzimas P450, mecanismo descrito para *Ips pini* e

Dendroctonus ponderosa e que caracteriza este como um importante mecanismo de resistência a este tipo de composto (BOHLMANN, 2008; ZAKIR, 2011).

Figura 2 – Principais classes de metabólitos expressos em plantas estimulados pela herbivoria.



Adaptado de: MIRESMAILLI; ISMAN, 2014

Os compostos nitrogenados são oriundos do metabolismo secundário a partir de aminoácidos. Pertencem a este grupo, alcaloides, glicosídeos e aminoácidos não proteicos. Exceto os glicosídeos, que não possuem atividade tóxica descrita contra insetos, os demais compostos nitrogenados são amplamente associados a ações tóxicas diretas ou indiretas a insetos herbívoros (HARTMANN; OBER, 2008; ZAKIR, 2011).

Com quase 10 mil moléculas descritas e classificadas, os compostos fenólicos têm atividade herbicida conhecida. Entre os diversos componentes que integram o grupo, encontram-se, cumarinas, taninos, ligninas e derivados do ácido benzoico (constituintes dos óleos essenciais). Os mecanismos de ação associados a eles incluem, deterrência alimentar, interferência no desenvolvimento, redução da eficiência de absorção dos nutrientes, redução da oviposição e alteração nos parâmetros nutricionais (SIMMONDS, 2003; ZAKIR, 2011).

As proteínas, produtos do metabolismo primário das plantas também têm a capacidade de interferir na sobrevivência e desenvolvimento dos insetos. Neste grupo de proteínas de defesa três classes se destacam: os inibidores de proteases, inibidores de amilases e lectinas. Existem ainda outras classes de proteínas que têm sido estudadas sobre os seus efeitos tóxicos, com ênfase nos mecanismos de ação sobre os herbívoros (DANG; VAN DAME, 2015; JONGSMA; BEEKWILDER, 2011; ZAKIR, 2011).

A interferência humana passou a ser um dos principais agentes de seleção de características genéticas associadas às plantas, priorizando os atributos relativos ao seu cultivo, com ênfase nos fatores de crescimento rápido e alta produtividade, subvalorizando assim as características associadas a resistência a insetos (BUSOLI et al, 2016; MOREIRA et al, 2012). A descoberta de genes e produtos de genes que expressam características de defesa em cultivares de resistência é de fundamental importância para o Manejo de Resistência de Insetos, e por consequência para o Manejo Integrado de Pragas.

2.4 Bioinseticidas no controle de pragas

Vários fatores influenciam o número de produtos inseticidas que entram no mercado. Principalmente, a necessidade de novos mecanismos de ação para atender à crescente resistência dos organismos que tendem a excluir muitos dos produtos, especialmente os químicos, com modos de ação conhecidos e que impactam a taxa de introdução de novas ferramentas (SPARKS; LORSBACH, 2016). Por muito tempo a proteção de plantas se baseou apenas no uso dos pesticidas químicos sintéticos, mas as mudanças na legislação e os diversos fatores associados a resistência têm fortalecido a busca por novas alternativas (CHANDLER et al, 2011).

As respostas metabólicas ligadas a resistência, por exemplo, incluem mecanismos de não ingestão de uma substância tóxica, o encerramento da atividade ou o desenvolvimento da capacidade aumentada para desintoxicar ou eliminar o agente tóxico após a absorção (BELL, 2014; BOYER et al, 2012). Neste sentido, os produtos naturais, biosinseticidas, principalmente os associados aos mecanismos de defesa das plantas, podem ser explorados direta

ou indiretamente como uma alternativa ao uso dos inseticidas químicos (MOREIRA et al, 2006).

Os bioinseticidas, representam apenas 1% do total de agroquímicos disponíveis no mercado, constituindo agentes de controle baseados em microrganismos ou produtos botânicos (KUMAR; SINGH, 2014). Os bioinseticidas de microrganismos incluem os vírus, fungos, bactérias, como ingredientes ativos, ou produtos destes como as toxinas *Bt*. Dentre os botânicos, estão os produtos do metabolismo dos insetos, comumente chamados agentes bioquímicos e os aleloquímicos como os hormônios, enzimas, agentes antinutricionais, entre outros, e os semioquímicos como os feromônios (CHANDLER et al, 2011; KUMAR, 2012). A principal característica destes agentes é a seletividade a organismos-alvo, com baixa ou nenhuma toxicidade a mamíferos (ZAKIR, 2011). Uma vez que ocorrem de forma natural, os bioinseticidas geram menos danos ambientais e à saúde humana.

Esses produtos naturais, em especial os inseticidas botânicos, são empregados no controle de pragas de diferentes formas, entre elas, “in natura”, na forma de pó, extratos, óleos, formulações comerciais e semicomerciais, em plantas transgênicas, compostos isolados e purificados a partir da planta (ISMAN, 2006; KHATER, 2012; MOREIRA et al, 2006). Os produtos botânicos, como os extratos e óleos são misturas de metabólitos secundários que podem ou não ter papel relevante na toxicidade da mistura. A toxicidade dessas misturas pode ser alterada pela ação sinérgica ou antagônica a depender de como interagem os seus componentes (MIRESMALLI; ISMAN, 2014).

Os primeiros inseticidas botânicos introduzidos no mercado na década de 70 e que ainda são utilizados, são os piretróides e os nicotenóides. Os piretróides são compostos obtidos do piretro ou são análogos sintéticos, como aletrina, resmetrina, etc (MOREIRA et al, 2012), e os nicotenóides são extraídos da nicotina, apresentam seletividade aumentada contra insetos, baixa toxicidade para outras espécies e alta eficácia (ISMAN; GRIENEISEN, 2013). Atualmente os produtos a base de Nim (*Azadirachta indica*) e azadiractina, óleo, extrato, e metabólitos isolados como a azadiractina, elevaram a eficácia e reacenderam o interesse e oportunidade de mercado dos produtos botânicos (ISMAN, 2015; SARWAR, 2015).

Extratos de plantas apresentam compostos que mostram efeitos ovicida, repelente, antialimentar, antinutricional e efeitos tóxicos em insetos, seja por contato, ingestão ou por ação fumigante (RAJENDRAN; SRIRANJINI, 2008). Produtores da China e Índia, têm utilizado extratos vegetais para combater suas principais pragas agrícolas (LIU et al, 2006).

Embora, um número limitado de inseticidas botânicos estejam disponíveis comercialmente, estudos afirmam que os biopesticidas, incluindo os inseticidas botânicos estão ganhando cada vez mais a preferência de produtores e consumidores de alimentos e que a perspectiva é de grande crescimento na venda desses produtos. Considerando as características como seletividade, pouco resíduo tóxico e baixo custo de desenvolvimento tornam os inseticidas botânicos uma alternativa promissora para ser usado como componentes do MIP (ISMAN, 2015; KUMAR, 2012; (KUMAR; SINGH, 2014; SARWAR, 2015).

2.5 Proteínas aplicadas a proteção de plantas

Além dos extratos brutos, óleos voláteis, e aleloquímicos as plantas expressam vários tipos de proteínas vegetais que exercem efeitos tóxicos ou inibitórios sobre os insetos de importância econômica (CHAPMAN; HALL, 1996). Entre as diversas classes de proteínas, os inibidores de proteases, as quitinases, as ureases, as proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) e as proteínas de ligação a carboidratos conhecidas como lectinas têm sido descritas na literatura como potenciais bioinseticidas (DANG; VAN DAMME, 2015).

A maior parte dessas proteínas que apresentam potencial inseticida tendem a se acumular nas partes vulneráveis da planta, como sementes e tecidos de armazenamento. Isto pode ser comprovado pelo surgimento das primeiras proteínas inseticidas que foram todas originadas de sementes (CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002). Os inibidores de protease e as lectinas, são as duas classes melhor estudadas.

Os inibidores de proteases de plantas contra serina, cisteína e proteases aspárticas são a principal classe de proteínas descritas por causar alta mortalidade em insetos susceptíveis. No entanto, muitos insetos estão se adaptando à ingestão desses inibidores pela recorrente alimentação, aumentando a produção de enzimas susceptíveis saturando assim o efeito

inibitório e gerando proteases resistentes aos inibidores (CHAPMAN, 2013; NAPOLEÃO et al., 2018).

Para que uma proteína afete um inseto, ela precisa interagir com moléculas-alvo. Para os insetos fitófagos, é provável que este alvo seja um componente da dieta alimentar ou um componente do sistema de metabolização dos alimentos. A proteína pode interagir diretamente com um nutriente e deter a alimentação por interagir com os receptores gustativos, interferir na digestão através da interação com enzimas digestivas, ou interromper os tecidos intestinais pela interação com os alvos das superfícies celulares do intestino médio. A molécula alvo pode ainda estar em regiões mais internas do inseto, o que requer que a proteína atravesse a parede do intestino sem ser inativada, e neste sentido pouquíssimas proteínas possuem essa capacidade (CHAPMAN; HALL, 1996; FELTON; GATEHOUSE, 1996; KLOWDEN, 2013).

Embora sugira uma alta especificidade, a interferência direta com os processos digestivos no intestino do inseto ainda configura a principal estratégia para o uso de proteínas na defesa contra insetos (CHAPMAN; HALL, 1996). Uma vez que o intestino dos insetos é rico em estruturas glicosiladas, e considerando a capacidade das lectinas em interagir reversivelmente com os carboidratos, isto faz das lectinas uma das proteínas mais promissoras para aplicação na proteção de plantas (SILVA et al, 2012; PAIVA et al, 2012).

As técnicas de engenharia genética têm sido aplicadas em plantas para introduzir genes que codificam proteínas tóxicas derivadas de outra planta, conferindo maior resistência aos fatores bióticos e também os abióticos (DANG, VAN DAMME, 2015). Nesta perspectiva Liu e colaboradores (2015), introduziram uma proteína modificada, contendo um domínio de lectina obtido da aglutinina *Galanthus nivalus* (GNA) ligada a um domínio de uma neurotoxina de escorpião *Androctonus australis* (AaIT). Os autores relatam que houve o aumento da resistência tanto no tabaco, quanto no arroz transgênico, devido a superexpressão da proteína fusionada. Com isso sugere-se que as proteínas, em especial as lectinas, podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias integradas para o manejo de pragas, configurando uma nova alternativa ao uso dos inseticidas químicos (AHMAD et al, 2012).

2.6 Lectinas

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas globulares, de origem não imunológica, que apresentam ao menos um sítio não catalítico de reconhecimento e ligação reversível a carboidratos, principalmente mono ou oligossacarídeos (SANTOS et al, 2014). Foram descobertas em plantas, mas hoje já se sabe que são amplamente distribuídas entre todas as espécies, como vírus, fungos, bactérias, algas, plantas e animais (CAMACHO, 2007; LIS; SHARON, 1986). Nas plantas, as lectinas encontram-se em todas as partes, concentrando-se principalmente nas sementes e em cascas (MACEDO et al, 2015).

Configuram um grupo heterogêneo de proteínas que se classificam de acordo com sua estrutura, especificidade aos carboidratos e espécies onde são encontradas (VAN DAMME, 2014). Com base nas suas características e distribuição nos tecidos apresentam importantes funções biológicas, que ainda não estão completamente elucidadas (PROCÓPIO et al, 2017).

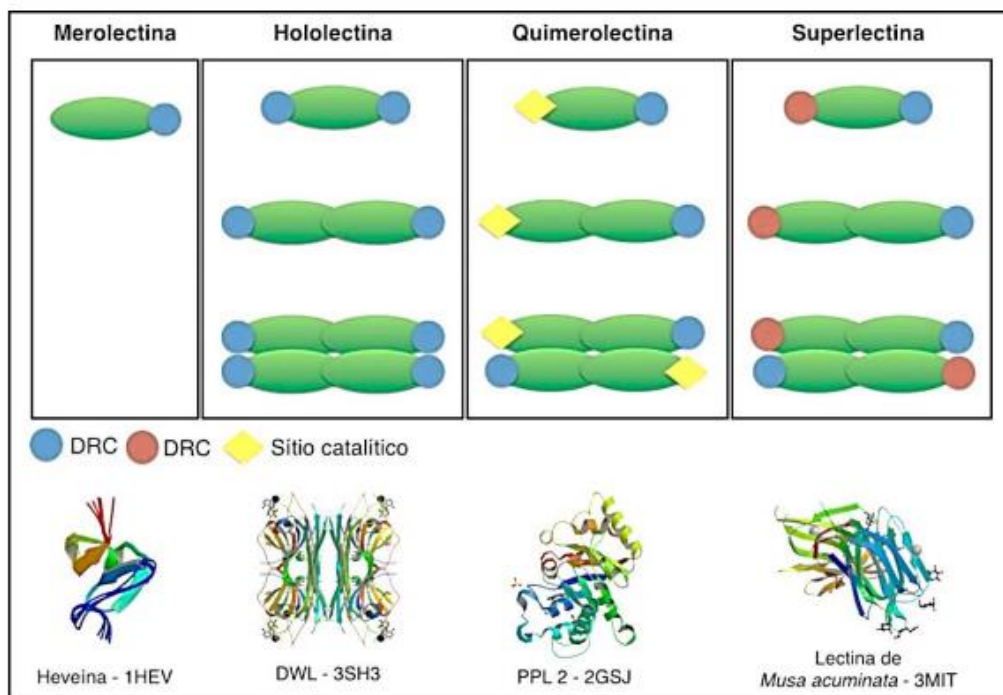
Sua capacidade de interagir especificamente com glicoconjugados em solução ou na superfície celular lhes permite aglutinar células e faz dessas moléculas extremamente versáteis e importantes ferramentas para diferentes aplicações nas áreas da biologia molecular e celular, imunologia, farmacologia, medicina, análises clínicas, biotecnologia, nanotecnologia, ciências agrárias, entre outras (CARLINI; GROSSI-DE-SA, 2002; VAN DRIESSCHE et al, 1996).

Desde a descoberta da primeira lectina de planta, a ricina, extraída de *Ricinus communis* há mais de 100 anos (1888) (DANG; VAN DAMME, 2015), um número crescente de lectinas de plantas tem sido relatado e várias propriedades biológicas estão sendo atribuídas a essas lectinas, entre elas antiinflamatória, imunomodulatória, antitumoral, antimicrobiana, inseticida, entre outras (MACEDO et al, 2015; PAIVA et al, 2012; PROCÓPIO et al, 2017).

Com base na sua estrutura geral, e na constituição do seus domínios de reconhecimento a carboidratos (DRC), as lectinas foram classificadas (figura 3) de acordo com Peumans e Van Damme (1995) em: merolectinas, as lectinas que possuem apenas um DRC, o qual se liga a açúcares simples, e não tem capacidade aglutinante e catalítica; hololectinas (maioria das lectinas), que possuem dois DRCs com considerável homologia e capacidade de aglutinar células ou precipitar gliconjugados; as quimerolectinas,

que possuem ao menos um DRC, e outro domínio com atividade biológica distinta, como domínio catalítico (atividade enzimática); e as superlectinas proteínas que têm pelo menos dois DRCs, entretanto, diferentemente das hololectinas essas proteínas são hábeis a reconhecer diferentes carboidratos (REYES-MONTAÑO; VEGA-CASTRO, 2018; VAN DAMME et al, 1998).

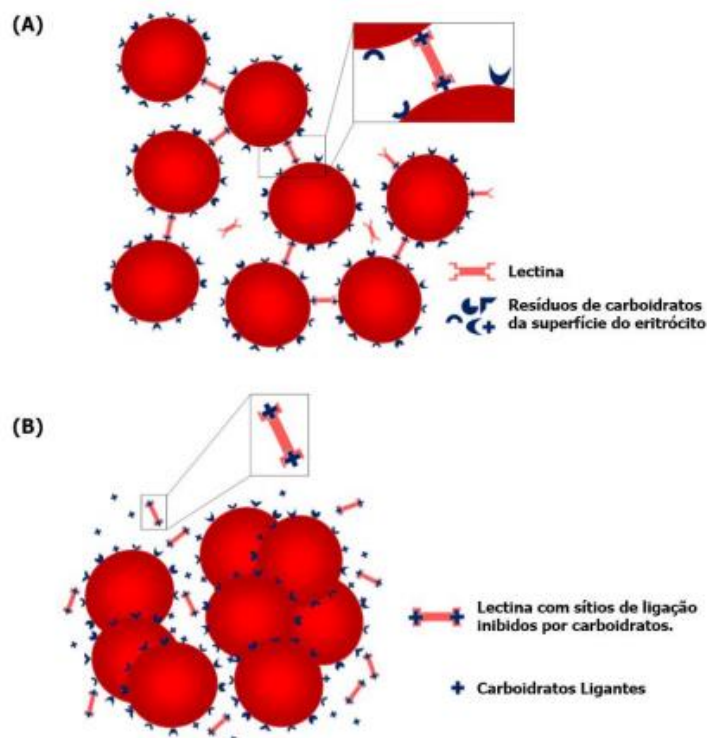
Figura 3 - Classificação estrutural das lectinas de plantas, com ênfase para os DRC.



Fonte: OSTERNE, 2016, adaptada de VAN DAMME et al., 1998.

O ensaio de hemaglutinação é a forma mais simples e rápida de detectar lectinas em uma amostra, isto por que as lectinas aglutinam eritrócitos por reconhecer os carboidratos da superfície celular, formando uma rede reticulada (figura 4A) (SANTOS, 2014). Uma vez que outras moléculas como os compostos fenólicos também apresentam a capacidade de aglutinar células, através de interações não específicas, a especificidade da lectina para um determinado carboidrato assim como a confirmação de sua presença numa amostra biológica é definida pelo ensaio de inibição da atividade hemaglutinante na presença de carboidratos ou glicoproteínas em concentração determinada na solução do ensaio (figura 4B) (CORREIA; COELHO, 2008).

Figura 4 – Representação dos ensaios de hemaglutinação. (A) detecção de lectinas. (B) inibição da atividade hemaglutinante por carboidratos.



Fonte: OLIVEIRA, 2018. (Adaptado de Santos et al., 2014).

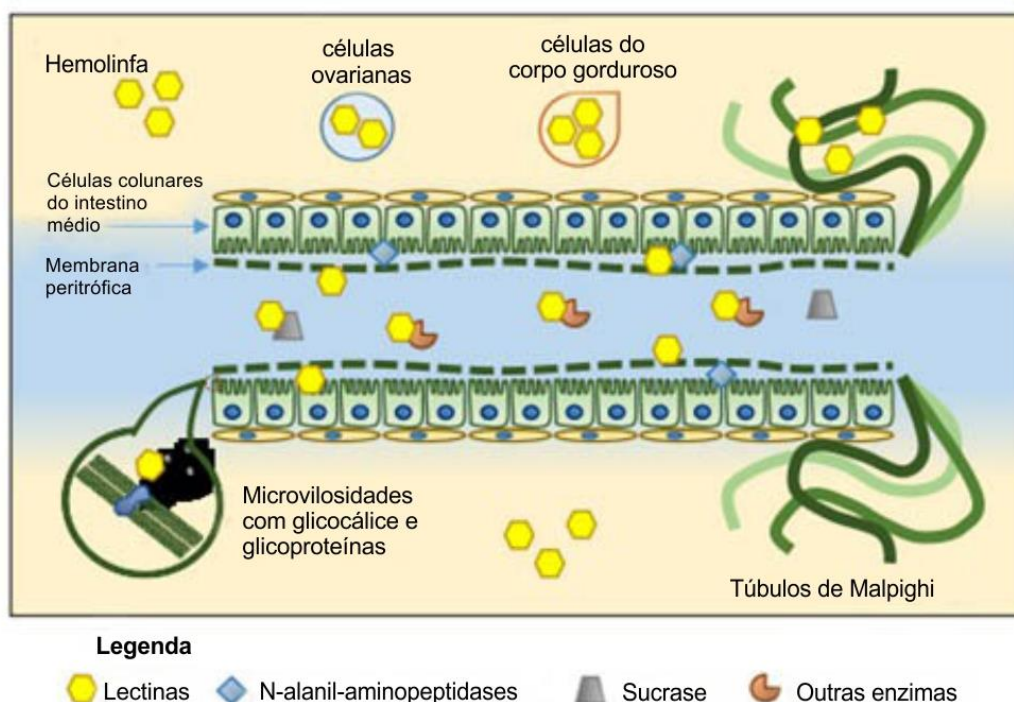
2.6.1 Lectinas vegetais com potencial inseticida e seus mecanismos de ação.

As lectinas vegetais são conhecidas por seus efeitos tóxicos e antinutricionais aos insetos. Seu potencial inseticida entre as diversas atividades associadas as lectinas, tem sido apontado como um dos mais promissores (MACEDO et al, 2015).

Uma das principais técnicas utilizadas para avaliar o potencial inseticida das lectinas consiste na incorporação dessas moléculas em dietas artificiais, método descrito por Xie e colaboradores em 1996, e adaptado e reproduzido por pesquisadores desde então (CARLINI; GROSSI-DE-SA, 2002). A partir desta técnica diversos autores já constataram as propriedades tóxicas de lectinas às pragas pertencentes às diversas ordens, tais como, Coleoptera, Diptera, Hemiptera e Lepidoptera (LIMA, et al, 2017; NAPOLEÃO et al, 2011; VANDENBORRE et al, 2011).

Os mecanismos de ação associados aos efeitos entomotóxicos das lectinas ainda não estão completamente elucidados (NAPOLEÃO et al, 2013). Os mecanismos mais prováveis envolvem interações com diferentes moléculas glicosiladas em insetos, que podem interferir com uma série de processos fisiológicos como as vias de sinalização e os processos de transporte (figura 5).

Figura 5 – Representação das principais estruturas e moléculas relacionadas como sítios de ligação das lectinas de plantas nos insetos.



Fonte: Adaptada de: MACEDO et al, 2015.

Sabe-se ainda, que as lectinas inseticidas são geralmente resistentes à degradação proteolítica pelas enzimas do trato digestivo dos insetos o que favorece a sua interação com os seus alvo moleculares (COELHO et al., 2007).

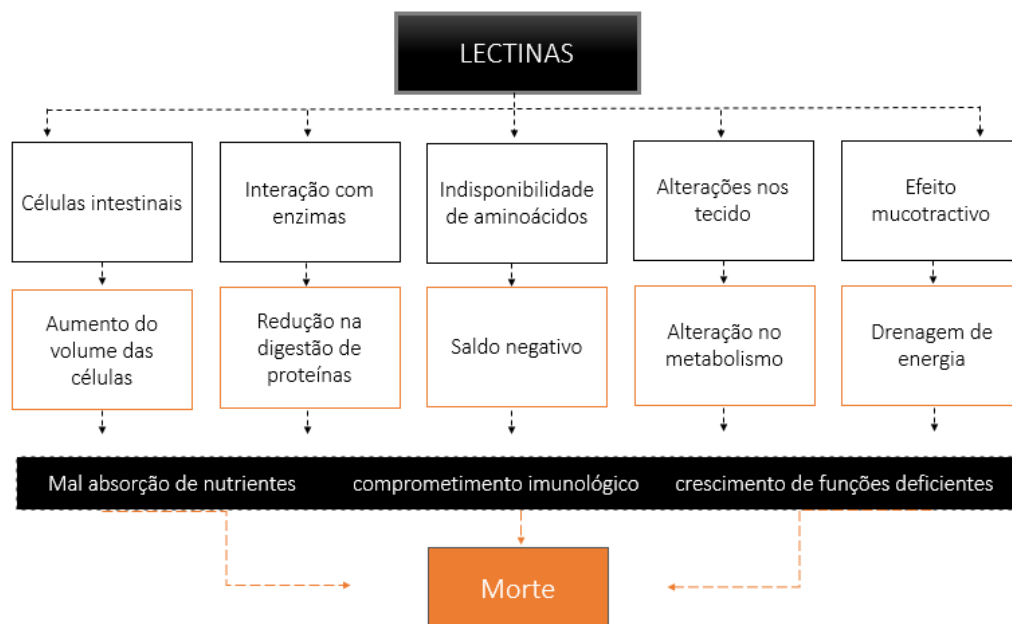
Os insetos-praga de grãos armazenados, por exemplo, que vivem em dieta rica em polissacarídeos dependem de forma significativa da eficácia de suas α -amilases para sobreviver (MACEDO et al, 2007). O aumento ou a redução da atividade destas enzimas nos insetos gera desequilíbrio da digestão, tornando assim estas enzimas alvos-moleculares para a ação das lectinas nestes insetos (BANDYOPADHYAY et al, 2001; LIMA et al, 2017).

Nesta perspectiva muitos pesquisadores têm avaliado o potencial inseticida das lectinas, e buscado elucidar os mecanismos de ação associados a elas. Macedo e colaboradores (2007) demonstrou a atividade da lectina das folhas de *Bauhinia monandra* (BmoLL) contra *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* e *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae), enfatizando a não degradação de BmoLL quando incubada com enzimas proteolíticas destas espécies. OLIVEIRA et al (2011), mostrou o efeito da lectina de sementes *Moringa oleifera* Lamarck (cMoL) contra larvas de *Anagasta kuehniella* mostrando seus efeitos antinutricionais por redução da eficiência de conversão alimentar e do ganho de biomassa, o que afetou o crescimento e a sobrevivência dos insetos. Roy e Das (2015) também demonstraram os efeitos da lectina de *Colocasia esculenta* Tuber (CEA) contra o percevejo do algodão *Dysdercus cingulatus*, da ordem hemiptera, evidenciando a interação de CEA com o epitélio de revestimento do intestino do inseto, fato que corrobora com os efeitos entomotóxicos que têm sido associados às lectinas vegetais.

O uso das lectinas como estratégia para o controle de pragas é uma possibilidade real tanto em relação a redução dos impactos ambientais e à saúde quanto ao desenvolvimento de resistência. Comparadas aos inibidores de proteases, a outra classe de proteínas inseticidas bastante estudadas, as lectinas são menos propensas a ter seus mecanismos superados, pois sua ação envolve vários alvos moleculares (NAPOLEÃO et al, 2018).

Os efeitos antinutricionais observados como resultados da ingestão de lectinas afetam diferentes parâmetros biológicos dos insetos (figura 6), tais como alterações funcionais e morfológicas das células e tecidos, alterações metabólicas que geram redução do peso larval, do desenvolvimento, da fecundidade, da pupação e, por consequência, da sobrevivência (MACEDO et al, 2015; OLIVEIRA et al, 2011; REYES-MONTAÑO; VEGA-CASTRO, 2018).

Figura 6 – Esquema ilustrativo dos possíveis alvos moleculares e os mecanismos de ação associados às lectinas vegetais e seus efeitos antinutricionais.



Fonte: Adaptado de: REYES-MONTAÑO; VEGA-CASTRO, 2018.

2.7 Nutrição e digestão nos insetos

A ecologia nutricional dos insetos envolve a integração de mecanismos informacionais bioquímicos, fisiológicos e comportamentais dentro do contexto da ecologia e da evolução (PANIZZI; PARRA, 2009). O desenvolvimento de meios de controle baseados na bioecologia e nutrição depende de um melhor conhecimento do sistema digestório dos insetos. Isto porque, as funções digestivas em insetos representam um modelo riquíssimo de informações que possibilitam a exploração de novos alvos moleculares, uma vez que este é um dos principais mecanismos de comunicação dos insetos com o seu meio ambiente (SILVA et al, 2012).

Estudos relatam a importante relação entre os semioquímicos emitidos por plantas hospedeiras e a produção e função dos feromônios nos insetos fitófagos, que atuam na fisiologia e comportamento dos insetos modificando as estratégias de processos vitais tais como a alimentação, o acasalamento e a reprodução (CERUTI, 2007; KLOWDEN, 2013).

A nutrição dos insetos pode ser observada sob dois aspectos, qualitativo e quantitativo. A nutrição qualitativa se baseia nos nutrientes exigidos numa

perspectiva química. Neste sentido, independente do hábito alimentar os insetos têm necessidades nutricionais semelhantes, contendo aminoácidos, vitaminas e sais minerais como nutrientes essenciais e carboidratos, lipídeos e esteróis como nutrientes não essenciais. A perspectiva quantitativa considera a proporção de alimento ingerido, digerido, assimilado e convertido em tecidos de crescimento, sendo totalmente influenciada pelos componentes nutritivos e não-nutritivos presentes no alimento ingerido (FELTON; GATEHOUSE, 1996; KLOWDEN, 2007; PARRA et al, 2009).

Os aminoácidos são necessários para a produção de proteínas que serão utilizadas para fins estruturais. Alguns aminoácidos estão também envolvidos na morfogênese e outros são usados como combustível respiratório, como a prolina que pode ser uma fonte de energia importante para o vôo em vários insetos (CHAPMAN, 2013; CHAPMAN; HALL, 1986; MARDANI-TALAEI et al., 2017).

Carboidratos, incluindo açúcares simples, amido e outros polissacarídeos, são componentes importantes da dieta para a maioria dos insetos. Eles são usados como combustível respiratório, podem ser convertidos em lipídios e fornecer o esqueleto de carbono para a síntese de vários aminoácidos. Além disso, a quitina é um dos carboidratos mais importantes presentes em diversas estruturas de insetos. Todos os insetos podem sintetizar glicose pela gliconeogênese, utilizando o glicerol oriundo de lipídeos e alguns cetoácidos oriundos de aminoácidos glicogênicos, de forma que insetos podem crescer facilmente em dietas artificiais sem carboidrato (CHAPMAN, 2013; CHAPMAN; HALL, 1986; CHOWN; NICOLSON, 2004). A utilização de diferentes carboidratos depende da capacidade do inseto de hidrolizar os polissacarídeos, o *T.castaneum* por exemplo, tem uma ampla capacidade digestiva o que lhe permite usar uma variedade de carboidratos como, amido, álcool manitol, o trissacarídeo rafinose, os dissacarídeos sacarose, maltose e celobiose, entre outros.

De maneira geral os insetos são capazes de sintetizar muitos ácidos graxos e fosfolipídios, assim, os lipídeos não são nutrientes dietéticos essenciais. No entanto, os insetos exigem uma fonte alimentar de ácidos graxos polinsaturados (PUFAs) e esteróis. Na ausência destas moléculas os insetos desenvolvem-se fracamente, morrem em ecdise ou exibem fecundidade

reduzida. Os esteróis além de serem componentes importantes das membranas (colesterol nos animais) participam da síntese de hormônios, o principal esteroide para muitas espécies é o colesterol. Plantas e alimentos fúngicos contêm outros esteróis (CHAPMAN; HALL, 1986). Como consequência disso, muitos insetos fitófagos metabolizam os esteróis ingeridos em colesterol por meio de reações de desalquilação ainda mal compreendidas. No organismo, os lipídeos são transportados entre os diferentes órgãos associados à principal lipoproteína hemolinfática, a lipoforina (Lp) que nos insetos é o único transportador de lipídeos (CHAPMAN, 2013; ARRESE et al, 2001; ATELLA et al, 2012) .

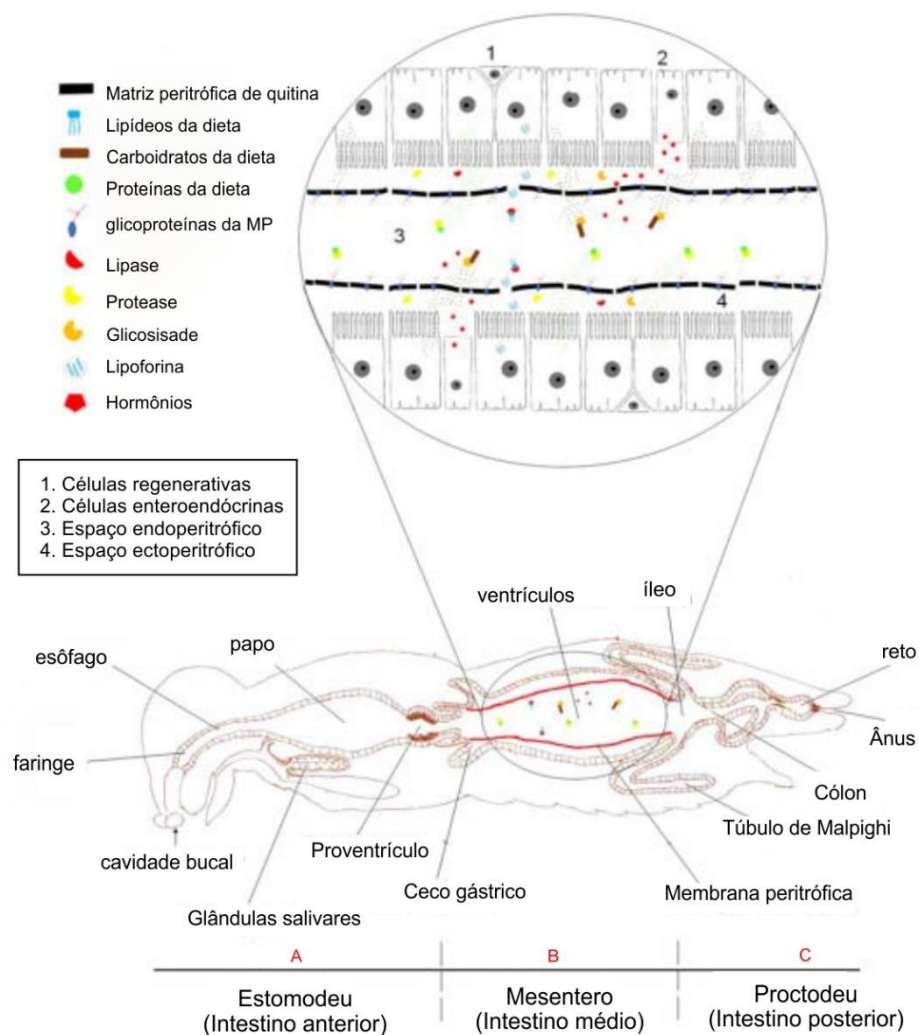
Os alimentos ingeridos tornam-se as fontes de energia a serem transformadas e incluem carboidratos complexos, gorduras e proteínas que são decompostas em componentes mais simples e absorvidos através da parede do intestino médio, principal sítio de digestão e absorção na maior parte das espécies de insetos, sendo direcionados para a hemolinfa. O sistema circulatório então transporta esses componentes para todas as células e demais órgãos do corpo (KLOWDEN, 2013; SILVA et al, 2012). A maioria dos processos de decomposição, utilização e armazenamento de alimentos são semelhantes em insetos e vertebrados, no entanto, existem alguns processos metabólicos que são específicos para insetos e que é dependente do seu hábito alimentar (CHAPMAN, 2013).

O trato digestivo consiste de um tubo de células epiteliais que vão da boca até o ânus, e é subdividido em três regiões embriológica e funcionalmente distintas: o intestino anterior, o médio e o posterior. No intestino anterior, ocorrem a digestão mecânica e a digestão química por enzimas salivares secretadas na cavidade bucal e/ou enzimas digestivas regurgitadas do intestino médio. O intestino posterior, é o responsável pela absorção de substâncias importantes, como aminoácidos e água, antes da eliminação (GULLAN et al, 2010; SOUSA et al., 2013).

O intestino médio é o principal sítio de digestão e absorção em insetos na maior parte das espécies (TERRA et al, 2009). Ele é constituído por quatro tipos celulares dispostos em uma única camada epitelial que inclui células colunares, células regenerativas, células calciformes e células endócrinas. Essas células são rodeadas de músculos que geram os movimentos peristálticos que movem o alimento através do trato digestivo. As células colunares são as

mais importantes para digestão pois contêm bordas voltadas para o lúmen intestinal com microvilosidades que aumentam a superfície para absorção de alimentos e secreção de água e enzimas digestivas. As células colunares é por onde é absorvido a maior parte do alimento presente no lúmen. (KLOWDEN, 2007; KLOWDEN, 2013). A figura 7 trás uma visão geral das estruturas e dos mecanismos envolvidos na digestão dos insetos.

Figura 7 – Estrutura do intestino dos insetos, onde estão representados, A: intestino anterior; B: intestino médio e C: intestino posterior. Onde destaca-se 1. Células regenerativas; 2. Células enteroendócrinas que separa o lúmen intestinal em dois espaços 3: endoperitrófico e 4: ectoperitrófico, os destinos dos nutrientes ingeridos, proteínas, lipídeos e carboidratos.



Fonte: Adaptada de NAPOLEÃO et al, 2018.

Na maioria dos insetos, o intestino médio contém uma membrana chamada de matriz ou membrana peritrófica (MP) em substituição as células colunares presentes no intestino anterior. Essa membrana envolve o alimento ingerido, e separa o conteúdo luminal em dois compartimentos, o espaço endoperitrófico (dentro da membrana) e o espaço ectoperitrófico (fora da membrana) (FELTON; GATEHOUSE, 1996; HEGEDUS et al, 2009). A MP é composta por proteínas, proteoglicanos e quitina, e reveste o intestino médio impedindo o contato direto com partículas de alimentos e tem função semelhante a mucosa intestinal dos vertebrados, participando de absorção do alimento e proteção do inseto contra o ataque de microrganismos (CHAPMAN; HALL, 1986; NAPOLEÃO et al, 2018).

A variação nutricional e no processo de digestão entre os insetos surge de adaptações a dietas específicas ou da associação com microorganismos que fornecem nutrientes específicos (CHAPMAN, 2013). De maneira geral, os alimentos que são ingeridos são misturados com secreções salivares e sofrem digestão preliminar na região anterior, posteriormente se movem para trás no intestino médio para digestão e absorção. A digestão de proteínas e a digestão final dos carboidratos ocorre no intestino médio, devido ao seu pH que varia de ácido a neutro. A região anterior do intestino é adaptada para fermentação e é em geral alcalina, com condições favoráveis à sobrevivência de populações de microorganismos. Na região posterior a água é retirada das fezes e permite que um *pellet* fecal seco seja então depositado (PARRA et al, 2009; SILVA et al., 2012).

2.7.1 Agentes antinutricionais no controle de insetos-praga

Apesar das plantas representarem o maior percentual de biomassa, apenas nove ordens de insetos têm nas plantas seu alimento principal (PANIZZI; PARRA, 2009). Insetos herbívoros, comumente, ingerem níveis sub-ótimos de nutrientes e são forçados a processar grandes volumes de alimento para obter quantidades suficientes de nutrientes. Isto se deve às características físicas como espinhos, dureza dos tecidos, mas principalmente às características químicas, como a presença de compostos antinutricionais (EDWARDS; WRATTEN, 1981).

Os inibidores alimentares estão ganhando importância como potenciais agentes para as estratégias do MIP para os insetos. Existem inúmeros relatos sobre os deterrentes alimentares e tóxicos para insetos-praga de produtos armazenados (LIU et al, 2011), bem como repelência decorrente principalmente do efeito de compostos terpenóides e alcalóides, e que afetam indiretamente a capacidade de alimentação dos insetos (OMAR et al, 2007).

Alguns dos grupos químicos de caráter antinutricional usados para atividades inseticidas incluem taninos, flavonóides, alcalóides, terpenóides, proteínas e inibidores de proteínas. Como resultado disso, vários insetos altamente fitófagos que são conhecidos por tolerar muitos compostos diferentes, não se alimentam das plantas que acumulam esses compostos o que resulta na proteção de tais plantas contra uma ampla variedade de pragas (CARLINI; GROSSI-DE-SÁ; 2002; PAIVA et al, 2012; SHARMA; NORRIS, 1991; SOETAN, 2008).

Os antinutrientes caracterizam-se por diminuir a biodisponibilidade de nutrientes modificando-os quimicamente, formando complexos menos ativos, ou dificultando a absorção, digestão, ou conversão do nutriente. A tabela 3 reúne alguns dos nutrientes da dieta alimentar da maioria dos insetos e os componentes que atuam como impedimentos da sua ingestão, absorção ou digestão (CHAPMAN; HALL, 1986).

Tabela 3 – Principais nutrientes e agentes antinutrientes derivados dos mecanismos de defesa das plantas em resposta aos insetos fitófagos.

Classe de nutrientes	Potencial antinutriente
Aminoácidos	Agentes alquilantes (quinonas, epóxidos, aldeídos, lactonas sesquiterpênicas, etc.); inibidores de protease; tiaminase; transglutaminase; diamina oxidase, mirosinase; peroxidase, polifenol oxidase
Carboidratos	Inibidores de amilase, glicosidase
Lipídeos	Lipoxigenase, peroxidase
Minerais	Oxalatos, fitato, fenólicos, Polifenóis
Esteróis	Saponinas
Vitaminas	Ascorbato oxidase, tiaminase, lipoxigenase, fenólicos, quinonas
Água	Diuréticos

Fonte: Adaptada de (CHAPMAN; HALL, 1986).

As proteínas de defesa, por exemplo, afetam os insetos interagindo com uma molécula alvo que provavelmente é um componente dietético ou um componente do sistema de alimentação dos insetos. A proteína pode interagir diretamente com um nutriente, deter a alimentação interagindo com os receptores do paladar, interferir na digestão por interação com as enzimas digestivas, ou interromper os tecidos intestinais pela interação com as superfícies de células do intestino médio, como a MP.

A presença de microorganismos no intestino dos insetos herbívoros podem exercer um papel nutricional importante ao fornecer enzimas e vitaminas, que melhoram a eficiência da digestão e permitem uma melhor adaptação dos insetos hospedeiros em dietas abaixo do ideal, como pode acontecer com os insetos que se alimentam exclusivamente de plantas (KLOWDEM, 2007).

Os microorganismos presentes no intestino dos insetos além de atuar auxiliando a absorção de nutrientes durante o processo alimentar, podem também desintoxicar componentes vegetais tóxicos que são ingeridos, como alcalóides, taninos e proteínas antinutricionais (CEJA-NAVARRO et al, 2015; KLOWDEM, 2007).

2.8 *Genipa americana* L.

O jenipapo, *Genipa americana* L. (1759), é uma árvore nativa da Amazônia, pertencente à família Rubiaceae. Distribui-se em regiões de clima tropical úmido, em solos profundos e bem drenados, em várias formações florestais de várzeas encharcadas encontradas em várias regiões brasileiras. Seu nome científico e o nome popular vêm do Tupiguarani, jandipap, que significa fruto que serve para pintar (LORENZI, 1998).

É uma árvore alta que pode atingir até 15 m e seu diâmetro chega a 90 cm (figura 8), tem caule reto, possui copa grande e arredondada com ramos numerosos, as folhas são verde escuro, as flores são grandes, vistosas, hermafroditas amarelo-ouro contendo 5 pétalas, brancas-amareladas, de aroma leve, reunidas em inflorescência e o fruto é do tipo baga ovóide, de cor escura com casca rugosa e murcha, possui polpa marrom clara, doce e ácida, succulenta, de aroma forte que envolve numerosas sementes no centro, as quais são pardas, chatas e polidas (ANDRADE et al, 2007; MOURA et al, 2016).

Figura 8 – *Genipa americana* L. (A): planta adulta; (B) flor e fruto.



(A)

(B) Fonte: Melo, 2019.

A casca e os frutos contêm uma substância de coloração violeta ou azul, denominada de genipina. Devido à presença dessa substância e sua aplicação na indústria de alimentos é considerada uma espécie de importância econômica e científica (DA SILVA et al, 1998). O fruto maduro é usado em diversas preparações como sucos, geleias, xaropes, sendo utilizados como diuréticos, digestivo, laxante e contra anemia (DICKSON et al, 2018). Tem sido relatada como uma promissora fonte de novas substâncias bioativas para o desenvolvimento de produtos (MARTINS; NUNEZ, 2015).

O jenipapo apresenta vários compostos bioativos, entretanto os iridóides são o grupo de compostos mais encontrados no jenipapo. Há na literatura relatos da identificação de genipina, geniposídeo, ácido genpínico, entre outros iridóides extraídos do fruto (ONO et al, 2007) aos quais tem sido atribuído os efeitos antibacteriano, antitumoral, anti-inflamatório e antioxidante. São encontrados também em menor quantidade compostos fenólicos metabólitos de grande interesse devido as variadas aplicações biológicas (NÁTHIA-NEVES et al, 2017).

Na medicina popular o extrato das folhas é comumente utilizado para tratar sífilis e doenças do fígado. Na literatura existem apenas dois relatos sobre a atividade dos extratos etanólico e hexânico aos quais foram atribuídos os efeitos antidiabetes e antihelminto (ALVES et al, 2017).

Costa et al (2018) isolou e purificou uma lectina da casca de *G. americana* (GaBL) com elevada resistência à temperatura e máxima atividade

em pH 5,0, além de permanecer ativa na presença de agente quelante. A elevada resistência de GaBL, e a máxima atividade dela no mesmo pH encontrado no intestino médio de insetos e os diversos relatos na literatura de atividade inseticida de lectinas e metabólitos secundários de plantas estimularam a investigação da ação inseticida do extrato, da fração pré-purificada e de GaBL contra *T. castaneum*.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar o potencial inseticida do extrato, da fração e da lectina de *Genipa americana* contra *Tribolium castaneum*, bem como conhecer os principais mecanismos de ação associados.

3.2 Específicos

- Obter o extrato aquoso da casca de *G. americana* preparado em Tris-HCl;
- Determinar a composição química do extrato aquoso da casca de *G. americana*;
- Extrair e preparar a fração lectínica a partir do extrato da casca de *G. americana*;
- Isolar GaBL a partir de protocolo pré-estabelecido utilizando cromatografia de gel filtração;
- Avaliar através de bioensaio o efeito do extrato aquoso de *G. americana* sobre a sobrevivência de adultos de *T. castaneum*;
- Avaliar a toxicidade por ingestão do extrato aquoso, fração lectínica e GaBL isolada sobre os adultos de *T. castaneum*;
- Avaliar os efeitos sobre parâmetros nutricionais da ingestão do extrato aquoso, fração lectínica e GaBL isolada sobre os adultos de *T. castaneum*;
- Determinar os efeitos de *G. americana* sobre o perfil bioquímico (proteínas, TAG, colesterol e glicose) de *T. castaneum*

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Insetos e Material vegetal

Em todos os experimentos foram utilizados adultos de *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) oriundos da criação mantida pelo Laboratório de Bioquímica Metabólica (LBM) - UFAL Campus A.C Simões, sob orientação do Professor Dr. Luciano Grillo, em condições controladas de temperatura $\pm 30^\circ$, com umidade relativa entre 70 e 80% e fotoperíodo claro/escuro de 12h em BOD.

Para realização deste trabalho, as cascas de *Genipa americana* L. (Família: Rubiaceae) foram coletadas de diferentes espécimes encontrados em Coruripe, Alagoas, armazenadas em sacos plásticos transparentes e conduzidas até o laboratório de Proteômica e Metabologia (LAMP) onde foram higienizadas, processadas e armazenadas. O pó resultante foi acondicionado no freezer a -20°C . Exsiccatas botânicas contendo exemplares de *G. americana* foram identificadas e depositadas junto ao Herbário MAC do Instituto de Meio Ambiente de Alagoas – IMA (número de referência 64576).

4.2. Obtenção das amostras utilizadas nos bioensaios

A fim de obter o extrato aquoso, a fração enriquecida de lectinas e a lectina isolada (GaBL) das cascas de *G. americana* seguiu-se o protocolo descrito por Costa e colaboradores, 2018. Onde, exemplares saudáveis foram coletados, secos a temperatura ambiente, triturados e acondicionados sob refrigeração no freezer a -20°C . As coletas do material vegetal foram realizadas sob autorizações (número de processo 61847-2) do Instituto Chico Mendes (ICMBIO).

O extrato bruto (25% m/v) foi preparado em tampão Tris-HCl 50mM pH 8,0 submetido a agitação constante por 12h a 4°C a fim de preservar a estabilidade da proteína de interesse. Posteriormente a solução foi filtrada com gaze, centrifugada durante cinco minutos a 15.000 g, sob temperatura de 4°C , mantida sob refrigeração. O sobrenadante foi armazenado em tubo falcon e denominado como extrato bruto.

Para a obtenção da fração enriquecida de lectinas, o extrato bruto foi submetido ao fracionamento salino com sulfato de amônio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$. A fração de interesse, que foi a fração que apresentou a maior atividade

hemaglutinante específica (20% - HAE 1280), conforme descrito por Costa e colaboradores (2018), foi então utilizada para a obtenção da lectina isolada de *G. americana* (GaBL).

GaBL, foi isolada a partir de 0,3mL da fração 20% por meio de cromatografia de gel filtração em matriz Sephacryl S-100HR (16 mm x 60 cm) acoplada ao sistema AKTA Püre M1 (GE 115 Healthcare Life Sciences, Suécia) e equilibrada com Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0. A cromatografia foi realizada no mesmo tampão a uma taxa de fluxo de 0,1 mL / min. Foram coletadas frações de 2,0 mL. As frações eluídas foram avaliadas quanto à concentração de proteínas e atividade hemaglutinante. Os picos ativos foram reunidos e denominados *G. americana* bark lectin (GaBL). Todas as amostras foram mantidas sob refrigeração até o momento do uso, conforme descrito por Costa et al., 2018.

4.3 Dosagem de proteínas

Para determinar a concentração de proteínas nas amostras em avaliação foi utilizado o método de Bradford (1976), usando albumina de soro bovino como padrão (250- 0,009 µg/mL). Para isso, 10 µL das amostras (extrato bruto, fração 20% e GaBL) diluídas (1: 10), e 190 µL do reagente de Bradford. As amostras foram incubadas por 5 min, e posteriormente medida a absorbância a 595 nm. As unidades correspondentes são (mg/mL) de proteína.

4.4 Atividade Hemaglutinante

Foi realizada para todas as amostras, a fim de detectar a presença de lectinas, o ensaio de atividade hemaglutinante (AH), característico dessas moléculas. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços de microtitulação, de acordo com a metodologia descrita por Paiva e Coelho (1992), onde alíquotas de 50 µL das amostras foram diluídas serialmente em NaCl 0,15 M antes da adição de 50 µL de suspensão (2,5 % v/v) de eritrócitos de coelho. A AH foi expressa como o inverso da maior diluição da amostra que promoveu hemaglutinação. AH específica (AHE) foi definida pela razão entre o título e a concentração proteica (mg/mL).

4.5 Análise fitoquímica

Para identificar os principais compostos do extrato aquoso e da fração proteica (F 20%) de *G. americana* foi realizada análise fitoquímica utilizando a análise qualitativa descrita por Matos (1988).

Com base na metodologia adotada foi possível realizar a prospecção de compostos fenólicos, taninos, antocianinas e antocianidinas, flavonas, flavonóis, xantonas, chalconas, auronas, flavononóis, leconantocianidinas, catequinas, flavononas, esteroides, triterpenoides e saponinas. As reações qualitativas são avaliadas por meio da mudança de coloração decorrente da presença ou ausência dos compostos supracitados.

As análises foram realizadas no Laboratório de Ensino de Química da Universidade Estadual de Alagoas, sob supervisão da Profa. Dra. Aldenir Feitosa dos Santos.

4.5.1 Testes para fenóis, taninos pirogálicos e taninos flobatênicos

No tubo de ensaio adicionou-se três gotas de solução alcoólica de cloreto férrico (FeCl_3), após agitação foi observada a ocorrência de alteração colorimétrica ou formação de precipitado abundante escuro. A coloração entre o azul e o vermelho é indicativa de fenóis, precipitado escuro de tonalidade azul é indicativo da presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis) e verde da presença de taninos flobafênicos (taninos condensados ou catéquicos). Para comparação foi realizado teste em branco utilizando apenas água e o cloreto férrico.

4.5.2 Testes para antocianina e antocianidina, flavonas, flavonóis e xantonas, chalconas e auronas, flavononóis

Para estas análises foram adicionados compostos ácidos ou básicos a fim de se observar por meio da alteração de cor a presença ou ausência dos referidos compostos. Para tal, foi adicionado ácido clorídrico (HCl) ou hidróxido de sódio (NaOH) para a obtenção da solução em pH pré-determinado. A variação de cor indicou a presença ou ausência dos compostos.

4.5.3 Teste para leucoantonocianidinas, catequinas e flavanonas

Foram preparadas duas soluções, uma ajustada a pH 2 com adição de HCl (0,1M) e a outra foi alcalinizada a pH 11 pela adição de NaOH (0,1M). Ambas, foram aquecidas com o auxílio de uma lâmparina de álcool durante 3 minutos, onde posteriormente foi observada a variação de cor, indicativa da presença ou ausência dos compostos secundários.

4.5.4 Testes para flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas

Foi adicionado uma fita de magnésio e 1,0 mL de HCl concentrado. Após o término da reação, indicada pela efervescência, esta alíquota foi comparada com a alíquota acidulada do teste anterior (4.5.3). O surgimento ou a intensificação de cor vermelha indica a presença de flavonóis, flavanonas, flavanonóis e/ou xantonas, livres ou seus heterosídeos.

4.5.5 Teste para esteroides e triterpenoides

O resíduo seco do béquer foi ressuspenso em 2,0 mL de clorofórmio e homogeneizado. A solução foi filtrada e adicionado 1ml de sulfato de sódio anidrido (Na_2SO_4), para um tubo de ensaio. Foi adicionado 1,0 mL de anidro acético, em seguida agitado suavemente e adicionadas 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4). Agitado novamente e observada a projeção de cores indicando: coloração azul evanescente seguida de verde permanente é indicativa da presença de esteroides livres. A coloração parda até vermelha indica triterpenoides pentacíclicos livres.

4.5.6 Teste para saponinas

O resíduo insolúvel em clorofórmio, separado no procedimento anterior (4.5.5), foi ressuspenso em 8,0 mL de água destilada e a solução filtrada para um tubo de ensaio. Agitou-se o tubo com a solução por 3 minutos e observou-se a formação de espuma, a qual se for persistente e abundante (colarinho) é indicativa da presença de saponinas (heterosídeos saponínicos).

Todas as análises foram realizadas em triplicata, tanto para o extrato como para a F 20%.

4.6 Bioensaios

Os insetos utilizados para os bioensaios foram mantidos sob condições controladas conforme descrito no item 4.1.

Os bioensaios foram realizados no laboratório de Bioquímica Metabólica da UFAL, através de uma adaptação do método descrito por Xie e colaboradores (1996) e reproduzido por Napoleão e colaboradores (2013), onde 5mL da amostra em tampão Tris-HCl 50mM foi misturado a 2g de farinha e agitada por 5 min. Posteriormente, 5 alíquotas de 200 μ L da suspensão foram colocadas na placa de Petri e incubado a 56 °C por 16 horas (figura 9). Após este período foram adicionados 20 insetos adultos de *T. castaneum*. O peso das larvas e dos discos foram acompanhados semanalmente até o final do experimento. O ensaio foi realizado em quadruplicata com Tris-HCl 50mM pH 8,0 como controle negativo.

Figura 9 – Dieta artificial utilizada nos bioensaios destacando cada unidade experimental com as 5 alíquotas contendo a dieta.



Autor, 2019.

4.6.1 Análise da sobrevivência

Foi realizada após a ingestão da dieta artificial contendo 100, 250 e 500mg/g do extrato, da fração ou GaBL de *G. americana*. Onde, foi observado e contabilizado diariamente, durante 28 dias ou até a morte de 100% dos indivíduos, o número de insetos sobreviventes em cada unidade experimental.

Os insetos foram considerados mortos quando não respondiam aos estímulos táteis. Todos os testes foram realizados em quadruplicata, com 15 insetos adultos em cada repetição.

4.6.2 Avaliação dos efeitos de *G. americana* sobre a alimentação e índices nutricionais de *T. castaneum*

Após 28 dias em dieta artificial com os discos de farinha contendo ou não as preparações de *G. americana*, foi possível avaliar o índice de deterrência ou dissuasão alimentar (IDA) que foi calculado por meio da fórmula: $IDA (\%) = 100 \times (A-B)/(A)$, 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. As amostras com base na deterrência alimentar classificam-se em: sem deterrência alimentar ($IDA < 20\%$), fraca deterrência alimentar ($20\% < IDA < 50\%$), moderada deterrência alimentar ($50\% < IDA < 70\%$), ou forte deterrência alimentar ($IDA > 70\%$) (Liu et al., 2007).

Foram também avaliados os índices nutricionais: (1) taxa de consumo relativo (RCR) = $C/(D \times \text{dias})$, onde C é a massa do alimento ingerido em mg e D corresponde à biomassa inicial do inseto em mg; (2) taxa de crescimento relativo (RGR) = $E/(D \times \text{dias})$ em que E corresponde à biomassa obtida em mg; (3) eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI) = $E/(C \times 100)$.

4.7 Efeitos bioquímicos

Para conhecer os possíveis efeitos da ingestão do extrato de *G. americana* sobre os níveis de proteínas, glicose, colesterol e triglicerídeos totais dos insetos após o término do bioensaio, 10 insetos foram macerados em 600µL de tampão Tris-HCl 50mM, centrifugado por 15min a 10.000 rpm a 4°C e o sobrenadante foi coletado. As amostras foram quantificadas pelo método de Bradford (1976) padrão para quantificação de proteínas. Para glicose, colesterol e triglicerídeos foi utilizada a metodologia padrão dos kit's comerciais (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, BR) utilizou-se a quantificação de proteínas para padronizar as análises.

4.8 Efeito sobre a reprodução

A capacidade de se reproduzir após os 28 dias expostos à dieta artificial contendo o extrato, a fração e a lectina de *G. americana* foi avaliada através do número de larvas emergidas ao longo do bioensaio.

4.9 Análise estatística

Os dados foram analisados pela ANOVA seguida de teste de *Tukey* para detecção de diferença significativa e comparação entre tratamentos utilizando o Os dados da mortalidade ao longo dos 28 dias 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 Análise fitoquímica do extrato aquoso e fração proteica de *G. americana*

Com base na metodologia descrita por Matos (1988) , o extrato e a fração proteica da casca de *G. americana* foram analisados quanto a presença de metabólitos secundários. Foi observado no extrato as presenças de taninos, esteroides e saponinas entre os compostos fitoquímicos analisados (tabela 4). Dados semelhantes e que destacam a ausência de flavonoides, alcaloides e outros compostos comuns em plantas também foram descritos em outros trabalhos com *Allium oschaninii*, *Chenopodium album* e *Lippia geminata* (ALAGARSAMY et al, 2018; SAMANTA; DE, 2015). Souza et al (2018) também descreve a presença de taninos e esteroides com o extrato das folhas de *G. americana*.

Tabela 4 - Análise qualitativa dos principais componentes fitoquímicos do extrato aquoso e da fração proteica de *G. americana*.

Fitoquímico	Extrato de <i>G. americana</i>	Fração 20% ^a
Fenóis	-	-
Taninos	+	-
Antocianina e antocianidina	-	-
Flavonas, flavonóis e xantonas	-	-
Chalconas e auronas	-	-
Flavononóis	-	-
Leucoantocianidinas	-	-
Catequinas	-	-
Flavononas	-	-
Esteroides	+	-
Triterpenóides	-	-
Saponinas	+	-

^a(+): detectado; (-): não detectado

Autor, 2019

As plantas produzem uma grande variedade de metabólitos que muitas vezes não têm função relevante nos processos fisiológicos ou bioquímicos do vegetal, mas são cada vez mais relatados como importantes mediadores das interações entre plantas e outros organismos (CESPEDES et al, 2013; BORGES et al, 2019). Sabe-se que muitos dos efeitos medicinais atribuídos às plantas são decorrentes desses metabólitos que atuam de forma isolada ou por ação sinérgica (JADON; DIXIT, 2014) não estando o efeito associado a apenas um componente.

Esses metabólitos apresentam diferentes efeitos sobre os insetos herbívoros. Quando ingeridos, podem induzir danos por diferentes mecanismos, entre esses, modulação agonista ou antagonista de neurotransmissores e interferência na estrutura ou metabolismo de DNA (alcaloides), alteração estrutural e funcional de proteínas (taninos, fenóis) e interação e modificação da permeabilidade das membranas celulares (saponinas) (PAIVA et al, 2012).

São relatados na literatura diversas propriedades medicinais atribuídas aos taninos, saponinas e esteroides como ação anticarcinogênico, inseticida, antioxidantes, anticâncer, citotóxicos e antimicrobianos (CARVALHO et al, 2013; ROSSI et al, 2012; SAMANTA; DE, 2015; SOETAN, 2008).

Além dos metabólitos secundários, compostos do metabolismo primário como as lectinas possuem um papel fisiológico importante na defesa contra microorganismos e insetos (NAPOLEÃO et al., 2011; CAMAROTI et al., 2017; PROCÓPIO et al., 2017). Na análise fitoquímica realizada com a fração proteica, não foi detectada a presença de nenhum dos compostos característicos do metabolismo secundários das plantas (tabela 4). A ausência desses metabólitos demonstra a eficácia do processo de fracionamento salino na obtenção de uma fração enriquecida de lectina.

5.2 Efeitos de *Genipa americana* sobre adultos de *Tribolium castaneum*

A fim de conhecer a ação do extrato bruto, da fração proteica e da lectina isolada obtidas das cascas *G. americana* contra adultos de *T. castaneum* foram

avaliados os seguintes parâmetros: sobrevivência, deterrência, parâmetros nutricionais, bioquímicos e sobre a fertilidade. Os resultados obtidos estão organizados descritos abaixo com base nos ensaios realizados.

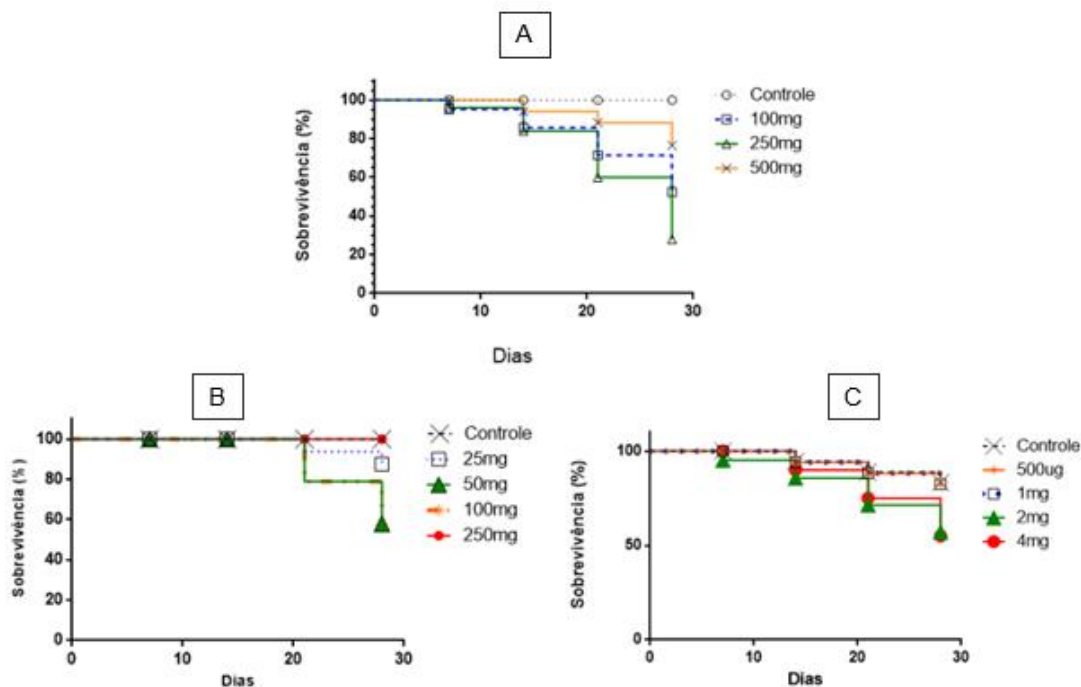
5.2.1 Avaliação da sobrevivência de *T. castaneum* mantidos em dieta artificial com o extrato, a fração proteica e a lectina de *G. americana*.

Os efeitos na sobrevivência de *T. castaneum* mantidos na dieta artificial contendo *G. americana* são apresentados na figura 10. A adição do extrato bruto de *G. americana* afetou a sobrevivência de adultos de *T. castaneum* quando estes foram submetidos a dieta alimentar contendo 100mg, 250mg e 500mg do extrato durante 28 dias. Houve redução significativa na sobrevivência dos insetos tratados com o extrato de *G. americana* quando comparados ao grupo não-tratado. A dose de 250mg foi a que apresentou a melhor resposta com 72% de mortalidade após os 28 dias de consumo seguida da dose de 100mg com 48% (figura 10A).

Para a fração proteica, ocasionalmente chamada de fração lectínica (F20% do fracionamento salino), uma vez que se trata de uma solução enriquecida de lectinas (AHE 1219), foram testadas as doses de 25mg, 50mg, 100mg e 250mg. Após 28 dias de análise, foi possível observar que as concentrações de 50mg e 100mg apresentaram maior efeito na sobrevivência de *T. castaneum*, tendo proporcionado aproximadamente 40% de mortalidade em ambas as doses como observado na figura 10B.

Para avaliar se a lectina é um dos componentes responsáveis pelos efeitos deletérios provocados pela ingestão de *G. americana*, GaBL foi inserida na dieta artificial nas concentrações de 500µg, 1mg, 2mg e 4mg (figura 10C). Pode-se observar que a sobrevivência de *T. castaneum* reduziu até 55% nos insetos mantidos sob dieta alimentar contendo 2mg e 4mg de GaBL, sendo estas as concentrações que causaram a maior mortalidade. As demais concentrações não tiveram diferença em relação a mortalidade do grupo controle, que reduziu menos que 20% da população de insetos.

Figura 10 - curva de sobrevivência de Kaplan-Meier dos adultos de *T. castaneum* mantidos em dieta artificial com: A: extrato aquoso, B: fração proteica e C: GaBL isolada de cascas de *G. americana*.



Autor, 2019.

Muitos trabalhos descrevem a toxicidade dos extratos aquosos como baixa ou moderada em comparação a extratos etanólicos, metanólicos, e outros, o que pode estar associado a grupos de compostos, tais como alcaloides e flavonoides que são extraídos diferencialmente com solventes mais apolares (GOUVÊA et al, 2019). Entretanto os dados aqui apresentados para extrato aquoso descrevem valores considerados significativos para o uso como extrato inseticida no que se refere a concentrações e efeito na sobrevivência (CAMAROTI et al, 2018; PAZ et al, 2018).

Quanto a fração proteica, pode-se observar que houve uma redução dos efeitos sobre a sobrevivência em comparação aos dados obtidos com o extrato, o que pode ser justificado pela eliminação de metabólitos secundários em decorrência do processo de fracionamento salino, uma vez que este tipo de técnica permite a eliminação dos metabólitos e por consequência permite uma maior concentração de proteínas com base na sua solubilidade pela adição de

sal. Esses metabólitos secundários, de forma isolada ou sinérgica, podem ser importantes componentes responsáveis pela maior redução na sobrevivência dos insetos tratados com a fração em comparação com o extrato. Existem poucos relatos na literatura que descrevam os efeitos de frações proteicas sobre a sobrevivência de insetos (SALLES et al, 2014). Assim como não há relatos sobre os efeitos de *G. americana* sobre insetos da ordem Coleoptera e nenhum para *T. castaneum*, para estas amostras.

Os dados obtidos com a lectina, por sua vez, confirmam que GaBL é um dos princípios ativos associados a ação inseticida presente no extrato de *G. americana* e na fração proteica, uma vez que de forma isolada mostrou efeito considerável na sobrevivência de *T. castaneum* em menores concentrações do que o extrato e fração. A atividade defensiva de lectinas de plantas contra insetos pragas tem sido amplamente avaliada ao longo da última década, e evidências quanto a não toxicidade destas moléculas a humanos tem possibilitado o aumento significativo da aplicação das lectinas enquanto agentes inseticidas contra insetos sugadores. Seus efeitos entomotóxicos já foram descritos contra insetos das ordens Lepidoptera, Diptera, Isoptera, Hemiptera, Hymenoptera, Homoptera, Coleoptera, entre outras (MACEDO et al, 2015; NAPOLEÃO et al, 2011; OLIVEIRA et al, 2017; REYES-MONTAÑO; VEGA-CASTRO, 2018; ROY; DAS, 2015; SÁ et al, 2009).

5.2.2 Efeitos de *G. americana* sobre a alimentação de *T. castaneum*

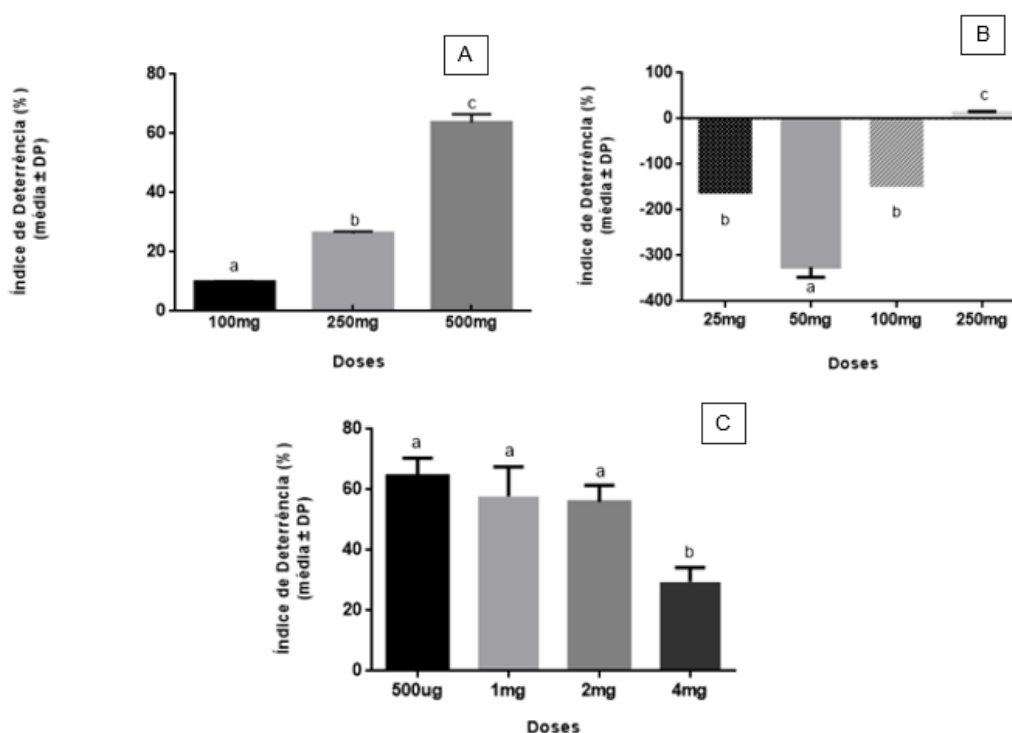
Visto que são muitos os mecanismos pelos quais os agentes botânicos podem interferir na sobrevivência dos insetos se faz necessário conhecer os mecanismos pelos quais o extrato de *G. americana* causou a redução da sobrevivência dos insetos nos tratamentos avaliados. Neste sentido, o índice de deterrência alimentar (dissuasão alimentar - IDA) e os parâmetros nutricionais dos insetos foram calculados após os 28 dias de ingestão da dieta.

Foi observado que houve redução de maneira dose-dependente na alimentação dos insetos nos tratamentos contendo o extrato de *G. americana* em todas as concentrações testadas, 100mg, 250mg e 500mg (figura 11A). Tendo a concentração de 500mg do extrato de *G. americana* apresentado

deterrença de aproximadamente 63%, valor considerado como deterrença moderada de acordo com Liu et al (2007).

Não foi observado efeito deterrente da fração proteica sobre *T. castaneum*, conforme disposto na figura 16, uma vez que somente a maior dose (250mg) apresentou taxa de inibição alimentar (< 20%), que não chega a ser classificada como efeito deterrente com base na classificação de Liu e colaboradores (figura 11B). No entanto, para GaBL, a figura 11C mostra que as doses de 500µg, 1mg, 2mg da lectina apresentaram moderado efeito deterrente alimentar.

Figura 11 - Efeito deterrente de *G. americana* sobre adultos de *T. castaneum*. A: extrato aquoso, B: fração proteica e C: GaBL.



Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos pelo teste de Tukey. (n=4). Autor, 2019.

Com os dados descritos para o extrato é possível verificar que, nas concentrações testadas, os tratamentos de 100mg e 250mg tiveram níveis mais

baixos de deterrência, indicando que os insetos conseguiram se alimentar da dieta, e que estes foram os tratamentos que mais afetaram a sobrevivência dos insetos, sugerindo-se assim que a ação tóxica do extrato pode estar associada a um ou mais de seus metabólitos, que ao serem ingeridos na dieta promoveram a mortalidade de até 72% da população. Na concentração de 500 mg, existe deterrência moderada (63%), o que ainda leva o inseto a ingerir a dieta contendo o extrato, resultando na mortalidade observada.

Napoleão e colaboradores (2013) descreveram o efeito deterrente moderado do extrato das folhas de *Myracrodruon urundeuva* em adultos de *S. zeamais*. Behmer e colaboradores em 2002, mostraram o efeito deterrente de taninos sobre *Locusta* mantidos em dieta artificial, corroborando com nossos resultados como demonstrado neste trabalho (item 5.1), uma vez que os taninos estão presentes na composição química do extrato de *G. americana*.

Sendo o fracionamento salino uma técnica de pré-purificação, a fração proteica é uma amostra que foi enriquecida de proteínas de interesse, onde eliminou-se a maior parte dos metabólitos secundários presentes no extrato e que podem estar associados ao efeito deterrente do extrato, uma vez que após o fracionamento este efeito não foi observado nos ensaios com a fração proteica.

GaBL por sua vez, de maneira isolada também apresentou efeito deterrente assim como o extrato de *G. americana*, sugerindo assim que quando a lectina encontra-se separada de outras proteínas da fração, esta exibe efeito anti-alimentar. Napoleão e colaboradores (2013), também descreve o impedimento alimentar provocado pela ingestão da lectina da folha de *Myracrodruon urundeuva* em adultos de *Sitophilus zeamais*, semelhante ao efeito deterrente do extrato, fato que também foi observado ao longo deste trabalho. Na concentração mais alta avaliada, 4mg, foi observada redução na deterrência, passando a ser considerada fraca.

Outras lectinas como a de *Galanthus nivalis* e *Canavalia ensiformis* (Con A), também apresentaram efeito deterrente sobre *Nilaparvata lugens* e *Acyrtosiphon pisum*, respectivamente (GATEHOUSE et al, 1998; SAUVION et al, 2004). GaBL nas concentrações testadas pode ser utilizada como um agente

deterrente de grande interesse com potencial aplicação no MIP de grãos e produtos armazenados.

O uso de mecanismos não-tóxicos, como produtos deterrentes ou repelentes, têm despertado cada vez mais interesse no controle de pragas. O conceito ganhou força após a demonstração dos efeitos deterrentes dos extratos de nim e azadiractina na década de 1980 (ISMAN, 2006). Esses agentes juntamente aos semioquímicos, enzimas, reguladores de crescimento e outros, integram um novo grupo de agentes pesticidas, chamados pesticidas bioquímicos. Definição que se encaixa aos produtos de origem natural e que controlam pragas por rotas não-tóxicas (SARWAR, 2015).

Alguns autores sugerem que a deterrência alimentar por si só pode não ser o fator principal da mortalidade de insetos submetidos a dietas artificiais contendo extrato ou outros produtos de origem botânica, mas que a privação alimentar ou mesmo o consumo reduzido promove estresse de fome em insetos prejudicando assim o comportamento, a fisiologia, o desenvolvimento, a reprodução e a sobrevivência, podendo resultar em efeitos a longo prazo (NAPOLEÃO et al, 2013; PAIVA et al, 2012).

Esses efeitos explicam-se pelo fato de, antes de começar a se alimentar os insetos exibem comportamentos que podem levar à aceitação ou rejeição da comida. Esses comportamentos permite o monitoramento dos produtos químicos na superfície do alimento, inclusive do odor o que pode levar o inseto a rejeitar o alimento sem investigação adicional ou levá-lo a uma mordida exploratória (CHAPMAN, 2013). Outra característica a ser considerada além da prevenção comportamental, é que os insetos podem lidar com os aleloquímicos (taninos, terpenóides) desintoxicando e os excretando (CHOWN; NICOLSON, 2004).

5.2.3 Efeitos de *G. americana* sobre os parâmetros nutricionais de *T. castaneum*

Considerando a deterrência alimentar e a redução da sobrevivência de *T. castaneum* decorrente da ingestão do extrato de *G. americana*, os parâmetros nutricionais, taxa de consumo relativo (RCR), taxa de crescimento relativo (RGR) e eficiência da conversão do alimento ingerido (ECI) dos insetos foram

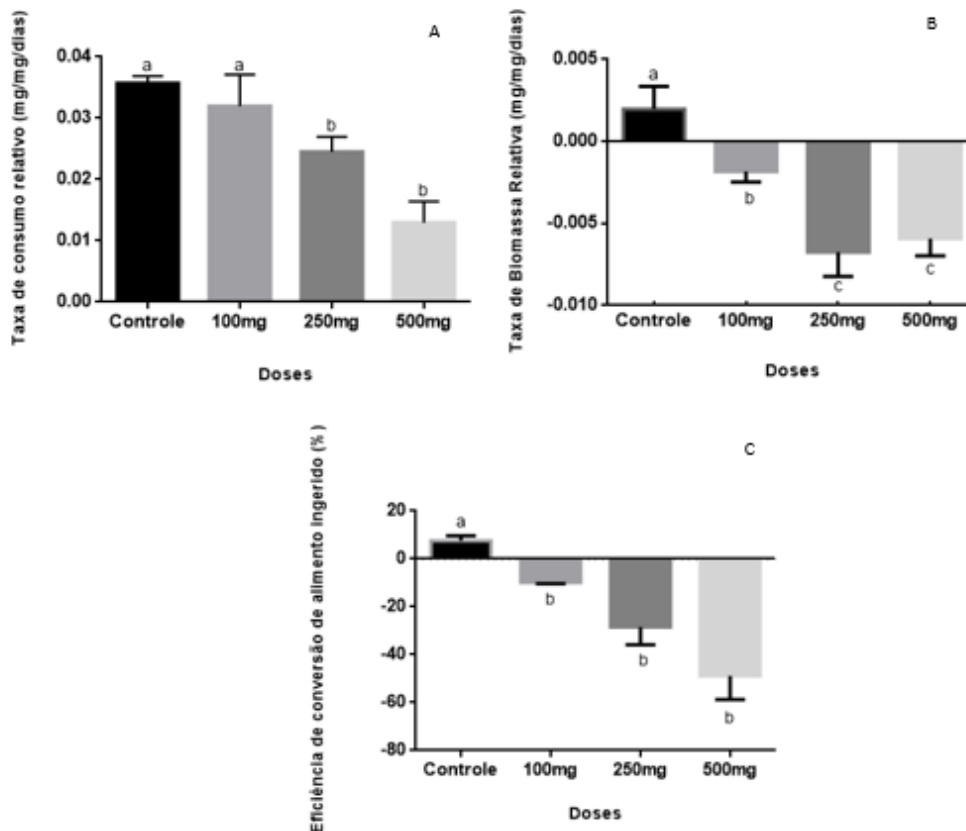
calculados, a fim de, determinar se a morte do inseto está diretamente associada ao seu efeito anti-alimentar e/ou anti-nutricional.

As análises dos parâmetros nutricionais corroboram em geral com os dados do IDA para todas as amostras. As reduções nas taxas foram detectadas em todos os tratamentos revelando que os insetos não apenas tiveram menor ganho de peso, mas que também perderam biomassa.

Neste sentido, pode-se observar que houve redução no consumo relativo da dieta nas doses de 250mg e 500mg (figura 12) e que, em todas as concentrações testadas, não houve crescimento relativo em biomassa (mg) para os insetos quando comparadas ao teste controle, até mesmo no tratamento de 100mg, que não havia apresentado diferença significativa em relação ao controle para o consumo relativo da dieta. Isto confirma que o extrato além de ser anti-alimentar, já que apresentou deterrência moderada em 500mg, é anti-nutricional por não haver crescimento relativo em biomassa mesmo nas concentrações mais baixas, onde não há deterrência.

A conversão de alimentos consumidos em biomassa também foi afetada pelo extrato. A figura 12 mostra que em todos os tratamentos houve diferença significativa ($P < 0,05$) quando comparados ao grupo controle. De acordo com os valores de ECI e RCR exibidos em relação ao tratamento de 100mg, é possível afirmar que os insetos se alimentaram do extrato, mas não converteram este alimento ingerido em biomassa, sugerindo-se haver um requerimento de uma quantidade ainda maior de alimento para ganhar o mesmo peso em comparação com os insetos do grupo controle.

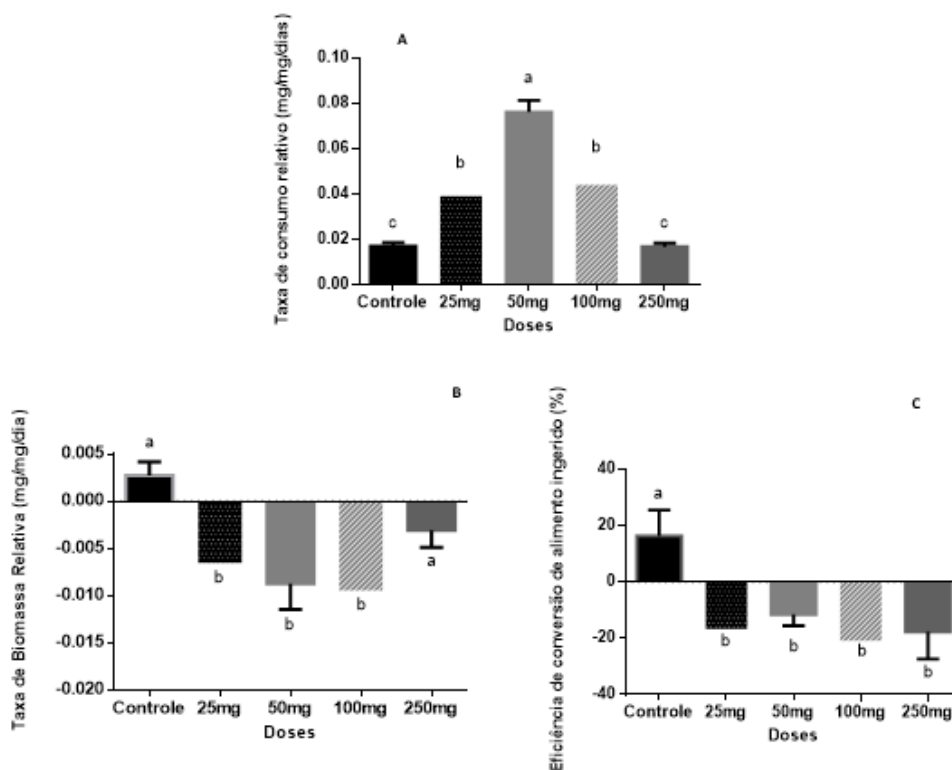
Figura 12 - Parâmetros nutricionais de adultos de *T. castaneum* mantidos em dieta artificial contendo ou não extrato de *G. americana*. A: RCR = Taxa de consumo de alimento (mg); B: RGR = Taxa de biomassa relativa do inseto (mg); C: ECI = eficiência de conversão do alimento ingerido (mg).



Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos pelo teste de Tukey. (n=4). Autor, 2019.

Para a fração proteica, em relação aos parâmetros nutricionais, os dados da RCR corroboram com o IDA (figura 11) uma vez que houve consumo da dieta em todos os tratamentos, sendo observado ainda que nas doses de 25mg, 50mg e 100mg o consumo alimentar foi maior do que o grupo controle. Embora o consumo da dieta não tenha sido interrompido (figura 13A), os insetos não conseguiram converter o alimento em biomassa conforme demonstrado pelos dados do crescimento relativo (mg) (figura 13B) e da taxa de conversão do alimento (figura 13C). Portanto, a fração não foi anti-alimentar, mas foi anti-nutricional. Estes dados sugerem que há na fração um componente, de origem proteica, que atua como agente anti-nutricional, visto que, a fração interferiu na absorção e conversão do alimento em biomassa em todos os tratamentos analisados.

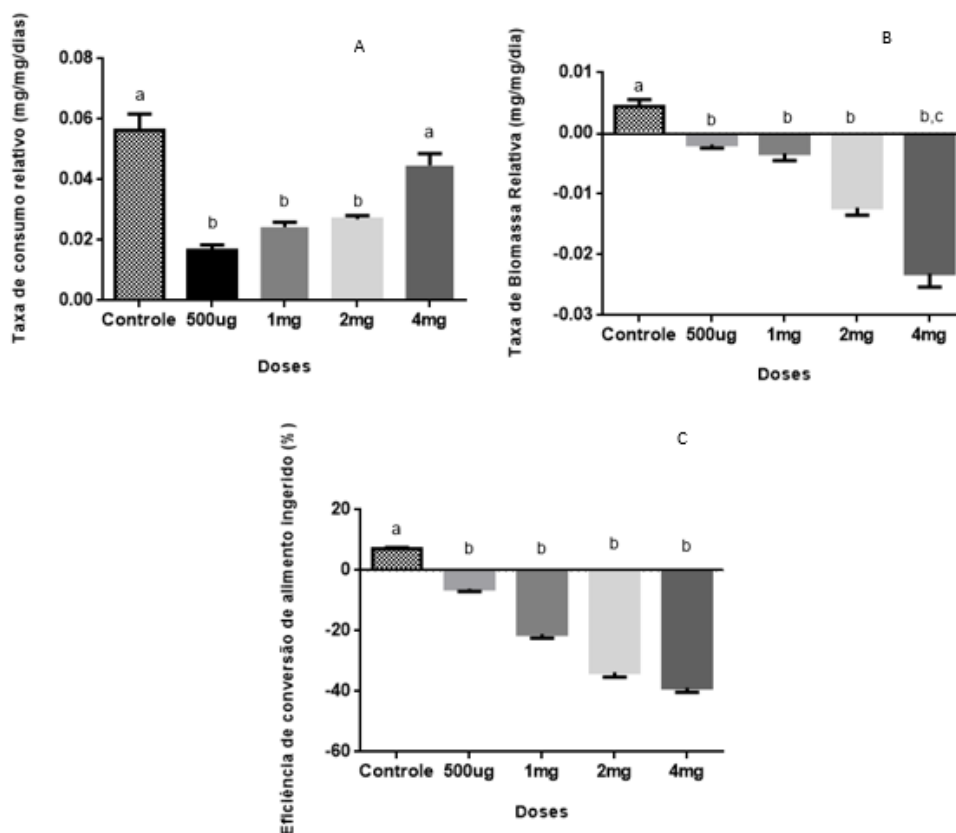
Figura 13 - Parâmetros nutricionais de adultos de *T. castaneum* mantidos em dieta artificial contendo uma fração proteica de *G. americana*. A: RCR = Taxa de consumo de alimento (mg); B: RGR = Taxa de crescimento relativo (mg); C: ECI = eficiência de conversão do alimento ingerido (mg).



Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos pelo teste de Tukey. ($n=4$). Autor, 2019.

A figura 14 mostra os parâmetros nutricionais dos adultos de *T. castaneum* calculados após os 28 dias mantidos na dieta artificial contendo GaBL. Houve redução no consumo alimentar nas concentrações com deterrência moderada (500 μ g, 1mg e 2mg) porém não para a concentração de 4mg (com deterrência fraca), o que corrobora com o resultado do IDA (figura 11C). Contudo, embora os insetos do tratamento com 4mg de GaBL tenham consumido mais a dieta, os dados de RGR mostram que estes foram os que menos ganharam biomassa (figura 14B), tendo ocorrido em todos os tratamentos a perda de biomassa, devido a ineficiência na conversão do alimento ingerido (figura 14C) que está evidenciada pelos valores negativos de RGR e ECI apresentado em todos os tratamentos com a lectina. Desta forma, GaBL exibe ação anti-alimentar, principalmente em menores concentrações, e antinutricionais.

Figura 14 - Parâmetros nutricionais de adultos de *T. castaneum* mantidos em dieta artificial contendo GaBL (500µg, 1mg, 2mg ou 4mg). A: RCR = Taxa de consumo de alimento (mg); B: RGR = Taxa de biomassa relativa do inseto (mg); C: ECI = eficiência de conversão do alimento ingerido (mg).



Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos pelo teste de Tukey. ($n=4$). Autor, 2019.

Sugere-se que a perda de biomassa seja uma consequência da ausência de atividade alimentar adequada. Napoleão e colaboradores (2013), ao testar os efeitos do extrato de *Myracrodruon urundeuva* em *Sitophilus zeamais* encontrou resultados semelhantes aos aqui apresentados, inferindo que a ingestão de altos níveis de extrato pode interferir nos processos de digestão e absorção de nutrientes fazendo com que os insetos metabolizem suas reservas corporais para sobreviver.

Com base nos dados pode-se constatar que o extrato de *G. americana* exerce efeito sobre a sobrevivência e os parâmetros nutricionais de *T. castaneum* mantidos em dieta artificial. Considerando que houve efeitos relevantes na eficiência de conversão do alimento e por consequência no ganho de biomassa destes insetos, surge a hipótese de que o extrato possa interferir

de forma indireta no metabolismo do *T. castaneum*. Há dados na literatura que apoiam as observações aqui descritas. Rossi e colaboradores (2012) descreveram os efeitos do extrato aquoso de folhas de mamona sobre larvas de *Spodoptera frugiperda*, com enfoque nas alterações nos índices nutricionais e sobrevivência destes insetos em dieta alimentar contendo diferentes concentrações do extrato.

O efeito deterrente alimentar do extrato de *Melicope subunifoliolata* também interferiu no crescimento, no consumo de alimentos e na eficiência de conversão alimentar de *S. zeamais* (HO et al, 2003), assim como o extrato aquoso de *Schinus terebinthifolius* afetou a sobrevivência e parâmetros nutricionais de *Sitophilus zeamais* (CAMAROTI et al, 2018), o que também foi observado nos ensaios dos presente trabalho.

Como citado anteriormente, saponinas, flavonoides, taninos e lectinas são os componentes comumente relatados como agentes antinutricionais presentes em amostras vegetais (ROSSI et al, 2012; SHANTIBALA et al, 2014), e como demonstrado pela análise fitoquímica, na fração 20% utilizada nos bioensaios não foi detectada a presença de taninos e saponinas, que haviam sido encontrados no extrato conforme descrito na tabela 3. Em contrapartida, a fração em análise teve atividade específica (AHE 1219) determinada pelo teste de hemaglutinação comumente realizado para detecção de lectinas, o que corrobora com a hipótese de que sejam as lectinas o principal componente responsável pelo efeito antinutricional, fato comprovado no presente estudo, uma vez que a lectina GaBL apresentou efeitos ainda mais pronunciados sobre os parâmetros nutricionais de *T. castaneum* e em menores concentrações do que extrato e fração.

Entre os produtos de origem vegetal aos quais tem sido atribuído o potencial inseticida as proteínas, em especial os inibidores de proteases, ureases, as lectinas têm tido cada vez mais destaque (DANG; VAN DAMME, 2015; MACEDO, 2015). Muitos já são os trabalhos que descrevem os efeitos de lectinas na redução da sobrevivência de insetos de diferentes ordens, porém os mecanismos de ação parecem ser bastante variados. Insetos das ordens Coleoptera (MACEDO et al, 2007; WALSKI et al, 2014), Lepidoptera (OLIVEIRA et al, 2017; TAJNE et al, 2014), Isoptera (SILVA et al, 2009; LIMA et al, 2017)

entre outras já tiveram sua sobrevivência ou alterações fisiológicas modificadas devido a ação de proteínas inseticidas de plantas.

5.2.4 Parâmetros bioquímicos de *T. castaneum* mantidos em dieta artificial contendo *G. americana*

O conhecimento sobre o consumo e utilização de alimentos é de grande importância na gestão de insetos pragas e para a compreensão do mecanismo de ação de compostos inseticidas. Então, para investigar as possíveis alterações metabólicas oriundas da ingestão do extrato de *G. americana*, os níveis totais de proteínas, triacilgliceróis, colesterol e glicose foram avaliados.

As informações sobre o metabolismo e os parâmetros bioquímicos em insetos ainda vêm sendo investigadas e os requisitos nutricionais variam bastante. A hemolinfa pode fornecer uma leitura contínua das características nutricionais e do estado metabólico dos insetos, e as principais fontes de energia incluem o alimento ingerido, que contém diversos macronutrientes e os próprios nutrientes que ficam armazenados, estes incluem carboidratos complexos, proteínas que são quebradas no trato alimentar e com menor relevância a nível nutricional, as gorduras (KERKUT; GILBERT, 1985; SILVA et al, 2012) .

De maneira geral, as proteínas, quando estão presentes em altas concentrações são decompostas em aminoácidos por enzimas proteolíticas, principalmente endo e exopeptidases, e são absorvidas passivamente através da parede do intestino médio, sendo as cisteíno proteases as enzimas dominantes em Coleopteras. Tanto enzimas como proteínas estruturais, participam das reações de mudança de estágio, desde a embriogênese até a reprodução. Sabe-se ainda que, em dietas com baixo valor nutricional ou situações de baixo consumo alimentar ocorre a diminuição da secreção de enzimas digestivas e por consequência a diminuição da absorção dos produtos oriundos da hidrólise (CHOWN; NICOLSON, 2004; MARDANI-TALAEI et al, 2017).

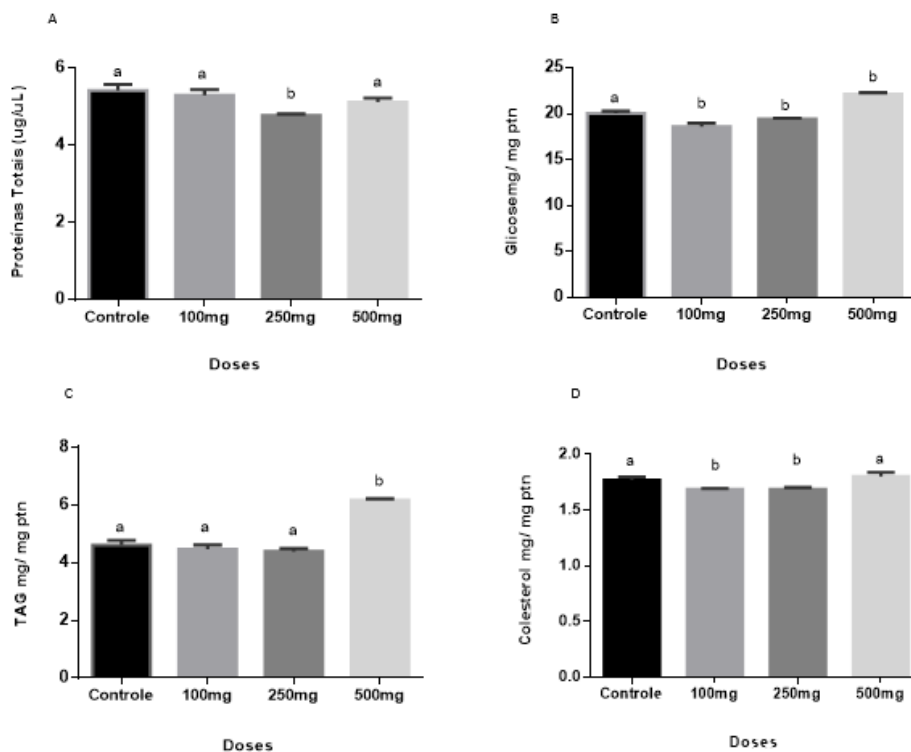
Os carboidratos, são componentes importantes da dieta para a maioria dos insetos. Eles são utilizados como combustível respiratório, e podem ser convertidos em lipídios, moléculas utilizadas pelos insetos como reserva energética bem como na síntese de vários aminoácidos através do

fornecimento de esqueleto de carbono (CHAPMAN, 2013). Além disso, a cutícula dos insetos contém caracteristicamente o polissacarídeo quitina. Os carboidratos oriundos da dieta são absorvidos rapidamente e de forma completa, e são estocados no músculo de vôo ou no corpo gorduroso, o glicogênio e a trealose são as principais reservas nos tecidos e são sintetizados quando a ingestão de carboidratos é maior do que o que é imediatamente necessário, como na dieta utilizada neste trabalho. Ambos podem ser facilmente convertido em glicose quando as reservas precisam ser mobilizadas (KLOWDEN, 2013; PIMENTEL et al, 2018).

Os lipídeos são facilmente sintetizados pelos insetos não sendo constituintes dietéticos geralmente essenciais, mas ainda assim os insetos exigem uma fonte alimentar de ácidos graxos polinsaturados (PUFAs), e todos os insetos requerem esteróis, que em geral é o colesterol, para síntese de feromônios, principalmente (ATELLA et al, 2012; CHOWN; NICOLSON, 2004). Após absorção, os ácidos graxos são convertidos a diacilgliceróis (DAG) nas células do intestino e retornam a hemolinfa como lipoforina. No corpo gorduroso os DAG são convertidos a TAG para estocagem. A lipólise ocorre predominantemente no intestino médio, com participação de diversas lipases. Para os insetos que se alimentam de sementes, tais como o *T. castaneum*, ainda não se tem exatidão sobre as lipases responsáveis pela digestão dos TAG. (CHAPMAN, 2013; KLOWDEN, 2013).

Pode-se observar, na figura 15, que houve alteração significativa ($p < 0,05$) nos níveis de todos os metabólitos avaliados dos insetos alimentados com dieta contendo extrato em comparação ao controle. O nível de proteínas diminuiu nos adultos mantidos na dieta a 250mg. O nível de colesterol foi reduzido nos tratamentos de 100mg e 250mg. O nível de glicose foi alterado em todos os tratamentos. A dieta de 500mg aumentou significativamente os níveis de TAG e de glicose.

Figura 15 – Perfil bioquímico total de adultos de *T. castaneum* mantidos em dieta artificial contendo ou não extrato de *G. americana*. A: proteínas totais; B: glicose total; C: TAG total; D: colesterol total.



Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos pelo teste de Tukey. ($n=4$). Autor, 2019.

Na presença de aleloquímicos tais como taninos e compostos fenólicos, pode ocorrer falhas na digestibilidade de proteínas bem como efeito deterrente (BEHMER et al, 2002). Os taninos, podem ainda interferir na estrutura de proteínas causando perda funcional (PAIVA et al, 2012). Estes fatos podem justificar tanto a maior mortalidade na dose de 250mg (figura 10) como a redução observada nos níveis de proteínas (figura 13) dos insetos tratados com o extrato de *G. americana*. As saponinas, presentes no extrato de *G. americana*, em específico, podem reduzir os níveis de proteínas e aminoácidos livres, e já foram descritas por interferir na atividade de proteinases intestinais de *T. castaneum*, *Tenebrio molitor* e *Dermestes maculatus*, tendo relevante papel no controle de pragas, pois além de serem tóxicas são destacados agentes antinutricionais para insetos (CHAPMAN; HALL, 1996).

Considerando os dados obtidos na análise dos níveis de glicose pode-se inferir que nos tratamentos de 100mg e 250mg houve o consumo da dieta rica

em carboidratos havendo uma redução nos níveis de glicose pois esta possivelmente esta sendo armazenada na forma de glicogênio no corpo gorduroso ou trealose na hemolinfa. No bioensaio com o tratamento com 500mg houve aumento na concentração de glicose, sendo esta a dose mais deterrente (menor consumo pelos insetos) sugerindo que estes podem estar utilizando as reservas energéticas para a produção de glicose (figura 13).

Os níveis totais de proteínas, glicose, TAG e colesterol também foram analisados, a fim de elucidar a interferência da fração proteica originada a partir do extrato aquoso de *G. americana* sobre *T. castaneum* (figura 16). Os dados mostram que em todos os tratamentos houve diferença significativa, quando comparados ao grupo controle, na absorção ou metabolização dos nutrientes acima citados.

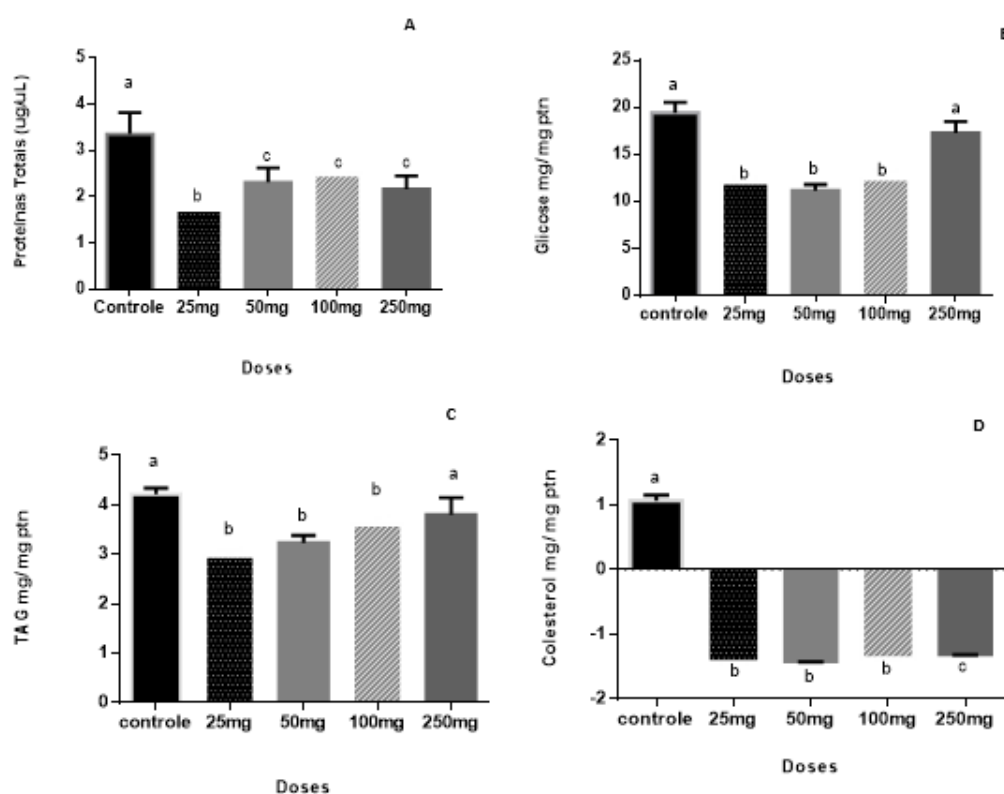
O nível de proteínas reduziu em todos os tratamentos, sendo a redução mais acentuada na dose de 25mg (Figura 16A), sugerindo assim uma má digestibilidade destas moléculas. Partindo-se da hipótese de que sejam as lectinas os agentes responsáveis pelo efeito antinutricional da F20%, a má digestibilidade de proteínas também tem sido atribuída a elas em testes com dietas artificiais (LIMA et al, 2017; NUNES et al, 2015).

A glicose também foi reduzida nos tratamentos contendo 25mg, 50mg e 100mg e no tratamento de 250mg não houve diferença significativa quando comparado ao controle (figura 16B). Embora tenham consumido a dieta de modo satisfatório é possível observar que os insetos não conseguem absorver e metabolizar esses nutrientes, podendo interferir assim até na estocagem e posterior utilização das reservas energéticas (CHAPMAN, 2013).

Com relação aos lipídeos, os TAG, importantes reservas energéticas para os insetos, assim como ocorreu para a glicose, teve seus níveis totais reduzidos nos tratamentos de 25mg, 50mg e 100mg, mas não houve diferença em relação ao controle na dose de 250mg (figura 16C). Informações precisas sobre os efeitos desta redução precisam ser melhor investigadas, já que os TAG são geralmente digeridos e absorvidos pelo epitélio intestinal e transportados para outros tecidos, em especial para o corpo gorduroso onde serão estocados, e na corrente investigação ainda não foram realizadas análises em tecidos

específicos, que permitiriam obter maiores considerações sobre os processos de digestão, absorção, metabolização e transporte de TAG, que possam estar sendo afetados.

Figura 16 – Perfil bioquímico total de adultos de *T. castaneum* mantidos em dieta artificial contendo ou não F20% de *G. americana*. A: proteínas totais; B: glicose total; C: TAG total; D: colesterol total.



Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos pelo teste de Tukey. ($n=4$). Autor, 2019.

Uma das hipóteses que surgem relaciona-se com a interação dos componentes da fração com proteínas e lipoproteínas de transporte de lipídeos, uma vez que estas moléculas já foram descritas na literatura como alvos-moleculares das lectinas (LIMA et al, 2017; NAPOLEÃO et al, 2018). Já para o colesterol (figura 16D), todos os tratamentos reduziram consideravelmente os níveis de colesterol em comparação ao controle, visto ser esta uma molécula de grande relevância para a síntese de hormônios como ecdisteróides e feromônios pode ser este um importante mecanismo de ação de *G. americana* sobre *T. castaneum*. A redução e disponibilidade de nutrientes pode envolver modificação

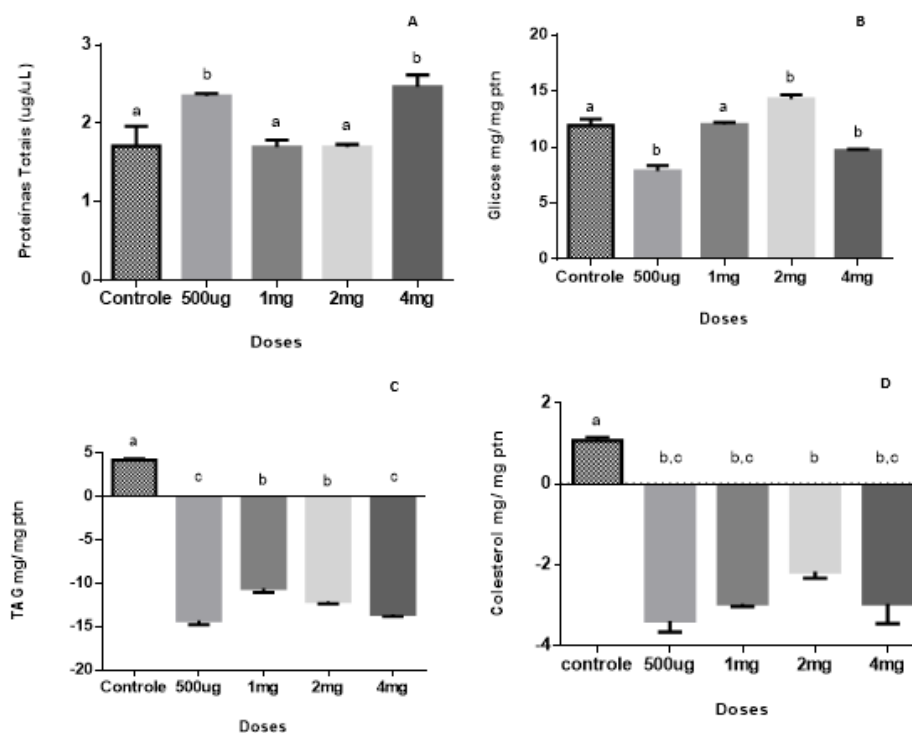
química do nutriente, formação de complexos com ele, ou interferência na sua digestão ou absorção (PARRA et al, 2009).

A fim de, confirmar a hipótese da metabolização das reservas energéticas que pode ter sido umas das consequências da redução do consumo alimentar e da taxa de biomassa observada nos insetos mantidos na dieta com GaBL, bem como ratificar o papel de GaBL como um dos compostos responsáveis pelo efeito antinutricional observado ao longo do ensaio com todas as amostras analisadas, foram avaliados também os níveis totais de proteínas, glicose, TAG e colesterol (figura 17).

Foi observado que, para proteínas, houve aumento no nível total na menor dose (500 μ g) e na maior dose (4mg) e os demais tratamentos não diferiram do controle (figura 17A). Para a glicose (figura 17B) o aumento seguiu o padrão dose-dependência em relação a deterrência alimentar. Os níveis foram aumentando conforme reduzia o efeito deterrente, ou seja, a dose mais deterrente (500 μ g) teve o nível de glicose reduzido em relação ao controle, a de 1mg não diferiu do controle, a de 2mg foi maior que o controle. Quando aumentou ainda mais a concentração da lectina na dieta (4mg), ocorreu uma redução nos níveis de glicose a um nível semelhante a dose de 500 μ g, a que o inseto menos se alimentou. Essa redução sugere que a glicose tenha sido consumida devido a privação alimentar, e que diante disso não seria possível a síntese de trealose, principal molécula de armazenamento de glicose na hemolinfa, e que é comumente requerida em casos de privação alimentar e de baixas concentrações de lipídeos.

Os níveis de TAG também foram alterados pelo tratamento com a lectina em todas as concentrações, havendo redução considerável dos níveis em todas as doses testadas (figura 23C). Este é um efeito bastante significativo do ponto de vista da bioquímica de insetos assim como para o controle de pragas. Os lipídeos são a principal fonte de energia utilizada pelos insetos, de grande relevância nos estados de alta demanda energética como durante o vôo e oviposição (ATELLA et al, 2012), em especial nas situações de privação alimentar. Além disso, o acúmulo e mobilização de lipídios é particularmente importante para a reconstrução e bioquímica do corpo nos insetos holometábolos (CHAPMAN, 2013).

Figura 17 – Perfil bioquímico total de adultos de *T. castaneum* mantidos em dieta artificial contendo ou GaBL. A: proteínas totais; B: glicose total; C: TAG total; D: colesterol total.



Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos pelo teste de Tukey. ($n=4$). Autor, 2019.

Sabe-se que os carboidratos da dieta de *T. castaneum* são facilmente metabolizados em TAG para serem armazenados no corpo gorduroso, o que corrobora com a hipótese que GaBL interfere na absorção de nutrientes já que mesmo no tratamento onde houve maior consumo alimentar (4mg) ainda assim os níveis de TAG permaneceram negativos (figura 23C), indicando redução nas concentrações deste metabólito livre no inseto. KIKUTA, 2018 também descreve a redução nos níveis de TAG devido a privação alimentar.

A figura 23D, mostra o perfil de colesterol dos insetos após os 28 dias mantidos em dieta artificial com GaBL. Assim como para a fração proteica, a lectina isolada de *G. americana* reduziu a valores negativos o nível de colesterol dos insetos, que do ponto de vista do controle de pragas é bastante importante, uma vez que o colesterol é um dos principais precursores dos feromônios.

Considerando que lectinas são capazes de interagir com a porção glicosilada da membrana peritrófica, de grande relevância nos processos de absorção dos nutrientes dos insetos, é possível que a redução no nível de moléculas energéticas possa também estar ocorrendo por uma perturbação nessa membrana (COELHO et al., 2009).

5.3 Inibição da oviposição de *T. castaneum* mantido em dieta artificial contendo *G. americana*

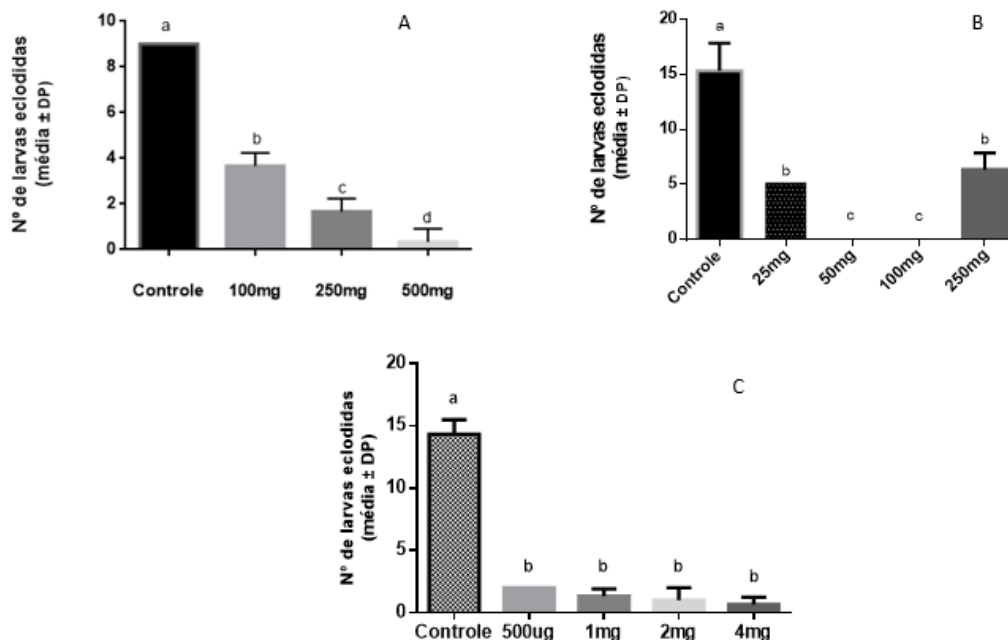
Considerando que a literatura atribui a muitos extratos vegetais e seus constituintes a interferência na biologia e no ciclo reprodutivo de insetos de diferentes ordens, no corrente estudo também foi avaliado o efeito sobre a reprodução de *T. castaneum* mantidos em dieta artificial com *G. americana*. A figura 18, traz o resultado da avaliação do percentual de larvas eclodidas ao longo dos 28 dias nos quais ocorreu o experimento (BERNARDI et al, 2017; BORGES et al, 2019; SEIFI et al, 2018).

Houve redução significativa no percentual de larvas eclodidas em todas as doses e em todas as amostras analisadas em relação ao controle, tendo a fração conseguido inibir até 100% a eclosão de larvas ao longo dos 28 dias do bioensaio.

Para o extrato a maior dose (500mg) foi responsável pela redução de 96,3% da eclosão de larvas ao longo dos 28 dias. Isso pode ser justificado devido a atividade deterrente atribuída ao extrato de *G. americana* (63% de deterrência alimentar figura 11A). A redução na ingestão a privação de alimento causam estresse de fome em insetos interferindo entre outros aspectos no seu comportamento, reprodução e sobrevivência (PARK, 2009).

Elimam e colaboradores (2009) mostraram o forte efeito inibidor da oviposição de *Ricinus communis* L. contra *Anopheles arabiensis* e *Culex quinquefasciatus* com índices de até 100% de inibição. O extrato aquoso de *Ammi visnaga* Linn. também teve efeito sobre a oviposição de fêmeas de *Tetranychus urticae* Koch (PAVELA, 2015).

Figura 18 - Eclosão de larvas de *T. castaneum* mantidos 28 dias em dieta artificial contendo ou não *G. americana*. A: extrato aquoso, B: fração proteica e C: GaBL.



Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos pelo teste de Tukey. (n = 4). Autor, 2019.

Assim como para o extrato, os possíveis efeitos sobre a eclosão de larvas de *T. castaneum* mantidos em dieta artificial contendo a fração proteica de *G. americana* também demonstrou redução significativa em todos os tratamentos, em especial nas doses de 50mg e 100mg, nas quais houve 100% de redução do número de larvas eclodidas (figura 18B). Frações proteicas enriquecidas de lectina de *Crotalaria spectabilis* e *Moringa oleifera* interferiram na eclosão de ovos de nematoides gastrointestinais de ruminantes (SALLES et al, 2014).

Embora com redução significativa em relação ao controle a dose de 250mg conseguiu se reproduzir quando comparada a doses menores como 50mg e 100mg onde não foram observadas eclosões de larvas. Isso sugere que os insetos deste tratamento, que tiveram seus níveis de glicose e TAG não divergindo do controle, conseguiram manter níveis energéticos suficientes para

reprodução, o que não aconteceu com os que tiveram esses mesmos parâmetros reduzidos.

Do ponto de vista metabólico, sabe-se que os TAG podem representar até 40% do peso seco de ovos e são as principais reservas energéticas para o embrião em desenvolvimento. Com base nos dados aqui apresentados, a redução dos níveis de TAG provocado pela ingestão da fração de *G. americana*, pode estar associado a redução significativa de larvas eclodidas ao longo do ensaio. Além disso, outras fontes energéticas tais como colesterol e carboidratos, que também poderiam suprir as necessidades dos novos embriões na ausência de TAG, foram igualmente reduzidos. Uma vez que, não foi avaliado a oviposição propriamente dita, não se pode afirmar que este foi o mecanismo que gerou a redução das larvas ao longo do teste, outras hipóteses também são aceitas, tais como esterilidade por deficiência energética e hormonal e a alteração na atividade das lipoforinas, que poderiam direta ou indiretamente reduzir o potencial reprodutivo destes insetos (KLOWDEN, 2013; CHAPMAN, 2013).

Embora pouco se saiba sobre a capacidade que as lectinas tem de interferir na oviposição ou eclosão dos ovos, muitos autores têm atribuído esta atividade às lectinas (MACEDO et al, 2007). Neste trabalho, houve redução significativa na eclosão de larvas em todos os tratamentos contendo GaBL em comparação ao controle (figura 18C).

Sabe-se que a função principal dos adultos é relacionada a reprodução e essa função depende da interação e integração de processos comportamentais e fisiológicos que estão correlacionados ao consumo, conversão e utilização do alimento. A produção de ovos depende do acúmulo de energia e nutrientes pela fêmea, o que faz com que elas precisem consumir mais e ganhar mais peso (PARRA et al, 2009). Algumas das hipóteses que podem ser levantadas a fim de justificar a redução na eclosão de larvas de *T. castaneum* com a utilização de *G. americana* considera a redução nos níveis de reserva energética e moléculas de importância no processo de reprodução e oviposição, tais como os TAG e o colesterol.

O potencial das lectinas enquanto molécula inseticida a ser utilizada nos sistemas de manejo de pragas tem sido cada vez estabelecido. Entre os mecanismos de ação associados a esta atividade das lectinas vegetais sugere-se a associação com estruturas glicosiladas presente nas membranas, em especial na membrana peritrófica que reveste o intestino dos insetos, provocando a desorganização da estrutura do epitélio da membrana peritrófica afetando assim a alimentação, por meio da redução da digestão e absorção dos nutrientes; interferência nas vias de sinalização e transporte, uma vez que tem muitas estruturas de transporte entre seus alvos-moleculares, como a lipoforina; e modulação de atividades enzimáticas que reflete diretamente na organização e eficiência do processo de digestão (LARGADA-DIAZ et al, 2016; LIMA et al, 2018; MACEDO et al, 2014; NAPOLEÃO et al, 2018; ROY;DAS, 2015; SPRAWKA et al, 2014).

As funções digestivas em insetos representam um modelo riquíssimo de informações tanto para a fisiologia e bioquímica de insetos, como para as técnicas de controle de pragas, que tem hoje o conhecimento sobre o sistema digestório dos insetos como um dos maiores métodos de desenvolvimento de novos inseticidas biorracionais. Esses agentes racionais permitem um controle seletivo, que tem como alvo características fisiológicas do inseto, e que preferencialmente não seja encontrada em plantas e mamíferos hospedeiros. Neste sentido, os componentes bioquímicos ou vias bioquímicas que apresentam características bem diferenciais em insetos são considerados bons alvos para isso (MACEDO et al, 2014; MOREIRA et al, 2012; SILVA et al, 2012).

No presente trabalho, algumas análises não apresentaram efeito dose-dependência, efeito que é bastante comum para a maioria dos agentes inseticidas conhecidos. No entanto, este é um mecanismo que pode ser justificado pelo potencial de resistência, cada vez mais observado entre os insetos. Entre os diferentes mecanismos que tem sido atribuído a resistência dos insetos às substancias inseticidas, quatro deles poderiam justificar a não dose-dependência apresentada. Primeiro, a alteração comportamental, que permite que o inseto evite o contato com o agente por reconhecer a presença dele no ambiente, o que pode ser observado a partir da análise do efeito deterrente do extrato, onde na maior dose (500mg), o inseto, mesmo com a oferta alimentar,

não consumiu a dieta. O segundo mecanismo, é a resistência metabólica, caracterizada pelo aumento na capacidade de metabolização dos agentes inseticidas, através ou de enzimas de detoxificação ou de microrganismos simbiotes que também são capazes de metabolizar e eliminar substâncias tóxicas. Neste trabalho, esta pode estar associada ao aumento nos níveis de proteínas apresentado em algumas concentrações (500mg do extrato; 500µg de GaBL), quando comparadas ao controle, mas que não pode ser confirmada pois não foram realizadas análises específicas a fim de identificar quais proteínas estão diferencialmente concentradas nos insetos. O terceiro é o fenômeno da saturação que é descrito por Dettner e colaboradores (1992). Segundo esses autores, devido ao volume geralmente pequeno de glândulas, inseticidas naturais ativos funcionam em concentrações particularmente baixas, principalmente se estiverem em uma mistura de compostos. Este fenômeno pode ter ocorrido, por exemplo, no ensaio de deterrência da lectina, onde a amostra mais concentrada, a 4mg, apresentou deterrência fraca comparada com concentrações menores, onde houve deterrência moderada. O quarto mecanismo, é a redução na penetração cuticular, por meio da modificação da composição molecular que pode interferir nos alvos moleculares dos inseticidas nos insetos em avaliação. Este mecanismo não pode ser relacionado, ou observado neste trabalho (BOSHE; WELTE, 2016; BOYER et al, 2012; LORINI; BECKEL, 2002; MOREIRA et al, 2012; ZHU et al, 2010).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho, o extrato aquoso, a fração proteica e a lectina isolada da casca de *Genipa americana* foram avaliadas quanto ao seu potencial inseticida contra adultos de *Tribolium castaneum*.

A análise fitoquímica mostrou que no extrato foram encontrados taninos, saponinas e esteroides. Já na fração, não foi encontrado nenhum componente característico do metabolismo secundário das plantas, mas elevado conteúdo protéico, incluindo a lectina GaBL.

Os resultados com os bioensaios mostram que o extrato apresentou maior atividade inseticida contra *T. castaneum* mantido na concentração de 250mg/g. O extrato também apresentou relevante efeito deterrente e interferência nos parâmetros nutricionais e bioquímicos demonstrados pela redução do consumo alimentar e ineficiência na conversão de alimento, ocasionando perda de biomassa.

A fração 20%, também exerceu efeito inseticida em *T. castaneum* nas concentrações de 50 e 100mg/g. Diferente do extrato, não foi observado efeito deterrente em decorrência da dieta contendo a fração 20%. Entretanto, mesmo consumindo de forma satisfatória o alimento, os insetos não conseguiram converter este em biomassa, e em reservas energéticas.

A lectina isolada (GaBL) é um dos princípios ativos da ação inseticida. Além disso, houve consideráveis efeitos deterrentes e sobre todos os parâmetros nutricionais e bioquímicos analisados.

Todas as preparações avaliadas (extrato, fração e GaBL) mostraram efeito sobre a capacidade reprodutiva (redução na eclosão de ovos), tendo a fração reduzido a zero o número de novos insetos gerados em alguns tratamentos, constituindo assim biomateriais de elevado potencial como método alternativo para o controle de insetos-praga.

Este é o primeiro relato de investigação do potencial inseticida de cascas de *G. americana* contra *T. castaneum* e um dos primeiros trabalhos a abordar o uso de frações proteicas pré-purificadas como agente inseticida.

7. PRODUÇÕES CIENTÍFICAS

- ✓ Apresentação de trabalho na forma de banner durante a XIV Reunião regional da SBBq realizada em Salvador em 2018. (Anexo A)
- ✓ Prêmio SBBq de melhores cartazes apresentados durante a XIV Reunião regional da SBBq realizada em Salvador em 2018. (Anexo B)
- ✓ Patente oriunda da atividade inseticida de GaBL sobre *T. castaneum* depositada no INPI (BR 10 2020 005977 7). (Anexo C)
- ✓ Artigo submetido ao periódico Industrial Crops and Products intitulado: “Biototoxicity of aqueous extract of *Genipa americana* bark on red flour beetle *Tribolium castaneum* (Herbst)”.
- ✓ Participação como co-inventora de duas patentes depositadas no INPI (BR 10 2019 017475 7 e BR 10 2020 006006 6). (Anexos D e E)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRA-NETO AC, NAPOLEÃO TH, PONTUAL EV, SANTOS NDL, LUZ LA, OLIVEIRACMF et al., **Effect of *Moringa oleifera* lectins on survival and enzyme activities of *Aedes aegypti* larvae susceptible and resistant to organophosphate.** Parasitol Res 113:175–184. 2014.

AHMAD, P., ASHRAF, M., YOUNIS, M., Hu, X., KUMAR, A., AKRAM, N.A., AL-QURAINY, F. **Role of transgenic plants in agriculture and biopharming.** Biotechnol. Adv. 30, 524–540. 2012.

ALAGARSAMY, S.; CHELLAPPAN, P.; JESURAJ, M.T.; MOHAN, M.S.G.; BALAKRISHNAN, R. Phytochemical analysis and antioxidant potential of the crude extract of *Allium oschaninii* scap. **Oriental Pharmacy and Experimental Medicine.** <https://doi.org/10.1007/s13596-018-0339-5>. 2018.

ALVES, J.S.F., de MEDEIROS, L.A., FERNANDEZ-PEDROSA, M.F., ARAÚJO, R.M., ZUCOLOTO, S.M. **Iridoids from leaf extract of *Genipa americana*.** Rev. Bras. Farmacogn. 2017.

ANDRADE, S.A.C. et al. **Evaluation of water and sucrose effective diffusion coefficients during osmotic dehydration of jenipapo (*Genipa americana* L.).** Journal of Food Engineering, v. 78 n. 2, p.551-555, 2007.

ARRESE, E.L., CANAVOSO, L.E., JOUNI, Z.E., PENNINGTON, J.E., TSUCHIDA, K., WELLS, M.A. **Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions.** Insect Biochem. Mol. Biol. 31, 7-17. 2001.

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.

BACCI, L., ROSADO, J.F., Picanço, M.C., PEREIRA, E.J.G., SILVA, G.A., MARTINS, J.C. **Concentration-mortality RESPONSES of *Myzus persicae* and natural enemies to selected insecticides.** J. Environ. Sci. Heal. Part A 47, 1930–1937. 2012.

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

- BEHMER, S.; S. SIMPSON; D. RAUBENHEIMER. **Herbivore foraging in chemically heterogeneous environments: nutrients and secondary metabolites.** *Ecology* 83:2489-2501. 2002.
- BELCHOL, F.S.; TEIXEIRA, I.R.V. **Preferência alimentar, performance e aceitabilidade de *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) na farinha de soja integral.** 2007. Disponível em: http://www.revistaanalytica.com.br/analytica/ed_anteriores/28/art01.pdf Acesso em: 09 Out. 2019.
- BELL, C.H. **A review of insect responses to variations encountered in the managed storage environment.** *Journal of Stored Products Research* 59. 260-274. 2014.
- BERNARDI, D.; RIBEIRO, L.; ANDREAZZA, F.; NIETZKE, C.; OLIVEIRA, E. E.; BOTTON, M.; NAVA, D.E.; VENDRAMIM, J. D. **Potential use of *Annona* by products to control *Drosophila suzukii* and toxicity to its parasitoid *Trichopria anastrephae*.** *Industrial Crops & Products*. 2017.
- BOSSOU, A. D.; AHOUSSE, E.; RUYSSBERGH, E.; ADAMS, A.; SMAGGHE, G.; DE KIMPE, N.; AVLESSI, F.; SOHOUNHLOUE, D.C.K.; MANGELINCKX, S. **Characterization of volatile compounds from three *Cymbopogon* species and *Eucalyptus citriodora* from Benin and their insecticidal activities against *Tribolium castaneum*.** *Industrial Crops and Products* 76, 306–317. 2015.
- BOIÇA JÚNIOR, A.L.; SOUZA, B.H.S.; LOPES, G.S.; COSTA, E.N.; MORAES, R.F.O.; EDUARDO, W.I. **Atualidades em resistência de plantas a insetos.** In: BUSOLI, A.C.; ALENCAR, J.R.D.C.C.; FRAGA, D.F.; SOUZA, L.A.; SOUZA, B.H.S.; GRIGOLLI, J.F.J. (Eds.). *Tópicos em entomologia agrícola – VI*. Jaboticabal: Multipress, p.207-224. 2013.
- BORGES, J.C.M.; HADDI, K. OLIVEIRA, E.E.; ANDRADE, V.L.N.; MELO, T.S.; DIDONET, J.; CARVALHO, J.C.T.; CANGUSSU, A.S.; SOARES, I.M.; ASCENCIO, S.D.; RAPOSO, R.W.S.A. **Mosquiticidal and repellent potential of formulations containing wood residue extracts of a Neotropical plant, *Tabebuia heptaphylla*.** *Industrial Crops & Products* 129. 424–433. 2019.
- BOYER, S. ZHANG, H. LEMPÉRÈRE, G. **A review of control methods and resistance mechanisms in stored-product insects.** *Bulletin of Entomological Research*. 102, 213–22. 2012.

BOHLMANN, J. **Insect-Induced Terpenoid Defenses in Spruce**. In: Induced Plant Resistance to Herbivory, SCHALLER, A. *University of Hohenheim, Stuttgart, Germany* 2008.

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

BROWN SE, HOWARD A, KASPRZAK AB, GORDON KH, EAST, PD. **A peptidomics study reveals the impressive antimicrobial peptide arsenal of the wax moth *Galleria mellonella***. *Insect Biochem Mol Biol* 39:792–800. 2009.

BRUINSMA, M.; DICKE, M. **Herbivore-Induced Indirect Defense: From Induction Mechanisms to Community Ecology**. In: Induced Plant Resistance to Herbivory. SCHALLER, A. 2008.

BUSOLI, A.C.; ALENCAR, J.R.D.C.C.; FRAGA, D.F.; SOUZA, L.A.; SOUZA, B.H.S.; GRIGOLLI, J.F.J. (Eds.). **Tópicos em entomologia agrícola** – VI. Jaboticabal: Multipress. p.207-224. 2013.

BUSOLI, A.C.; NETTO, J.C.; VIANA, D.L.; AGUIRRE-GIL, O.J. SILVA, E.A.; RAINHO, H.L. **Manejo Integrado de Pragas: Pesquisas, avanços e desafios**. In: Tópicos em Entomologia Agrícola VII, BUSOLI et al. Jaboticabal, Sp. 2014.

CABALLERO-GALLARDO, K.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. E. **Repellent Activity of Essential Oils and Some of Their Individual Constituents against *Tribolium castaneum* Herbst**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59, 1690–1696. 2010.

CAMACHO, N.N. **Expressão heteróloga da lectina de *Bauhinia forficata* Link em *Escherichia coli* e efeito sobre linhagens celulares tumorais**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas, 2007.

CAMAROTI, J. R. S. L.; OLIVEIRA, A. P. S.; PAIVA, P. M. G.; PONTUAL, E. V.; NAPOLEÃO, T. H. **Phytoinsecticides for controlling pests and mosquito vectors of diseases**. In: Victor Green. (Org.). *Biocontrol Agents: Types, Applications and Research Insights*. 1ed. New York: Nova Science Publishers, p. 147-188. 2017.

CAMAROTI, J. R. S. L.; ALMEIDA, W. A.; BELMONTE, B. R.; OLIVEIRA, A. P. S.; LIMA, T. A. L.; FERREIRA, M. R. A; PAIVA, P. M. G.; SOARES, L. A. L.; PONTUAL, E. V.; NAPOLEÃO, T. H.; **Sitophilus zeamais adults have**

survival and nutrition affected by *Schinus terebinthifolius* leaf extract and its lectin (SteLL). *Industrial Crops and Products*, v. 116. p. 81–89. 2018.

CAMPANHOLA, C. **Resistência de Insetos a Inseticidas: Importância, Características e Manejo.** Jaguariúna, EMBRAPA. 45p. 1990.

CARLINI, C.R., GROSSI-DE-SÁ, M.F. **Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides.** *Toxicon* 40, 1515–1539. 2002

CARVALHO. M.G.; MELO, A.G.N.; ARAGÃO, C.F.S.; RAFFIN, F.N. MOURA, T.F.A.L. ***Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity.** *Revista Brasileira de Plantas Medicinaiis*. Botucatu, v.15, n.1, p.158-169, 2013.

CEJA-NAVARRO, J.A.; VEGA, F.E.; KARAOZ, U.; HAO, Z.; JENKINS, S. Et al., **Gut microbiota mediate caffeine detoxification in the primary insect pest of coffee.** *Nature communications*. v 6, 7618. 2015.

CERUTI, F.C. **Interações entre feromônios de insetos e Semioquímicos de plantas.** *Rev. Acad.*, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 73-82. 2007.

CÉSPEDES, C.L., TORRES, P., MARIN, J.C., ARCINIEGAS, A., DE VIAR, A.R., PÉREZ-CASTORENA, A.L., ARANDA, E. **Insect growth inhibitor by tocotrienols and hydroquinones from *Roldana barba johannis*.** *Phytochemistry* 65, 1963–1975. 2004.

CHANDLER, D.; BAILEY, A.S.; TATCHELL, G. M.; DAVIDSON, G.; GREAVES, J.; GRANT, W. P. **The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management.** *Philosophical transactions of the royal society*. 366, 1987-1998. 2011.

CHAPMAN, R. F. **The insects: structure and function.** 5th edition. ISBN 978-0-521-11389-2. 961 p. 2013.

CHAPMAN & HALL, **Biology of the Insect Midgut.** 1ª edição, -6 Boundary Row, London SE1 8HN, UK 1986.

CHEN, M.S. **Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review.** *Insect Science*. 15, 101-11. 2008.

CHOWN, S. L. NICOLSON, S. W. **Insect Physiological Ecology.** Oxford University Press. 2004.

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

COELHO, Juliene S.; SANTOS, N.D.L.; NAPOLEÃO, T.H.; GOMES, F.S.; FERREIRA, R.S.; ZINGALI, R.B.; COELHO, L.C.B.B.; LEITE, S.P.; NAVARRO, D.M.A.F.; PAIVA, P.M.G. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. **Chemosphere**, v. 77, n. 7, p. 934-938, 2009.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. V.1, n.1. Brasília. 2013.

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

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

DANG, L.; VAN DAMME, E.J.M. **Review: Toxic proteins in plants.** Phytochemistry 117. 51–64. 2015.

DA SILVA, A. P.; LIMA, C.L.C.; VIEITES, R.L. **Caracterização química e física do jenipapo (*Genipa americana* L.) armazenado.** Scientia Agricola, v. 55, n. 1, p. 29-34, 1998.

DISSANAYAKA, D.M.S.K.; SAMMANI, A.M.P.; WIJAYARATN L.K.W. **Food oils as kairomones for trapping *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) adults.** Journal of Stored Products Research 79 83 e 88. 2018.

DICKSON, L.; TENON, M.; SVILAR, L.; et al. **Main Human Urinary Metabolites after Genipap (*Genipa americana* L.) Juice Intake.** Nutrients, 10, 2018.

EDWARDS, P. J.; WRATTEN, S. D. **Ecologia das interações entre insetos e plantas.** Temas de Biologia, v. 27. São Paulo, EPU/EDUSP. 1981.

ELIMAM, A.M.; ELMALIK, K.H.; ALI, F.S. **Larvicidal, adult emergence inhibition and oviposition deterrent effects of foliage extract from**

***Ricinus communis* L. against *Anopheles arabiensis* and *Culex quinquefasciatus* in Sudan.** Trop Biomed 26:130–139. 2009.

FARONI, L.R.A.; SOUSA, A.H. **Aspectos biológicos e taxonômicos dos principais insetos-praga de produtos armazenados.** In: ALMEIDA, F.A.C.; DUARTE, M.E.M.; MATA, M.E.R.M.C. (Ed.). Tecnologia de armazenagem em sementes. Campina Grande: UFCG. p.371-402. 2006.

FELTON, G.W.; GATEHOUSE, J.A. **Antinutritive plant defence mechanisms.** In: **Biology of the insect midgut.** Chapman & Hall, 2-6 Boundary Row, London SE1 8HN, UK. 1996.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Manual de Entomologia Agrícola Entomologia agrícola.** 3º ed., Piracicaba: FEALQ, 920p. 2002.

GATEHOUSE, A.M.R., POWELL, K.S., VAN DAMME, E.J.M., PEUMANS, W.J., GATEHOUSE, J.A. **Insecticidal properties of plant lectins: their potential in plant protection.** In: Pustzai, A., Bardocz, S. (Eds.), Lectins: Biomedical Perspectives. Taylor and Francis, London, pp. 35–58. 1995.

GOUVÊA, S.M.; CARVALHO, G. A.; FIDELIS, E. G.; RIBEIRO, A. V.; FARIAS, E. S.; PIKANÇO, M. C. **Effects of paracress (*Acmella oleracea*) extracts on the aphids *Myzus persicae* and *Lipaphis erysimi* and two natural enemies.** Industrial Crops & Products 128. 99–404. 2019.

GULLAN P.J.; CRANSTON P.S. **The Insects: An Outline of Entomology,** 4th edn. Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ. 2010.

GURU-PIRASANNA-PANDI G.; ADAK, T.; GOWDA, B.; PATIL, N.; ANNAMALAI, M.; JENA, M. **Toxicological effect of underutilized plant, *Cleistanthus collinus* leaf extracts against two major stored grain pests, the rice weevil, *Sitophilus oryzae* and red flour beetle, *Tribolium castaneum*.** Ecotoxicology and Environmental Safety Volume 154, 15 June, Pages 92-99. 2018.

HANSEN, L.S. **Potential for widespread application of biological control of stored- product pests – the European perspective.** Journal of Stored Products Research 43, 312-313. 2007.

HARBORNE, J.B., **The Flavonoids: Advances in Research since 1980.** Chapman & Hall, London. 1988.

HARTMANN, T.; OBER, D. **Defense by Pyrrolizidine Alkaloids: Developed by Plants and Recruited by Insects.** In: Induced Plant Resistance to Herbivory. SCHALLER, A. 2008.

HEGEDUS D.; ERLANDSON M.; GILLOTT C.; TOPRAK U, **New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function.** Annu Rev Entomol 54:285–302. 2009.

HO, S.H., WANG, J., SIM, K.Y., GWENDOLINE, C.L.E., IMIYABIR, Z., YAP, K.F., SHAARI, K., GOH, S.H. **Meliternatin: a feeding deterrent and larvicidal polyoxygenated flavone from Melicope subunifoliolata.** Phytochemistry 62, 1121–1124. 2003.

HOWE GA; SCHALLER A. **Direct Defenses in plants and their induction by wounding and insect herbivores.** In: Induced plant resistance to herbivory: Springer, Science., pp 7- 30. 2008.

HU, J. WANG, W.; DAI, J.; ZHU, L. **Chemical composition and biological activity against *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) of *Artemisia brachyloba* essential oil.** Industrial Crops & Products 128. 29–37. 2019.

IMENES, S. L.; IDE, S. **PRINCIPAIS GRUPOS DE INSETOS PRAGAS EM PLANTAS DE INTERESSE ECONÔMICO.** Biológico, São Paulo, v.64, n.2, p.235-238, jul./dez., 2002.

ISMAN, M.B. **Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world.** Annual. Review of Entomology. 51:45–66. 2006.

ISMAN, M. B. **A renaissance for botanical insecticides?** Pest Manag Sci; 71: 1587–1590. 2015.

ISMAN, M. B.; GRIENEISEN, M. L. **Botanical insecticide research: many publications, limited useful data.** Trends in Plant Science 1–6. 2013.

ISMAN, M.B. **Bridging the gap: Moving botanical insecticides from the laboratory to the farm.** Industrial Crops and Products Volume 110, 30, 10-14. 2017.

JADON, R.; DIXIT, S. **Phytochemical extraction and antimicrobial activity of some medicinal plants on different microbial strains.** Journal of

Medicinal Plants Studies. Vol. 2. n. 3. 2014.

JONGSMA, M.; BEEKWILDER, Jules. **Plant Protease Inhibitors: Functional Evolution for Defense**. In: **Induces plant resistance to herbivory**. 10.1007/978-1-4020-8182-8_11. 2008.

KARANIKA, C.; RUMBOS, C. I.; AGRAFIOTI, P.; ATHANASSIOU, C.G; **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 Volume 80, January, Pages 41-49. 2019.

KERKUT, G.A., GILBERT, L.I. (Eds.). **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. Pergamon Press, New York, pp. 165–203. 1985.

KESSLER, A.; BALDWIN, I. T. PLANT RESPONSES TO INSECT HERBIVORY: The Emerging Molecular Analysis. Annu. Rev. Plant Biol. 53:299–328. 2002.

KHAN, I., PRAKASH, A., AGASHE, D. **Divergent immune priming responses across flour beetle life stages and populations**. Ecology and Evolution. 1– 9. 2016.

KHATER, H.F. Perspectivas de Biopesticidas Botânicos no Manejo de Pragas de Insetos. Pharmacologia, v, 3. 2012.

KIRAN, S.; PRAKASH, B. **Toxicity and biochemical efficacy of chemically characterized *Rosmarinus officinalis* essential oil against *Sitophilus oryzae* and *Oryzaephilus surinamensis***. Industrial Crops and Products 74. 817–823. 2015.

KITUTA, S. **Response of *Tribolium castaneum* to dietary mannitol, with remarks on its possible nutritive effects**. PLoS One, v. 13 (11). 2018.

KLOWDEN, M. **Physiological systems in insects**. 2^aed. SBN-13: 978-0-12-369493-5. 2007.

KLOWDEN, M. **Physiological systems in insects**. 3^aed. ISBN: 978-0-12-415819-1. 2013.

KUMAR, S. **Biopesticides: a need for food and environmental safety**. J Biofertil Biopestici 3: e107. 2012.

KUMAR, D.; KALITA, P. **Reducing Postharvest Losses during Storage of Grain Crops to Strengthen Food Security in Developing Countries.** Foods, 6, 8. 2017.

KUMAR, S. SINGH, A. **Biopesticides for Integrated Crop Management: Environmental and Regulatory Aspects.** Journal Biofertilizers and Biopesticides. v 5:1. 2014.

LAZZARI, S.M.N; LAZZARI, F.A. Insetos-praga de grãos armazenados. In: PANIZZI, A.R; PARRA, J.R. **Biecologia e nutrição de insetos: Base para o manejo integrado de pragas.** 1.ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p.667 – 721. 2009.

LEELAJA, B.C., RAJASHEKAR, Y., RAJENDRAN, S. Detection of eggs of stored-product insects in flour with staining techniques. Journal of Stored Products Research. V. 43, 206 – 210. 2007.

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

LIS, H.; SHARON, N. **Biological properties of lectins.** In: Liener, I.E., Sharon, N., Goldstein, I. (Eds.), The Lectins. Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine. Academic Press, New York, pp. 266–293. 1986.

LORINI, I. **Manejo integrado de pragas de grãos armazenados.** Passo Fundo: Embrapa Trigo,. 4 p. (Embrapa Trigo. Comunicado técnico, 17). 2000.

LORINI, I.; BECKEL, H.; **Mecanismos de Resistência das Pragas de Grãos Armazenados.** Documento Online Nº 13 (Parte 2) Publicações - Embrapa Trigo. 2002.

LORINI, I.; LINCON, H. M.; VILDES, M. S. **Armazenamento de grãos.** IBG, Campinas SP, 2002.

LORINI, I. **Manejo integrado de pragas de grãos de cereais armazenados.** Passo Fundo: Embrapa Trigo, 72 p. 2008.

LORINI, I.; KRZYZANOWSKI, F. C.; FRANÇA-NETO, J. B.; HENNING, A. A.; HENNING, F. A. **Manejo Integrado de Pragas de Grãos e Sementes Armazenadas.** Embrapa. Brasília, DF. 2015.

LORENZI, H. **Arvores brasileiras: manual de identificacao e cultivo de plantas arboreas do Brasil**. 2.ed. Nova Odessa: Plantarum. 2v. ISBN do v.2 – 8586714070. 1998.

LIMA TA, FERNANDES KM, OLIVEIRA APS, DORNELLES LP, MARTINS GF, NAPOLEÃO TH et al., **Termiticidal lectins from *Myracrodruon urundeuva* (Anacardiaceae) cause midgut damages when ingested by *Nasutitermes corniger* (Isoptera; Termitidae) workers**. Pest Manag Sci 73:991–998. 2017.

LIU, Z.L.; CAO, J.; ZHANG, H.M.; LIN, L.L. et al., **Feeding Deterrents from *Aconitum episcopale* Roots against the Red Flour Beetle, *Tribolium castaneum***. J. Agric. Food Chem., 59, 3701–370. 2011.

LIU, T. X.; XU, H.H.; LUO, W.C. **Opportunities and potentials of botanical extracts and products for management of insect pests in cruciferous vegetables**. Naturally Occurring Bioactive Compounds. Cap. 08. 2006.

LIU, S.M., LI, J., ZHU, J.Q., WANG, X.W., WANG, C.S., LIU, S.S., CHEN, X.X., LI, S. **Transgenic plants expressing the AaIT/GNA fusion protein show increased resistance and toxicity to both chewing and sucking pests**. Insect Sci. 2015.

LUNDSTRÖM, N. L.P.; ZHANG, Hong; BRÄNNSTRÖM, Ake. **Pareto-efficient biological pest control enable high efficacy at small costs**. Ecological Modelling 364, 89–97. 2017.

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

MACEDO, M.L.R.; OLIVEIRA, C.F.R.; COSTA, O.M.; CASTELHANO, E.C.; SILVA-FILHO, M.C. **Adaptive Mechanisms of Insect Pests Against Plant Protease Inhibitors and Future Prospects Related to Crop Protection: A Review**. Protein & Peptide Letters, 22, 149-163. 2015.

MARDANI-TALAEI, M.; ZIBAEI, A.; ABEDI, Z.; GOLIZADEH, A. **Digestion and protein metabolism of *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae) fed on different barley varieties**. Journal of Stored Products Research 73, 37e 41. 2017.

MARTINS, D.; NUNEZ, C. **Secondary Metabolites from Rubiaceae Species**. *Molecules*, 20, 13422–13495. 2015.

MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza. UFC. 1988.

MELO, E. A. **Árvores do Brasil: *Genipa americana* L.** Disponível em: <http://www.arvores.brasil.nom.br/new/jenipapo/index.htm>. Acesso em: 15 de março de 2019.

MIRESMAILLI, S.; ISMAN, M.B. **Botanical insecticides inspired by plant–herbivore chemical interactions**. *Trends in Plant Science* January, Vol. 19, No. 1. 2014.

MOHAPATRA, D. KAR, A. GIRI, S.K. **Insect Pest Management in Stored Pulses: an Overview**. *Food Bioprocess Technol*, 8:239–265. 2015.

MOREIRA, M.D.; PICANÇO, M.C; ÉZIO, M. da S.; MORENO, S. C.; MARTINS, J. **USO DE INSETICIDAS BOTÂNICOS NO CONTROLE DE PRAGAS**. In M. Venzon, Paula Júnior, T. J. and A. Pallini (Eds.), **Controle alternativo de pragas e doenças** (p. 89). Viçosa: EPAMIG/CTZM. 2006.

MOREIRA, M;F.; MANSUR, J.F.; MANSUR, J.F. **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, S.M. S.; SOUSA, S.R.S.; JÚNIOR, A.M.C. ***Genipa americana* L.: prospecção tecnológica**. *Jornal Interdisciplinar de Biociências*, v.1, n.2, 31-35. 2016.

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

NAPOLEÃO, T. H., DO REGO BELMONTE, B., PONTUAL, E. V., DE ALBUQUERQUE, L. P., SÁ, R. A., PAIVA, L. M., ... & PAIVA, P. M. G. **Deleterious effects of *Myracrodruon urundeuva* leaf extract and lectin on the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae)**. *Journal of stored products research*, 54, 26-33. 2013.

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

NÁTHIA-NEVES, G.; TARONE, A.G.; TOSI, M.M.; et al. **Extraction of bioactive compounds from genipap (*Genipa americana* L.) by pressurized ethanol: Iridoids, phenolic content and antioxidant activity.** *Food Research International* 102. 595–604. 2017.

NUNES, N. N. S.; FERREIRA, R. S.; SILVA-LUCCA, R. A.; AS, L. F. R.; OLIVEIRA, A. E. A.; CORREIA, M. T. dos S.; PAIVA, P. M. G.; WLODAWER A.; OLIVA, M. L.V. **Potential of the Lectin/Inhibitor Isolated from *Crataeva tapia* Bark (CrataBL) for Controlling *Callosobruchus maculatus* Larva Development.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 63, 10431-10436. 2015.

OLIVEIRA, C.F.R.; LUZ, L.A.; PAIVA, P.M.G.; COELHO, L.C.B.B.; MARANGONI, S.; MACEDO, M.L.R. **Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects.** *Process Biochem.*, 46, 498–504. 2011.

OLIVEIRA, J.F.C. **LECTINAS VEGETAIS: DE MOLÉCULAS DE DEFESA DE PLANTAS ÀS SUAS DIVERSAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS.** 62f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2018.

OLIVEIRA CFR, MOURA MC, NAPOLEÃO TH, PAIVA PMG, COELHO LCBB.; MACEDO MLR, **A chitin-binding lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) impairs digestive physiology of the Mediterranean flour larvae, *Anagasta kuehniella*.** *Pest Biochem Physiol* 142:67–76. 2017.

OMAR, S.; MARCOTTE, M.; FIELDS, P.; SANCHEZ, P. E.; POVEDA, L.; MATA, R.; JIMENEZ, A.; DURST, T.; ZHANG, J.; MACKINNON, S.; LEAMAN, D.; ARNASON, J. T.; PHILOGENE, B. J. R.. **Antifeedant activities of terpenoids isolated from tropical Rutales** *J. Stored Prod. Res.*, 43, 92–96. 2007.

ONO, M.; ISHIMATSU, N.; MASUOKA, C.; YOSHIMITSU, H.; TSUCHIHASHI, R.; OKAWA, M.; KINJO, J.; IKEDA, T.; NOHARA, T. **Three new monoterpenoids from the fruit of *Genipa americana*.** *Chem. Pharm. Bull.*, 55, 632–634. 2007.

OSTERNE, V. J. S. **Estudos de estrutura-função da lectina de sementes de *Canavalia virosa* com atividade inflamatória e citotóxica: uma potencial ferramenta anticâncer**. 93 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Recursos Naturais) – Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Universidade Federal do Ceará, 2016.

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

PAIVA, P. M.G.; NAPOLEÃO, T. H.; SÁ, R.; COELHO, L. C.B. B. **Insecticide Activity of Lectins and secondary Metabolites**. In Insecticides – Advances in Integrated Pest Management. Capítulo 25. 2011.

PAIVA, P.M.G., PONTUAL, E.V., NAPOLEÃO, T.H., COELHO, L.C.B.B., **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, pp. 37e55. 2012.

PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. **Bioecologia e nutrição de insetos: base para o manejo integrado de pragas**. In: Bioecologia e nutrição de insetos: base para o manejo integrado de pragas. 1163p. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Londrina: Embrapa Soja, 2009.

PANIZZI, AR, AGOSTINETTO, A., LUCINI, T., SMANIOTTO, LF e PEREIRA, PRVS,. **Manejo integrado dos percevejos da barriga-verde, *Dichelops spp. em trigo***. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 40 p. Doc, não. 114. 2015.

PARRA, J.R.P. PANIZZI, A.R. HADDAD, M.L. **Índices nutricionais para medir consumo e utilização de alimentos por insetos**. In: Bioecologia e nutrição de insetos: base para o manejo integrado de pragas. 1163p. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Londrina: Embrapa Soja, 2009.

PAVELA, R. **Acaricidal properties of extracts and major furanochromenes from the seeds of *Ammi visnaga* Linn. against *Tetranychus urticae* Koch**. Industrial Crops and Products 67. 108–113. 2015.

PEUMANS, W.J., VAN DAMME, E.J.M. **Lectins as plant defense proteins**. Plant Physiol. 109, 347–352. 1995.

PICANÇO, M.C. **Manejo integrado de pragas**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa –MG. 146p. 2010.

PIGMATI, W.A.; LIMA, F.A.N.S.; LARA, S. S.; CORREA, M.L.M.; BARBOSA, J.R.; LEÃO, L.H.C. **Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde.** *Ciência & Saúde Coletiva*, 22(10):3281-3293, 2017.

PIMENTEL, A.C.; BARROSO, I. G.; FERREIRA, J.M.J.; DIAS, R.O.; FERREIRA, C.; TERRA, W.R. Molecular machinery of starch digestion and glucose absorption along the midgut of *Musca domestica*. *Journal of Insect Physiology* (2018), doi: <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2018.05.009>

PINTO, M.S.T.; RIBEIRO, J.M.; OLIVEIRA, E.A.G. **O estudo de genes e proteínas de defesa em plantas.** *R. bras. Bioci.*, Porto Alegre, v. 9, n. 2, p. 241-248, abr./jun. 2011.

PRANAVI, S.; PRASAD, M.S.K.; LAKSHMIPATHI, V. **Complete study of life cycle of *tribolium castaneum* and its weight variations in the developing stages.** *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences* Page: 95 Volume-6, Issue-2, pag. 95-100. 2016.

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

RAJENDRAN, S.; SRIRANJINI, V. **Review Plant products as fumigants for stored-product insect control.** *Journal of Stored Products Research* 44. 126–135. 2008.

REYES-MONTAÑO, E. A.; VEGA-CASTRO, N. A. **Plant Lectins with Insecticidal and Insectistatic Activities.** In: *Insecticides - Agriculture and Toxicology.* IntechOpen: Londres, Reino Unido. 2018.

ROSSI, G.D.; SANTOS, C.D.; CARVALHO, G.A.; ALVES, D.S.; PEREIRA, L.L.S.; CARVALHO, G.A. **Biochemical Analysis of a *Castor Bean* Leaf Extract and its Insecticidal Effects Against *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae).** *Neotrop Entomol.* 41:503–509. 2012.

ROY, A.; DAS, S. **Molecular Mechanism Underlying the Entomotoxic Effect of *Colocasia esculenta* Tuber Agglutinin against *Dysdercus cingulatus*.** *Insects*, 6, 827- 846. 2015.

SALLES, H. O.; BRAGA, A. C. L.; NASCIMENTO, T. S. C. et al. **Lectin, hemolysin and protease inhibitors in seed fractions with ovicidal activity**

against Haemonchus contortus. Braz. J. Vet. Parasitol., Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 136-143, abr.-jun. 2014.

SAMANTA, P.; DE, S. **Study on the Antibacterial, Antioxidant Activities and Phytochemical Analysis of Medicinal Plants in West-Bengal, India.**

International Journal Current Microbiology Applied Sciences. 4(10): 116-123. 2015.

SANTOS, A. F. S.; DA SILVA, M. D. C.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G.; CORREIA, M. T. S. COELHO, C. B. B. **Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications.** Current topics in Peptide & Protein Reseach. Vol. 15, 2014.

SARWAR, M. **Information on Activities Regarding Biochemical Pesticides: An Ecological Friendly Plant Protection against Insects.** International Journal of Engineering and Advanced Research Technology (IJEART) Volume-1, Issue-2, August 2015

SÃO JOÃO, R. E. RAGA, A. **Mecanismos de defesa das plantas contra o ataque de insetos sugadores.** Instituto Biológico. Documento técnico, p.1-13.2016.

SAUVION, N., CHARLES, H., FEBVAY, G., RAHBÉ, Y. **Effects of jackbean lectin (ConA) on the feeding behavior and kinetics of intoxication of the pea aphid, Acyrthosiphon pisum.** Entomol. Exp. Appl. 10, 34–44. 2004.

SILVA, A. P.; LIMA, C.L.C.; VIEITES, R.L. **CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E FÍSICA DO JENIPAPO (*Genipa americana* L.) ARMAZENADO.** Scientia Agrícola, vol. 55. n. 1. Piracicaba Jan./Apr. 1998.

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

SIMMONDS, M.S.J. **Flavonoid insect-interactions: recent advances in our knowledge.** Phytochemistry, New York, v.64, p.21-30, 2003.

SCHÖLLER, M. **Biological control of stored-product insects in commodities, food processing facilities and museums.** Julius-Kühn-Archiv, 425, 2010

SCHOONHOVEN, L.M.; VAN LOON, J.J.A.; DICKE, M. **Insect-plant biology.** 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 421p, 2005.

SCHMUTTERER, H. **Properties and potentials of natural pesticides from neem tree**. Annu. Rev. Entomol. 35, 271–298. 1990.
doi:10.1146/annurev.en.35.010190.001415)

SEIFI, R.; MOHARRAMIPOUR, S.; AYYARI, M. **Acaricidal activity of different fractions of *Moringa peregrina* on two spotted spider mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae)**. Industrial Crops & Products 125. 616–621. 2018.

SHARMA HC.; NORRIS DM. **Chemical basis of resistance in soybean to cabbage looper, *Trichoplusia ni***. J. Sci. Food. Agric. 55: 353-364. 1991.

SHANTIBALA, T.; LOKESHWARI, R.; DEBARAJ, H. **Nutritional and Antinutritional Composition of the Five Species of Aquatic Edible Insects Consumed in Manipur, India**. Journal of insect science (Online). 14. 14. 10.1093/jis/14.1.14. 2014.

SOETAN, K.O. **Pharmacological and other beneficial effects of antinutritional factors in plants - A review**. African Journal of Biotechnology Vol. 7 (25), pp. 4713-4721, 29 December, 2008.

SOUSA G.; CONTE H, **Midgut morphophysiology in *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera: Curculionidae)**. Micron 51:1–8 2013.

SOUZA, R.O.S.; SOUSA, P.L.; MENEZES, R.R.P.P.B.; SAMPAIO, T.L.; TESSAROLO, L.D.; SILVA, F.C.O.; PEREIRA, M.G.; MARTINS, A.M.C. **Trypanocidal activity of polysaccharide extract from *Genipa americana* leaves**. Journal of Ethnopharmacology 210, 311–317. 2018.

SPARKS, T.C.; NAUEN R. **IRAC: mode of action classification and insecticide resistance management**. Pestic Biochem Physiol.121:122–128. 2015.

SPARKS, T. C.; LORBASCH, B. A.; **Perspectives on the agrochemical industry and agrochemical Discovery**. Pest Manag Sci; 73: 672–67. 2017.

STEFANAZZI, N., STADLER, T., FERRERO, A. **Composition and toxic, repellent and feeding deterrent activity of essential oils against the stored-grain pests *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae)**. Pest Manage. Sci. 67, 639–646. 2011.

- TAJNE, S.; BODDUPALLY, D.; SADUMPATI, V.; VUDEM, D.R.; KHAREEDU, V. R. **Synthetic fusion-protein containing domains of Bt Cry1Ac and Allium sativum lectin (ASAL) conferred enhanced insecticidal activity against major lepidopteran pests.** Journal of Biotechnology 171. 71–75. 2014.
- TERRA W.R.; FERREIRA C. **Digestive system, in Encyclopedia of Insects,** 2nd edn, ed. by Resh VH and Cardé RT. Academic Press, San Diego, CA, pp. 273–281. 2009.
- VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. **Plant Lectin: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles.** Cr Rev Plant Sci, v. 17, p. 575-692, 1998.
- VAN DAMME, E.J.M. **History of plant lectin research.** In: Hirabayashi, J. (Ed.), Lectins: methods and protocols. Springer, New York, pp. 3–13. 2014.
- VANDENBORRE, G.; SMAGGHE, G.; DAMME, E. J. M. Van. **Phytochemistry Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects.** Phytochemistry, v. 72, n. 13, p. 1538–1550, 2011.
- VAN DRIESSCHE, E., FISCHER, J., BEECKMANS, S., BOG-HANSE, T.C. **Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry, Textop,** Denmark, vol. 11. 1996.
- XIE Y. S.; FIILDS P. G.; ISMAN M. B. **Repellency and toxicity of azadirachtin and neem to three store- product beetles.** Journal of Economic Entomology (in press), 1996.
- 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.
- ZAKIR, Ali. **INDUCIBLE DEFENSES IN HERBIVORE-PLANT INTERACTIONS: FUNCTIONS MECHANISMS AND MANIPULATIONS.** Swedish University of Agricultural Sciences Alnarp, June 2011
- ZHU, F.; PARTHASARATHY, R.; BAI, H.; WOITHE, K.; KAUSSMANN, M.; NAUEN, R. HARRISON, D.A. PALLI, S.R. **A brain-specific cytochrome P450 responsible for the majority of deltamethrin resistance in the QTC279 strain of *Tribolium castaneum*.** Proc Natl Acad Sci U S A. 11;107(19):8557-62. 2010.

ANEXO A – produção referente à tese

Apresentação de trabalho na forma de banner durante a XIV Reunião regional da SBBq realizada em Salvador em 2018.



XIV
REUNIÃO

by Sociedade Brasileira de Bioquímica
e Biologia Molecular – SBBq

REGIONAL

SBBQ

22 A 25 DE NOVEMBRO

SALVADOR - BA

Certificado

**Certificamos que CAMILA PEREIRA DE LIMA CHICUTA
apresentou o trabalho intitulado: EVALUATION OF THE
DETERRENT ACTIVITY OF THE GENIPA AMERICANA BARK
EXTRACT AGAINST TRIBOLIUM CASTANEUM de autoria de
CHICUTA, C. P. L., LIMA, J. K. A., SANTOS, M. L. S., COSTA, R. B.,
BARROS, A. C. A., GRILLO, L. A. M., GOMES, F. S. durante a 14^a
Reunião Regional da SBBq 2018, realizada em Salvador, Bahia, no
período de 22 a 25 de novembro de 2018.**

Salvador, 25 de novembro de 2018.

Ramon dos Santos El-Bachá

Presidente do Comitê Organizador da XIV Reunião Regional da SBBq

ANEXO B - produção referente à tese

Prêmio SBBq de melhores cartazes apresentados durante a XIV Reunião regional da SBBq realizada em Salvador em 2018.




Certificado

Certificamos que o trabalho intitulado: **Evaluation of the Deterrent Activity of the Genipa americana Bark Extract Against Tribolium castaneum – (P-028)**

Autores: **Chicuta, C. P. L. ¹, Lima, J. K. A. ¹, Santos, M. L. S. ¹, Costa, R. B. ¹, Barros, A. C. A. ¹, Gomes, F. S. ¹, Grillo, L. A. M. ¹**

Recebeu o “Prêmio SBBQ” de melhores cartazes apresentados durante a XIV Reunião Regional da SBBQ, realizada em Salvador, Bahia, no período de 22 a 25 de novembro de 2018.

Salvador, 25 de novembro de 2018



Ramon dos Santos El-Bachá
Presidente do Comitê Organizador da XIV Reunião Regional da SBBQ

ANEXO C – produção referente à tese

Patente oriunda da atividade inseticida de GaBL sobre *T. castaneum* depositada no INPI (BR 10 2020 005977 7).



25/03/2020 870200039256
14:35

29409181917310845

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 005977 7

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24464109000148

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP: 57072-970

País: Brasil

Telefone: 82-3214-1064

Fax: 82-3214-1035

Email: nit@propep.ufal.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 25/03/2020 às 14:35, Petição 870200039256

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):** Lectina de cascas de jenipapo (*Genipa americana* L.) com atividade inseticida contra adultos do besouro *Tribolium castaneum* (Herbst 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae)**Resumo:** Estratégias de controle de insetos-praga de grãos armazenados são de interesse das indústrias agrícolas e alimentícias. O *Tribolium castaneum*, uma das mais relevantes, economicamente, pragas de produtos armazenados, tem apresentado alta resistência contra pesticidas sintéticos. Neste sentido, a busca por produtos botânicos que apresentem mecanismos de ação com menores efeitos residuais e baixa toxicidade aos demais animais têm aumentado consideravelmente. Entre esses, as moléculas oriundas do metabolismo das plantas que geram efeitos não tóxicos, em especial as proteínas, têm recebido maior atenção. A *Genipa americana* L., reconhecida devido a sua importância econômica e uso na culinária tradicional, não apresenta na literatura trabalhos que descrevam seu potencial inseticida a insetos da ordem coleóptera, e nenhum contra o *T. castaneum*. Assim, na presente invenção a lectina isolada de *G. americana* inibiu a alimentação dos insetos, além de interferir na sobrevivência e reprodução destes, quando inserida na dieta alimentar, tendo a concentração de 2mg reunido as melhores características. Isso sugere que a lectina de *G. americana* é uma importante molécula para o controle de *T. castaneum* seja por meio da incorporação em iscas tóxicas, ou aplicação em técnicas de recombinação gênica para melhoramento genético de plantas.**Figura a publicar:** 1

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 25/03/2020 às 14:35, Petição 870200039256

ANEXO D – produção não referente à tese

Preparações com atividade inseticida contra insetos adultos do besouro
***Tribolium castaneum* (Herbst 1797) (Coleoptera:**
Tenebrionidae)



22/08/2019 870190081780
11:03
29409181907682014

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2019 017475 7

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24464109000148

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP: 57072-970

País: Brasil

Telefone: 82-3214-1064

Fax: 82-3214-1035

Email: nit@propep.ufal.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 22/08/2019 às 11:03, Petição 870190081780

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):** Preparações com atividade inseticida contra insetos adultos do besouro *Tribolium castaneum* (Herbst 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae)**Resumo:** O besouro castanho avermelhado, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae), é um dos insetos praga de grãos armazenados que mais gera danos à indústria de produtos de armazenamento. Para controlar esta praga, utiliza-se, principalmente, agrotóxicos. Entretanto, a resistência adquirida por insetos e a elevada toxicidade desses compostos sobre o ambiente e organismos não-alvos têm levado a um aumento na busca por produtos naturais isentos de toxicidade e efetivos no controle de insetos praga. Uma poderosa ferramenta para o manejo integrado desta praga é a utilização de extratos e fração concentrada de lectinas (proteínas ou glicoproteínas que reconhecem carboidratos e aglutinam células) de plantas têm apresentado atividade inseticida e por esse motivo têm sido bastante estudados. Dentre elas, *Crotalaria stipularia*, pertencente à família Fabaceae, apresenta ampla distribuição em ambientes de Mata Atlântica sendo importante na alimentação bovina. Foram preparados o extrato e a fração de *C. stipularia* e foram avaliados a atividade inseticida e os efeitos na reprodução dos insetos adultos de *T. castaneum*, resultando na mortalidade e interferindo na reprodução dos insetos tratados. Desta forma, a preparação do extrato e fração das sementes de *C. stipularia* constituem um biomaterial (isca tóxica) com potencial para ser utilizado no controle de *T. castaneum*.**Figura a publicar:** 01

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 22/08/2019 às 11:03, Petição 870190081780

ANEXO E - produção não referente à tese

Obtenção de inseticida a partir do colmo de *Guadua angustifolia* Kunth (Poaceae: Bambusoideae) contra o besouro *Tribolium castaneum* (Herbst 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae)



25/03/2020 870200039330
16:01
29409181917298004

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 006006 6

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24464109000148

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP: 57072-970

País: Brasil

Telefone: 82-3214-1064

Fax: 82-3214-1035

Email: nit@propep.ufal.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 25/03/2020 às 16:01, Petição 870200039330

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):** Obtenção de inseticida a partir do colmo de *Guadua angustifolia* Kunth (Poaceae: Bambusoideae) contra o besouro *Tribolium castaneum* (Herbst 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae)**Resumo:** O besouro castanho avermelhado, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae), atualmente é um importante inseto praga causador de grandes prejuízos econômicos em grão armazenados na América do Sul. Dentre os diversos métodos alternativos explorados com a finalidade de controlar pragas de grãos, os extratos de plantas vem ganhando espaço por ser de fácil obtenção e manuseio, sendo uma importante alternativa para o plano de ações voltadas ao manejo integrado de pragas (MIP) e a redução do consumo de agrotóxicos. A *Guadua angustifolia* é uma espécie de bambu bastante utilizada pelo homem em diversas atividades, tais como fonte de alimento, medicamento e material de construção civil. Na presente invenção foram preparados o extrato do colmo pulverizado da *Guadua angustifolia* e foram submetidas a avaliação da atividade inseticida dos insetos adultos de *Tribolium castaneum*, resultando na interferência nos efeitos na sobrevivência (50% de mortalidade) e deterrência alimentar dos insetos tratados. Desta forma, a preparação do extrato do colmo da *Guadua angustifolia* apresenta ser uma importante ferramenta, funcionando como isca com potencial tóxico para utilização no controle de *Tribolium castaneum*.**Figura a publicar:** 1

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 25/03/2020 às 16:01, Petição 870200039330