



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Camilla Camerino Santana

Fisiologia do inseto *Rhynchophorus palmarum* : Avaliação de reservas energéticas e caracterização de atividade Triacilglicerol-lipase

Maceió

2014

CAMILLA CAMERINO SANTANA

Fisiologia do inseto *Rhynchophorus palmarum* : Avaliação de reservas energéticas e caracterização de atividade Triacilglicerol-lipase

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo

Co-orientador (a): Profa. Dra. Camila Braga Dornelas

Maceió

2014

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico Bibliotecária
Bibliotecário: Valter dos Santos Andrade

S232f Santana, Camilla Camerino.
Fisiologia do inseto *Rhynchophorus palmarum* : avaliação de reservas energéticas e caracterização de atividade Triacilglicerol-lipase / Camilla Camerino Santana. – 2014.
[79] f. : il., graf., tab.

Orientador: Luciano Aparecido Meireles Grillo.
Co-orientadora: Camila Braga Dornelas.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alagoas. Escola de Enfermagem e Farmácia. Maceió, 2014.

Bibliografia: f. 62-73.
Anexos: f. 74-[79].

1. *Rhynchophorus palmarum*. 2. Triacilglicerol-lipase. 3. Guanilidrazonas.
4. lipídios. 5. Lipase. 6. Inibidores. I. Título.

CDU: 615.355

Folha de Aprovação

CAMILLA CAMERINO SANTANA

Fisiologia do inseto *Rhynchophorus palmarum* : Avaliação de reservas energéticas e caracterização de atividade Triacilglicerol-lipase

Dissertação de Mestrado submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 13 de Agosto de 2014.

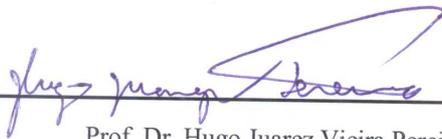


Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo (Orientador)



Prof.ª. Dr.ª. Camila Braga Dornelas (Co-orientadora)

Banca examinadora:



Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira – (IQB-UFAL)



Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento (ESENFAR-UFAL)

*Dedico este trabalho a Deus e
à minha família, que são sempre a minha força
para seguir em frente.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar sempre comigo, por me acolher nos momentos difíceis e me manter firme para seguir em frente.

Aos meus pais Carmem e Euriberto por todo o apoio, educação e amor dedicados.

Aos meus familiares que sempre acreditaram no meu potencial.

Ao meu noivo Raphael, por todo apoio, paciência, compreensão e amor dedicados.

À minha afilhada Otávia por transbordar alegria e amor no meu dia-dia.

Às minhas amigas Janaína Menezes, Lara, Marília, Larissa e Janaína Ferraz por todo o apoio, pelos momentos de descontração sempre necessários, por serem presentes mesmo na “distância”.

Ao meu orientador Luciano Grillo, por toda disponibilidade e dedicação. Por ter me ensinado a ser persistente e a pensar diante das dificuldades. Por ter me ensinado a lidar com os resultados não esperados. Obrigada por ter me mostrado um novo caminho na profissão e pelo encaminhamento no caminho da pesquisa. Serei sempre grata.

À minha co-orientadora Camila Dornelas pela disponibilidade e ajuda na correção deste trabalho.

Em especial, aos colegas de laboratório Josiel, Thomás e Eduarda que contribuíram diretamente para o sucesso deste trabalho, que por muitas vezes sacrificaram seus horários e atividades para me auxiliar nos experimentos.

Aos meus colegas de laboratório Mariana, Tamires, Anderson, Erlan, Rafael, Danilo, Diogo e Edeílido por todo o apoio, por fazerem o dia-dia, às vezes árduo, parecer mais leve.

Aos laboratórios parceiros e professores responsáveis que cederam espaço e me acolheram durante os experimentos: Laboratório de Química Medicinal (LabTcon – Prof. João Xavier), Laboratório de Biotecnologia e Enzimologia (LBE - Profa. Sônia Machado), TecNano (Profa. Camila Dornelas), Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais (LPqRN - Prof. Euzébio Goulart), Laboratório de Análises Farmacêuticas e Alimentícias (LAFA - Prof. Ticiano Gomes), Laboratório de Enzimologia e Análises Bromatológicas (LENAB –

*Prof. Hugo Juarez), Laboratório de Controle e Qualidade de Alimentos(LCQA – Profa.
Cristina Delgado).*

À ESENFAR e IQB.

Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

*À Universidade Federal de Alagoas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas pela oportunidade de aprendizado.*

À todos que contribuíram diretamente ou indiretamente para o sucesso deste trabalho.

RESUMO

O *Rhynchophorus palmarum* é a principal coleobroca que acomete palmáceas. A infestação de áreas de cultivo de palmáceas por *R. palmarum* vem causando grandes perdas econômicas para os produtores nos últimos anos, pois este inseto é vetor do nematoide *Bursaphelenchus cocophilus*, agente causal da doença do anel vermelho. O controle dessa praga vem sendo realizado por remoção mecânica com o auxílio de armadilhas que utilizam feromônio de agregação para facilitar a captura ou por uso de fungos entomopatogênicos. Devido à ausência de formas de controle, a biologia do inseto tem sido estudada a fim de identificar novos alvos para controle. As enzimas digestivas constituem importantes alvos porque são indispensáveis para o desenvolvimento do inseto ao longo de seus estágios. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar a atividade Triacilglicerol-lipase, a fim de entender seu funcionamento e estudá-la como potencial alvo para controle. A atividade TAG-lipase foi caracterizada em diferentes tecidos digestivos do inseto, pois constitui componente importante para a digestão e mobilização energética em insetos, já que os lipídios são os principais componentes da sua dieta. Testes de inibição da enzima foram realizados com compostos guanilidrazonas que demonstraram inibição significativa sobre a atividade enzimática. Assim, a TAG-Lipase pode constituir novo alvo para controle vetorial e estudos mais aprofundados são necessários.

Palavras-chave: *Rhynchophorus palmarum*, Triacilglicerol-lipase, guanilidrazonas, lipídios, lipases digestivas, inibidores de lipases.

ABSTRACT

The *Rhynchophorus palmarum* is the main coleobroca affecting palms. The infestation of cultivated land of palm trees by *R. palmarum* is causing great economic losses for producers in recent years, because this insect is the vector nematode *Bursaphelenchus cocophilus*, causal agent of red ring disease. Control of this pest is being accomplished by mechanical removal with the help of traps that use aggregation pheromone to facilitate the capture or use of entomopathogenic fungi. Due to the lack of ways to control insect biology has been studied to identify new targets for control. Digestive enzymes are important targets because they are indispensable for the development of the insect throughout its stages. The activity of triacylglycerol-lipase (TAG-lipase) was characterized in different digestive tissues of the insect, as an important component for digestion and energy mobilization in insects, since lipids are the main components of their diet. Enzyme inhibition tests were performed with guanylhydrazones that demonstrated significant inhibition of enzyme activity. Thus, TAG-lipase may be new target for vector control and further studies are needed.

Keywords: *Rhynchophorus palmarum*, Triacylglycerol-lipase, Guanylhydrazones, Lipids, Digestive lipases, Lipases inhibitors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Insetos da Ordem Coleoptera. (A) <i>Tribolium castaneum</i> , (B) <i>Sitophilus zeamais</i> , (C) <i>Diabrotica speciosa</i> , (D) <i>Rhynchophorus palmarum</i>	21
Figura 2 – Diferenças entre os estágios de desenvolvimento de <i>Rhynchophorus palmarum</i> . Larvas (A), pré-pupa(B) e inseto adulto (C).....	23
Figura 3 – Ciclo de vida do <i>Rhynchophorus palmarum</i>	24
Figura 4 – Danos causados no coqueiro (<i>Cocos nucifera</i>) por ação de larvas e insetos adultos de <i>R. palmarum</i>	24
Figura 5 – Microscopia do nematoide <i>Bursaphelenchus cocophilus</i>	25
Figura 6 – Doença do anel vermelho causada pelo nematóide <i>Bursaphelenchus cocophilus</i> em palmácea <i>Cocos nucifera</i>	25
Figura 7 – Representação esquemática do trato intestinal de Coleópteros.....	27
Figura 8 – Esquema do processo de digestão de lipídios da dieta em insetos.....	31
Figura 9 – Mecanismo de ação das Triacilglicerol-lipases.....	34
Figura 10 – Esquema proposto para o metabolismo de glicose em <i>Boophilus microplus</i> durante o desenvolvimento embrionário.....	36
Figura 11 – Esquema da metodologia utilizada para dosagem de variados parâmetros em populações de larvas de <i>R. palmarum</i> alimentadas com duas dietas experimentais.....	41
Figura 12 – Esquema da metodologia utilizada para caracterização da atividade TAG-lipase em larvas de <i>R. palmarum</i> alimentadas com dieta artificial.....	44
Figura 13 – Medida de viabilidade (A) e peso (B) de larvas de <i>Rhynchophorus palmarum</i> submetidas a duas dietas experimentais.....	50
Figura 14 – Teor de glicose (A) e trealose (B) na hemolinfa de larvas de <i>Rhynchophorus palmarum</i> submetidas a duas dietas experimentais.....	51

Figura 15 – Teor de glicogênio (A) e triglicerídeos (B) do corpo gorduroso de larvas de <i>Rhynchophorus palmarum</i> submetidas a duas dietas experimentais.....	51
Figura 16 – Avaliação da atividade TAG-lipase em tecidos digestivos de <i>Rhynchophorus palmarum</i> em função da concentração de proteínas de extratos proteicos dos tecidos.....	53
Figura 17 – Curso temporal da atividade TAG-lipase de tecidos digestivos de larvas de <i>R. palmarum</i>	54
Figura 18 – Efeito da temperatura na atividade TAG-lipase de tecidos digestivos de larvas de <i>R. palmarum</i>	55
Figura 19 – Efeito do pH na atividade TAG-lipase de tecidos digestivos de larvas de <i>R. palmarum</i>	56
Figura 20 – Efeito do PMSF na atividade TAG-lipase de tecidos digestivos de larvas de <i>R. palmarum</i>	58
Figura 21 – Efeito da força iônica (NaCl) na atividade TAG-lipase de tecidos digestivos de larvas de <i>R. palmarum</i>	59
Figura 22 – Atividade TAG-lipase de tecidos digestivos em diferentes estágios de desenvolvimento de <i>R. palmarum</i>	60
Figura 23 - Efeito de guanilidrazonas sintéticas na atividade TAG-lipase de tecidos digestivos de larvas de <i>R. palmarum</i>	61
Figura 24 - Efeito de guanilidrazonas sintéticas na atividade da Lipase comercial de <i>Candida rugosa</i> (1U).....	61
Figura 25 – <i>Docking</i> molecular da lipase comercial de <i>Candida rugosa</i> com a guanilidrazona W011 utilizando o software <i>AutoDock Tools</i> [®] (versão 1.5.6).....	62
Figura 26 – <i>Docking</i> molecular da Lipase comercial de <i>Candida rugosa</i> com a guanilidrazona WE011 utilizando o software <i>AutoDock Tools</i> [®] (versão 1.5.6).....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Componentes da dieta artificial de larvas de <i>Rhynchophorus palmarum</i>	42
Tabela 2 – Estruturas químicas das Guanilidrazonas sintéticas testadas.....	47
Tabela 3 – Pesos moleculares das Guanilidrazonas.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

AGEs - Produtos finais de glicação avançada

Asp – Aspartato

ATP – do inglês, *Adenosine Triphosphate*

CD36 – Transportador de ácidos graxos

DAG – Diacilglicerol

DMPTB - 2,3-dimercapto-1-propanol tributirato

DTNB - 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

FABPpm – do inglês, *Fatty acid binding protein*

FATP4 – do inglês, *Fatty acid transport protein 4*

G6PDH – Glicose 6-fosfato desidrogenase

Gli – Glicina

GPCRs – do inglês, *G protein-coupled receptors*

HCl – Ácido clorídrico

His – Histidina

HK – Hexoquinase

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LTP – Partícula transferidora de lipídios

NaCl – Cloreto de Sódio

NO – Óxido nítrico

NO sintase – Óxido nítrico sintase

PEPCK – Fosfoenolpiruvato quinase

PK – Piruvato Quinase

PMSF - Fluoreto Fenilmetanosulfonil

Ser – Serina

SNC – Sistema Nervoso Central

TAG - Triacilglicerol

TAG-lipase – Triacilglicerol-lipase

VHDL – do inglês, *Very High Density Lipoprotein*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Os insetos como modelo experimental	18
2.2 Ordem Coleoptera	20
2.3 O inseto: <i>Rhynchophorus palmarum</i>	22
2.4 O aparelho digestivo e a digestão em insetos	26
2.5 Metabolismo de lipídios em insetos	29
2.6 Triacilglicerol-lipase (TAG-lipase)	33
2.7 Metabolismo de glicídios em insetos	35
2.8 Importância dos estudos sobre a biologia de insetos	37
2.9 Guanilidrazonas	38
3. OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo geral	40
3.2 Objetivos específicos	40
4. METODOLOGIA	41
4.1 Avaliação da viabilidade larvar frente a duas dietas	41
4.1.1 Insetos	41
4.1.2 Avaliação do desenvolvimento larvar e peso médio	41
4.1.3 Dosagem dos níveis de glicose, trealose e glicogênio na hemolinfa das larvas	42
4.1.4 Dosagem dos níveis de lipídios no corpo gorduroso das larvas	43
4.2 Caracterização da atividade TAG-lipase	43
4.2.1 Preparação dos extratos proteicos para avaliação da atividade TAG-lipase	43
4.2.2 Dosagem de proteínas	43
4.2.3 Dosagem de atividade TAG-lipase	44
4.2.4 Medida da atividade TAG-lipase em função da concentração dos extratos proteicos	45
4.2.5 Medida da atividade TAG-lipase em função do tempo	45
4.2.6 Efeito da Temperatura	45
4.2.7 Efeito do pH	45
4.2.8 Efeito do Fluoreto Fenilmetanosulfonil (PMSF)	46
4.2.9 Efeito da força iônica sobre a atividade lipásica	46
4.2.10 Medida da atividade lipásica em diferentes estágios de desenvolvimento de <i>R. palmarum</i>	46
4.2.11 Efeito da interação de Guanilidrazonas na atividade TAG-lipase	46
4.2.12 <i>Docking</i> Molecular da guanilidrazona W011	48
4.3 Análise estatística	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 Avaliação da viabilidade larvar frente a duas dietas experimentais	49
5.2 Caracterização da atividade TAG-lipase	52
6. CONCLUSÃO	64
7. REFERÊNCIAS	66

8. ANEXO

1 INTRODUÇÃO

A cultura do coqueiro (*Cocos nucifera*) é realizada em mais de 90 países, com cerca de 12 milhões de hectares em todo o mundo, sendo o Brasil e o México os maiores produtores das Américas. No Brasil, a região nordeste ocupa posição de destaque como maior região produtora de coco do país, gerando cerca de 600 milhões de reais por ano, segundo dados do IBGE (NEGRISOLI-JÚNIOR et al., 2011). Em Alagoas, a produção de coco corresponde à grande parte da economia do estado, que tem sua produção direcionada, principalmente, para suprir as demandas de matéria-prima de indústrias locais. De toda a produção do país, a maior parte é produzida por pequenos produtores, aqueles que apresentam área cultivada menor que 10 hectares. Esses pequenos produtores correspondem a 85% de todos os produtores do país. Assim, devido à ausência de grandes investimentos nessas propriedades, o cultivo vem sendo realizado sem o implemento de tecnologias para controle de pragas e irrigação, acarretando diminuição da produtividade e grandes perdas econômicas, chegando à baixa produtividade de até 30 frutos/planta/ano. (FONTES et al., 2003; WANDERLEY & LOPES, 2009; IBGE, 2014).

O *Rhynchophorus palmarum* é o principal inseto-praga responsável pelas grandes perdas econômicas registradas no cultivo do coco, pertence à Ordem Coleoptera, os insetos mais conhecidos como besouros, e à família Curculionidae. É um inseto holometábolo (possuem metamorfose completa), suas larvas se alimentam do broto apical das palmáceas, o que geralmente leva à desestruturação da planta e consequente morte. Já os insetos adultos são vetores do nematóide *Bursaphelenchus cocophilus*, agente causal da doença do anel vermelho, que é mortal para este tipo de planta (FERREIRA & MICHEREFF FILHO, 2002; NEGRISOLI-JÚNIOR et al., 2011).

As formas de controle disponíveis para este inseto em áreas cultivadas de coqueiro são a remoção mecânica e o controle comportamental. A remoção mecânica pode ser facilitada pelo uso combinado com o controle comportamental, utilizando armadilhas com feromônios sintéticos de agregação do inseto, que atraem outros insetos para o mesmo local e facilitam a captura (FERREIRA & MICHEREFF FILHO, 2002). O uso do controle biológico tem constituído uma nova alternativa de controle, através do uso de microrganismos entomopatogênicos, como o fungo *Bauveria bassiana*, que tem sua eficácia comprovada contra coleópteros, levando-os à morte (ALMEIDA et al., 2005). O controle realizado através de inseticidas químicos constitui uma ameaça ao ecossistema devido à sua acumulação no

ambiente e a sua capacidade de desenvolver resistência nos insetos. Dessa forma, considerando as opções disponíveis para o controle de pragas em culturas de coco infestadas por *R. palmarum*, nenhuma das alternativas são suficientemente eficazes, surgindo a necessidade de desenvolvimento de novas formas de controle (NEGRISOLI-JÚNIOR et al., 2011).

Assim a investigação da biologia do inseto constitui um novo alvo para estudos (SILVA et al., 2012). O uso de substâncias que interagem com enzimas digestivas de insetos são alternativas promissoras. O metabolismo energético de *R. palmarum* pode constituir novo alvo para controle vetorial, pois qualquer alteração no processo digestivo e mobilização de estoques energéticos pode atrapalhar o desenvolvimento do inseto através de seus estágios, levando-o a morte. Como são escassas as informações a respeito do metabolismo do *R. palmarum*, este trabalho propõe o estudo do metabolismo energético das larvas do inseto, visando identificar possíveis alvos para o desenvolvimento de novas formas de controle.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Os insetos como modelo experimental

Os insetos representam um dos grupos mais importantes do reino animal, quer sob o aspecto econômico, ou sob o aspecto médico (LEHANE, 1991). A classe Insecta constitui o grupo mais numeroso dos artrópodes e compreende cerca de 70% de todas as espécies animais conhecidas e é a classe que maior sucesso evolutivo obteve dentre as espécies eucarióticas. Um dos fatores que contribuíram para o seu sucesso foi o fato de manterem um ciclo de vida altamente especializado, onde adultos e larvas se desenvolvem, em sua grande maioria, com hábitos alimentares diferentes. Um fator que contribuiu muito para o sucesso adaptativo do grupo foi, sem dúvida, a presença de asas, que possibilitou a conquista dos ambientes mais diversos. Esta característica lhes permitiu uma maior eficiência na busca do alimento e defesa contra predação, além de garantir o fluxo gênico das espécies através da migração (MARANHÃO, 1977). Além disso, muitas espécies de insetos se reproduzem facilmente e apresentam um ciclo de vida curto, que pode ser acompanhado em todas as fases, possibilitando com isso, um bom modelo para o desenvolvimento de ensaios experimentais. Os insetos têm outra vantagem em relação aos outros grupos, são pequenos e apresentam órgãos que podem ser facilmente manipulados.

Por apresentarem maior resistência a intervenções cirúrgicas, devido ao fato de não necessitarem sofrer incubação para irrigação com oxigênio; por possuírem um sistema nervoso menos complexo, entre outras características, os insetos constituem um grupo de escolha para diversos tipos de estudos dentre eles, genéticos, bioquímicos, celulares e moleculares (GRILLO, 2005).

Alguns estudos utilizando insetos como modelo geraram descobertas que podem ser aplicadas aos vertebrados. A descoberta do mecanismo de ação dos hormônios esteroides iniciou-se com a descrição da ação da ecdisona, um hormônio esteroide de insetos, que estimulava a síntese *de novo* de RNA no núcleo das células (KARLSON, 1963). Estudos realizados em *Drosophila melanogaster* levaram ao estabelecimento de conceitos básicos de citogenética e biologia do desenvolvimento, como a demonstração da localização dos genes nos cromossomas (MURRAY & HUNT, 1993) e a descoberta dos genes “Homeobox”, responsáveis por determinar o padrão de organização dos eixos corporais (AKAM, 1989). Também em *D. melanogaster*, estudos genéticos e moleculares no sistema nervoso central (SNC) apontaram os locais relevantes para comportamentos sexuais masculinos (DEMIR & DICKSON, 2005; SAKAI & KITAMOTO, 2006).

Estudos envolvendo sequenciamentos e estudos de clonagem têm fornecido dados importantes a respeito da sequência do genoma e informações sobre a estrutura genética de receptores em invertebrados. A descoberta de receptores é de grande valia para a compreensão de mecanismos farmacológicos. Em insetos, a ampla sequência de um grupo de receptores de neurotransmissores/neuro-hormonais foi descoberto, são receptores de aminas biogênicas acoplados à proteína G (GPCRs), porém ainda são poucas as informações sobre o mecanismo farmacológico envolvido. Em *Tribolium castaneum*, através de técnicas de biologia molecular, foram identificados altos níveis de expressão de receptores de serotonina do tipo 5-HT7 no cérebro, representando possível envolvimento em processos neuronais (VLEUGELS et al., 2014).

Com a finalidade de conhecer mais sobre os mecanismos biológicos que acontecem no desenvolvimento de insetos e fornecer informações para o desenvolvimento de novas formas de controle biológico para insetos-pragas, muitos estudos envolvendo técnicas de sequenciamento e clonagem em biologia molecular vem sendo realizados, para determinação do genoma ou transcriptoma desses invertebrados. Um estudo *com Rhynchophorus*

ferrugineus obteve sucesso na descoberta do transcriptoma durante a fase embrionária deste inseto, onde foram identificadas as sequências de 22.532 genes de um total de 26.581 genes ativos durante a embriogênese (YIN et al., 2013). Com esses estudos, os autores dividiram a embriogênese de *R. ferrugineus* em 5 estágios de desenvolvimento, fornecendo informações de quais proteínas eram mais expressas em cada fase. Kunieda et al. (2006) sequenciaram o genoma da abelha *Apis mellifera* e avaliaram quais genes estavam envolvidos no metabolismo de carboidratos e lipídios desse inseto, comparando com o genoma de outros insetos que possuem alimentação diferente (*Drosophila melanogaster* e *Anopheles gambiae*), fornecendo informações sobre alterações de genes através da evolução. Os resultados encontrados mostraram uma grande semelhança entre os genes codificantes de enzimas do metabolismo de lipídios e carboidratos, porém foram observadas taxas de alterações significativas entre os genes das espécies, quando se tratando dos genes envolvidos na glicólise e gliconeogênese.

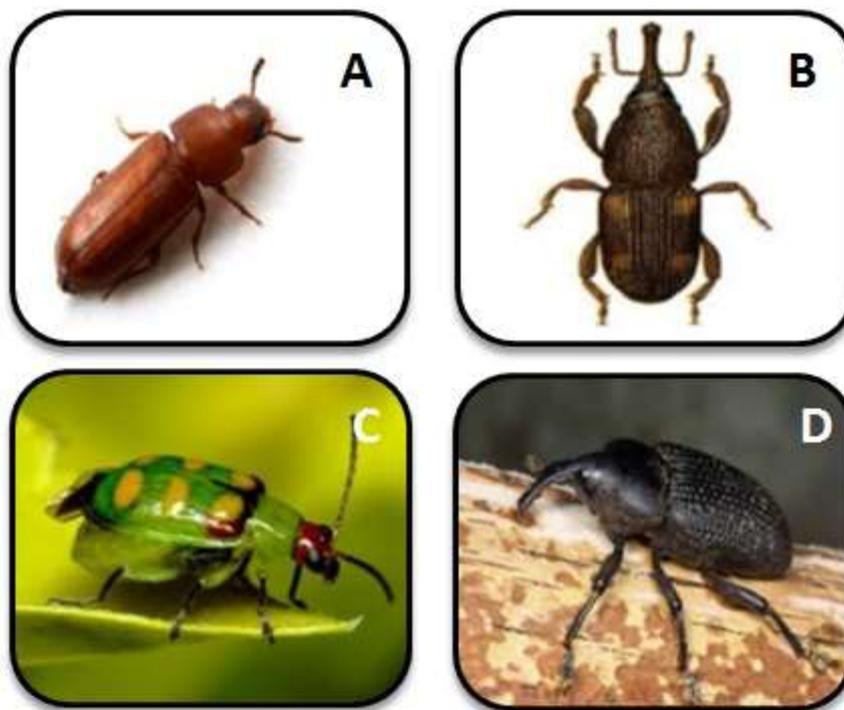
2.2 Ordem Coleoptera

A ordem Coleoptera é a mais diversa ordem de insetos conhecida em todo mundo, são cerca de 300 mil espécies descritas, ocupando com abundância variados nichos ecológicos (WOODCOCK et al., 2013) (Figura 1). São popularmente conhecidos como besouros, possuem um par de asas anteriores endurecido, chamados de élitros, que protegem um par de asas posteriores membranosas. No voo, enquanto as asas vibram, os élitros se mantêm entreabertos e imóveis. Os coleópteros são facilmente distinguíveis de outros insetos devido à forte esclerose do exoesqueleto e dos élitros, os quais possuem consistência muito dura. São predominantemente insetos fitófagos, que se alimentam quase que exclusivamente de tecido vegetativo e, por este motivo, são bastante conhecidos como importantes pragas de culturas, causando vastas perdas econômicas para os produtores. Das famílias pertencentes à ordem Coleoptera, a mais populosa é a Curculionidae, com mais de 50.000 espécies descritas (RAFAEL et al., 2012).

Muitos estudos com coleópteros vêm sendo desenvolvidos com a finalidade de conhecer a biologia dos insetos e descobrir novas formas de controle para essas pragas agrícolas. O *Tribolium castaneum*, conhecido como besouro castanho, acomete culturas de cereais como trigo, soja e aveia causando grandes perdas tanto na produção como durante o armazenamento do produto. Por possuírem seus mecanismos biológicos bastante conhecidos,

o *T. castaneum* tem sido a segunda escolha como sistema modelo para estudos em insetos, ficando atrás apenas da mosca-da-fruta *Drosophila melanogaster*, que lidera os estudos na área de genética (DÖNITZ et al., 2013).

Figura 1 – Insetos da Ordem Coleoptera. (A) *Tribolium castaneum*, (B) *Sitophilus zeamais*, (C) *Diabrotica speciosa*, (D) *Rhynchophorus palmarum*.



Fonte: <http://www.agrolink.com.br> – Acesso em 05 de Agosto de 2014.

As perdas significativas na qualidade e quantidade de grãos e sementes, por ação das pragas, ocorrem principalmente durante o armazenamento. As perdas anuais causadas por pragas durante o período de armazenamento de grãos correspondem a cerca de 10% da produção mundial (LORINI, 1993). Das principais pragas que acometem grãos, o gorgulho do milho (*Sitophilus zeamais*) é o responsável pelas maiores perdas na produção do milho, atacam o embrião e o endosperma das sementes, ocasionando perda de massa e do valor nutritivo dos grãos (ALMEIDA, 1989). O difícil controle dessa praga na cultura foi constatado por Araújo et al (2008), que descreveram as alterações enzimáticas presentes em populações de *S. zeamais* resistentes aos inseticidas disponíveis no mercado.

Os diferentes coleópteros alimentam-se de tecidos vegetativos variados, causando danos às culturas de diferentes formas. A *Diabrotica speciosa* também acomete a cultura do

milho, além de culturas como as hortaliças, feijoeiro, soja e girassol, mas seu ataque ocorre em tecidos diferentes do que ocorre em *S. zeamais* (VIANA, 2010). É uma espécie bastante dispersa pelos estados brasileiros e possui característica polífaga: os adultos se alimentam da parte aérea das plantas e as larvas acometem as raízes e tubérculos (GASSEN, 1989).

Além do ataque dos coleópteros ao tecido vegetativo das plantas, esses insetos também podem ser vetores de microrganismos causadores de doenças. A *D. speciosa* é vetor de alguns vírus importantes, sendo os gêneros *Cerotoma* e *Diabrotica* (Coleoptera) os vetores das viroses mais importantes das Américas (VIANA, 2010). O *Rhynchophorus palmarum* é outro coleóptero que além de causar danos no meristema apical de palmáceas na fase larval, na forma adulta é o vetor do nematoide *Bursaphelenchus cocophilus*, agente causal da doença do anel vermelho, fatal para as palmáceas infectadas (NEGRISOLI-JÚNIOR et al., 2011).

2.3 O inseto *Rhynchophorus palmarum*

O *Rhynchophorus palmarum* é a principal praga que acomete palmáceas, principalmente o coqueiro (*Cocos nucifera*), açazeiro (*Euterpe oleracea*) e o dendezeiro (*Elaeis guineensis*). É popularmente conhecido como broca-do-olho-do-coqueiro, pertence à Ordem Coleoptera e Família Curculionidae. Esta espécie de fitófagos acomete 35 espécies de plantas de diferentes famílias, predominantemente da família Arecaceae (ESSER & MEREDITH, 1987; GRIFFITH, 1987; WATTANAPONGSIRI, 1966; JAFFÉ & SÁNCHEZ, 1990). A distribuição geográfica do gênero *Rhynchophorus* é bastante ampla, mas tende a ser mais intensa nos trópicos (Caribe, América Central e América do sul) (WATTANAPONGSIRI, 1966; MAGALHÃES et al., 2008).

São insetos holometábolos, no seu desenvolvimento passam pela fase de ovo, larva, pupa e inseto adulto. Os adultos são besouros de coloração preto-fosca, medem entre 3,5 e 6,0 cm, e apresentam um rostro alongado, com cerca de 1 cm de comprimento e um par de asas anterior endurecidas, chamadas de élitros e um aparelho bucal modificado em forma de rostro (RAFAEL et al., 2012). O rostro dos machos apresentam pelos em forma de escova na região dorsal, diferindo do rostro das fêmeas, que é liso. Já as larvas são brancas, com cabeça castanho-escura, recurvadas e ao final de seu desenvolvimento chegam a medir 7,5 cm de comprimento. As pupas são amareladas e permanecem abrigadas no interior de um casulo

construído pela larva com as fibras da palmácea que estão infectando. (NEGRISOLI-JÚNIOR et al., 2011). Os estágios de desenvolvimento de *R. palmarum* (larva, pré-pupa e inseto adulto) são mostrados na Figura 2.

Figura 2- Diferenças entre os estágios de desenvolvimento de *Rhynchophorus palmarum*. Larvas (A), pré-pupa(B) e inseto adulto (C).



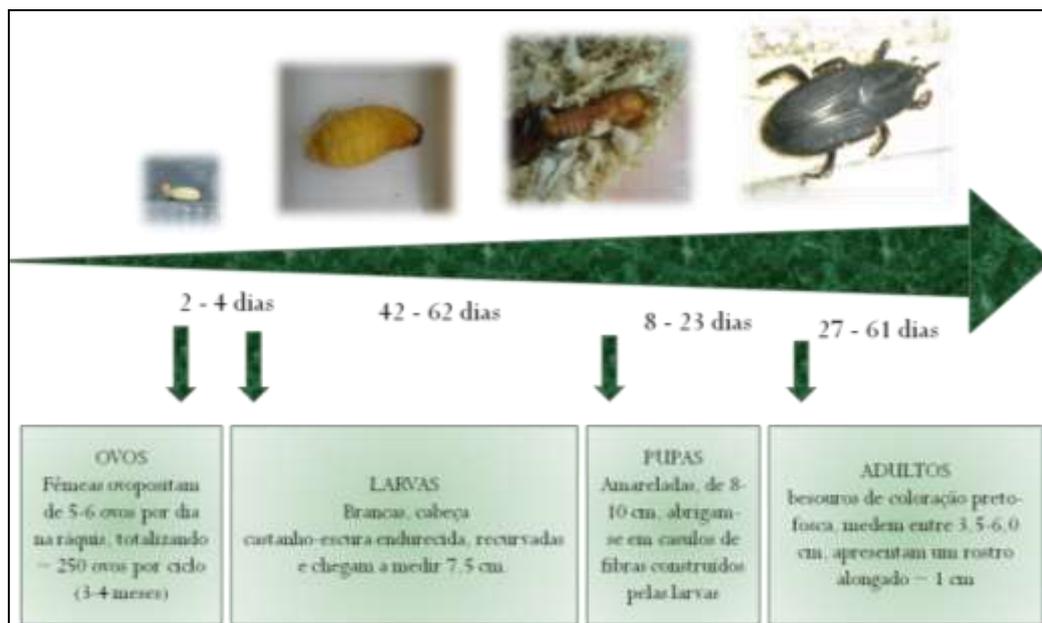
Fonte: <http://www.aphis.usda.gov> - Acesso em 10 de Março de 2014.

O macho adulto é responsável pela liberação do feromônio de agregação durante a fase reprodutiva, aspecto que dificulta o controle e remoção dos insetos em áreas de cultivo. Essas coleobrocas, possuem ciclo de vida longo, que dura em torno de 120 dias: 3 a 5 dias na fase de ovo, 70 dias na fase larval e cerca de 40 dias na fase de adulto (Figura 3).

Os adultos de *R. palmarum* possuem hábito diurno e os ovos das fêmeas são colocados na região internodal do caule, nas bases das folhas jovens e no endosperma da planta danificada (HAGLEY, 1965). Tanto as larvas quanto os insetos-adultos se alimentam dos tecidos das plantas, fazem galerias no meristema apical das palmáceas, e os odores da fermentação exalados das plantas afetadas atraem outros insetos machos e fêmeas da espécie que ovipositam nas cicatrizes recém-abertas (GIBLIN-DAVIS, 2001) (Figura 4).

Além disso, este coleóptero também é vetor do *Bursaphelenchus cocophilus* (Figura 5), considerado um fitonematoide, constituindo ameaça para importantes culturas de todo o mundo (CASTRO et al., 2009). Dados de uma pesquisa mundial demonstraram perdas anuais de produtividade agrícola de 12% devido à nematoide (SASSER & FRECKMAN, 1987). São gastos bilhões de dólares, anualmente, com técnicas de fumigação do solo e nematicidas na tentativa de reduzir as perdas na produção (MAGALHÃES et al., 2008), mesmo com a tendência mundial de diminuir o uso de agrotóxicos em plantações.

Figura 3 - Ciclo de vida do *Rhynchophorus palmarum*



Fonte: BATISTA, 2014.

Figura 4 – Danos causados no coqueiro (*Cocos nucifera*) por ação de larvas e insetos adultos de *R. palmarum*.



Fonte: <http://www.aphis.usda.gov/> - Acesso em 10 de Março de 2014.

Figura 5 – Microscopia do nematoide *Bursaphelenchus cocophilus*.



Fonte: Castro et al., 2009.

A contaminação de palmáceas por *B. cocophilus* ocorre durante a alimentação do *R. palmarum*, que deposita os nematoides no tecido vegetal. Antes que sintomas externos da doença sejam observados na palmácea infectada, ocorre a formação de um anel vermelho na região cortical do tronco. Essa coloração característica ocorre devido aos distúrbios metabólicos causados pelo nematoide na planta, aumentando o teor de gás carbônico nos tecidos, que provoca alteração nos complexos enzimáticos e geram os pigmentos antociânicos que se acumulam (Figura 6).

Figura 6 – Doença do anel vermelho causada pelo nematóide *Bursaphelenchus cocophilus* em palmácea *Cocos nucifera*.



Fonte: <http://www.aphis.usda.gov/> - Acesso em 10 de Março de 2014.

2.4 O aparelho digestivo e a digestão em insetos

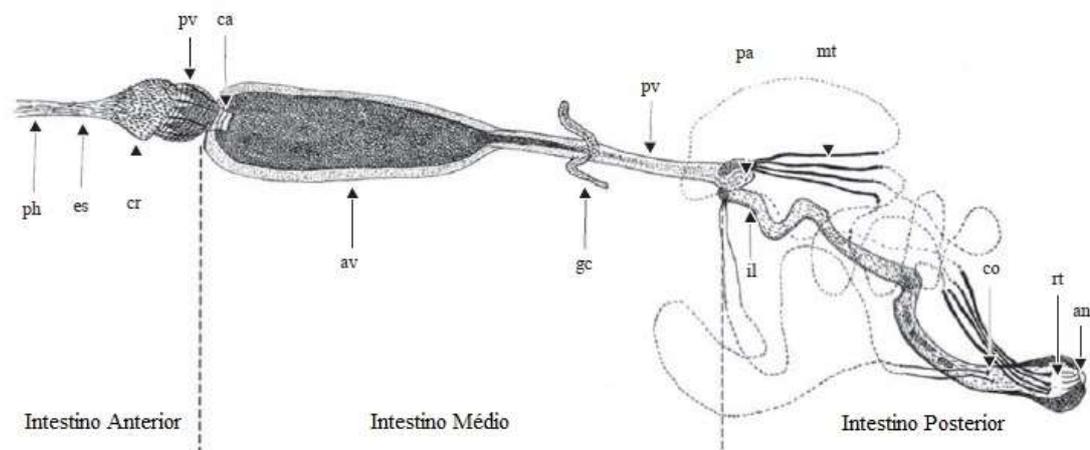
Os insetos são incapazes de sintetizar esteróis e outros nutrientes indispensáveis para seu desenvolvimento (BEHMER et al., 1999) e por isso precisam adquirir a maior parte destes através da alimentação. Insetos holometábolos, possuem diferenças no processo digestivo e no metabolismo energético entre os estágios. Durante os estágios larvais, a alimentação é constante e o acúmulo de nutrientes é intenso. Somente nas mudanças de estágio a alimentação é interrompida. Dessa forma, as reservas energéticas aumentam muito durante a fase larval, como foi observado em estudos com *Manduca sexta* onde os níveis de triacilglicerol variam de poucos miligramas à 300 mg ao fim da fase larval (FERNANDO-WARNAKULASURIYA et al, 1988). No entanto, nas fases seguintes de pupa e de inseto adulto, a ingestão de nutrientes é reduzida e seu metabolismo é mantido pelos nutrientes estocados, principalmente no corpo gorduroso, reserva essa sintetizada nos estágios larvais anteriores. As reservas energéticas funcionam como suporte em situações de alta demanda de energia como reprodução e voo (ZIEGLER, 1991).

O intestino tem papel importante na sobrevivência do inseto ao longo de seus estágios de desenvolvimento, é responsável por integrar os mecanismos de digestão e absorção de lipídios e outros nutrientes no interior do lúmen do intestino médio. O canal alimentar em besouros da família Curculionidae é comumente dividido em três regiões: porção anterior, intestino médio e porção posterior (RUBIO et al., 2008). A divisão do canal alimentar em Coleopteros é mostrada na Figura 7. O principal sítio de digestão e absorção em insetos na maior parte das espécies é o intestino médio. Sua estrutura formada por um tubo simples possui uma camada única de epitélio sobre uma membrana basal contínua (BILLINGSLEY & DOWNE, 1983). Em algumas espécies de insetos, principalmente aqueles pertencentes à ordem Lepidoptera, o pH luminal do intestino médio é básico, favorecendo a liberação de ácidos graxos livres durante a digestão (ARRESE et al., 2001). A maioria dos insetos possui no lúmen uma membrana peritrófica que envolve o alimento ingerido, secretada pelas células epiteliais após a distensão causada pelo bolo alimentar no intestino. A membrana peritrófica é formada por uma estrutura bastante complexa composta por quitina, proteínas e proteoglicanas. Evidências sugerem que sua principal função é proteger o epitélio intestinal da ação das enzimas digestivas (LEHANE, 1997).

Uma das funções do intestino é digerir os lipídios da dieta, absorver e processar os produtos da digestão até sua exportação para a hemolinfa, para que estejam disponíveis para utilização no metabolismo celular. O intestino abriga as vias de síntese de diaciglicerol (DAG) nos enterócitos (forma de lipídio de utilização imediata em insetos) e também está envolvido no mecanismo de transferência de DAG do enterócito através de uma proteína transportadora (lipoforina) na hemolinfa até os sítios de utilização (ARRESE et al., 2001).

No entanto, além dos lipídios, os carboidratos e outros nutrientes também compõem parte importante da dieta de insetos. Os insetos possuem um aparelho digestivo dotado de uma diversidade de enzimas. Estudos em *Rhynchophorus ferrugineus* demonstraram composição variada de proteases digestivas nos estágios iniciais de larvas do inseto, sendo notável a diminuição da atividade das proteases próximo ao período de muda, justificada pela redução do consumo de alimento pelas larvas nesse período (ALARCÓN et al., 2002). Padrões de alta atividade proteásica também foram observados em estágios larvais de *Heliothis zea* e *Spodoptera exigua* (Lepidoptera) (BROADWAY & DUFFEY, 1985). As proteases semelhantes à tripsina (trypsin-like) são as mais presentes em insetos (BAKER, 1991).

Figura 7 – Representação esquemática do trato intestinal de Coleópteros. (ph) faringe, (es) esôfago, (pv) proventrículo, (ca) válvula cardíaca, (av) intestino médio anterior, (gc) ceco gástrico, (pv) intestino médio posterior, (pa) ampola do piloro, (mt) túbulos de malpighi, (il) íleo, (co) cólon, (rt) reto, (an) saco anal.



Fonte: RUBIO et al., 2008.

Triacilglicerol-lipase (TAG-lipase) e Glicogênio fosforilase também são enzimas importantes para a digestão de insetos. A TAG-lipase mobiliza triglicerídeos e a Glicogênio fosforilase mobiliza glicogênio, aumentando conseqüentemente os níveis de trealose na hemolinfa de insetos (STEELE, 1982; ARRESE et al., 2006). Além de mobilizar triglicerídeos, a TAG-lipase também está envolvida na decomposição de alimentos no intestino, para posterior absorção, e na mobilização de lipídios a partir do corpo gorduroso do inseto (KUNIEDA et al., 2006; ARRESE et al., 2006). A amilase cliva amido e outros polissacarídeos relacionados permitindo seu armazenamento e uso como fonte de energia. Seus produtos são substratos para atividade de outras carboidrases (glicosidase e trealase) que hidrolisam oligossacarídeos e dissacarídeos (BAKER, 1991; CHOWN & NICOLSON, 2004).

A digestão de carboidratos envolve a ação de amilases, glicosidases e trealases. A trealase assume papel particularmente importante na mobilização de energia, já que a trealose é o carboidrato mais comumente encontrado na hemolinfa de insetos (SUAREZ et al., 2005). No coleóptero *Sitophilus zeamais*, foi observada alta atividade das enzimas amilase e lipase em populações resistentes à piretróides quando comparado ao grupo controle, evidenciando a importância de um eficiente sistema enzimático para a sobrevivência de insetos (ARAÚJO et al., 2008).

Insetos fitófagos, como o *Rhynchophorus palmarum*, alimentam-se exclusivamente de tecido vegetativo e por este motivo precisam dispor de um sistema enzimático que permita a digestão de polissacarídeos, como a celulose e hemicelulose, que são os principais constituintes das paredes celulares das plantas (BACIC et al., 1988). Para digestão da celulose é necessária a atividade conjunta de três enzimas: endo- e exo-celulase, β -glicosidase ou celobiase. Ao agirem sinergicamente, as duas enzimas hidrolisam celulose gerando celobiose, que, por ação da celobiase, hidrolisam as ligações β , liberando D-glicose (YAPI et al., 2009). Dessa forma, o complexo sistema enzimático dos insetos configura-se como aspecto crucial para a manutenção da sobrevivência das espécies.

2.5 Metabolismo de lipídios em insetos

Informações descritas na literatura referente ao processo digestivo e metabolismo de lipídios em insetos, sugerem que a digestão de lipídios nesses animais ocorra de forma análoga à dos mamíferos (ARRESE et al., 2001). Os insetos são incapazes de sintetizar alguns metabólitos e precisam adquirir esses nutrientes através da alimentação (BEHMER et al., 1999), sendo o triacilglicerol o principal componente lipídico da dieta e a forma em que são estocados os ácidos graxos utilizados para a homeostase energética do inseto (BEENAKKERS et al., 1985).

O metabolismo energético de insetos ocorre, principalmente, em torno do metabolismo de lipídios. Os triacilgliceróis são os lipídios mais importantes para o balanço energético, são hidrolisados no intestino médio e seus produtos são absorvidos através do epitélio intestinal para que atinjam a hemolinfa (BEENAKKERS et al., 1985).

A digestão, absorção e transporte dos lipídios da dieta de insetos fitófagos ocorre, essencialmente, no intestino médio (TURUNEN & CRAILSHEIM, 1996). Atualmente, são considerados dois possíveis modelos de digestão de lipídios em insetos:

- Completa hidrólise de triacilglicerol a ácidos graxos e glicerol (WEINTRAB & TIETZ, 1973; TSUCHIDA & WELLS, 1988);
- Hidrólise de triacilglicerol gerando monoacilgliceróis e ácidos graxos (HOFFMAN & DOWNER, 1979).

Os dois modelos foram propostos por pesquisas que utilizaram a marcação de produtos da digestão com materiais radioativos. A hidrólise dos triacilgliceróis provenientes da dieta por ação da TAG-lipase geram ácidos graxos que serão absorvidos através do epitélio do intestino médio. Sabe-se que a absorção de ácidos graxos no intestino médio de insetos é bastante eficiente, mas não é bem compreendida quanto à forma como o transporte através dos enterócitos é realizada (TSUCHIDA & WELLS, 1988).

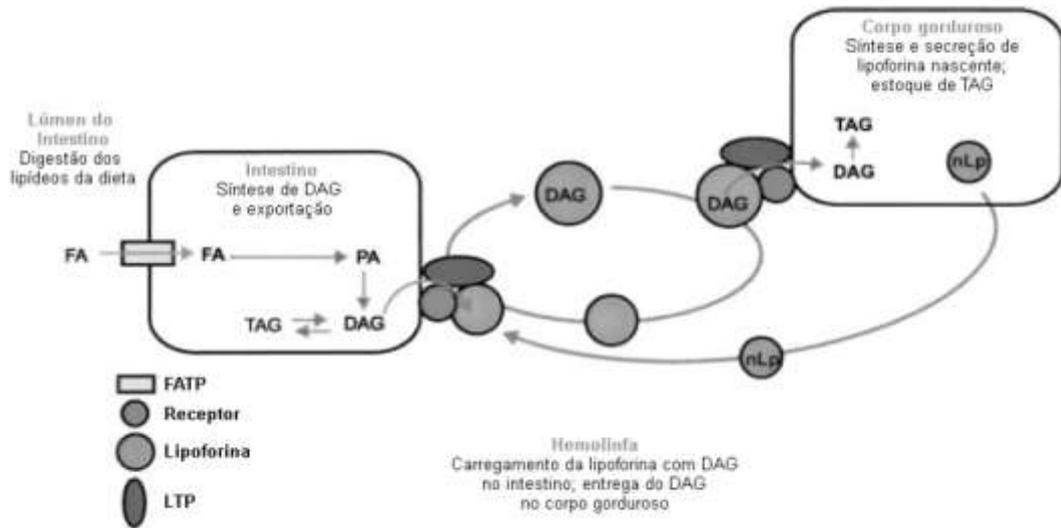
Estudos em vertebrados demonstram a participação de três proteínas na absorção dos lipídios: proteína ligadora de ácido graxo associada à membrana (FABPpm), proteína transportadora de ácidos graxos 4 (FATP4) e transportador de ácidos graxos (CD36). Essas proteínas possuem alta afinidade por ácidos graxos e a expressão de proteínas semelhantes já

foi identificada em insetos como *Manduca sexta* e *Bombix mori* (NIOT et al., 2009; SMITH et al., 1992).

Após a absorção, os produtos da digestão lipídica são convertidos em diacilglicerol (DAG). Estudos *in vivo* e *in vitro* em diferentes ordens de insetos demonstraram que o DAG é o principal lipídio presente na hemolinfa após a digestão (CANAVOSO & WELLS, 2000). A conversão dos produtos da digestão em diacilglicerol pode ocorrer pela via do ácido fosfatídico (síntese *de novo* a partir de glicerol 3-fosfato) ou pela acilação estereoespecífica de 2-monoacilglicerol. Estas duas vias são as mesmas utilizadas por mamíferos, porém, ao contrário do que ocorre em mamíferos, a via do ácido fosfatídico é a predominante no metabolismo dos insetos (ARRESE et al., 2001). Em larvas de *Pieris brassicae*, foi observado que o glicerol consumido da dieta foi utilizado nas células do intestino médio para a síntese de sn-1,2-DAG, indicando a atuação pela via do ácido fosfatídico (TURUNEN, 1993). Também em *M. sexta*, estudos mostraram que a síntese de DAG é realizada pela via do ácido fosfatídico, sem contribuição da via do monoacilglicerol (CANAVOSO & WELLS, 2000).

Sugere-se que os ácidos graxos absorvidos são posteriormente convertidos em triacilglicerol, funcionando como reserva de lipídios de onde o diacilglicerol será liberado para a hemolinfa para utilização (MAJEROWICZ, 2009). Este mecanismo assegura a absorção máxima de ácidos graxos a partir do lúmen, contribuindo para a manutenção de uma baixa concentração intracelular de DAG, o qual pode ser tóxico em altas concentrações (Figura 8). Um estudo com *M. sexta* demonstrou que o DAG é realmente o lipídio presente em maior quantidade na hemolinfa. Através da marcação dos lipídios da dieta com trioleína, o autor encontrou mais de 90% do marcador ligado à DAG na hemolinfa do inseto. Além disso, mais de 70% do marcador foi encontrado, após 4 horas, no corpo gorduroso do inseto na forma de TAG (TSUCHIDA & WELLS, 1988). Este fato confirma a hipótese proposta para a digestão em insetos, de que os lipídios da dieta são hidrolisados, absorvidos, convertidos em DAG e transportados pela hemolinfa até sua estocagem no corpo gorduroso, onde são imediatamente reconvertidos à TAG.

Figura 8 – Esquema do processo de digestão de lipídios da dieta em insetos.



Fonte: MAJEROWICZ, 2009.

Os ácidos graxos obtidos da dieta são convertidos em diacilglicerol e transportados das células intestinais, pela hemolinfa, até o corpo gorduroso (BEENAKKERS et al., 1985) através de uma lipoproteína chamada lipoforina. De forma contrária ao que ocorre nos vertebrados, onde lipoproteínas são sintetizadas para transportar os lipídios da dieta, nos insetos os lipídios são adicionados diretamente à lipoforina já presente na hemolinfa (CHINO, 1985; SOULAGES & WELLS, 1994). A lipoforina é carregada com esses lipídios no intestino e circula pela hemolinfa, transportando-os até outros órgãos, como o corpo gorduroso, onde eles serão descarregados e estocados. A lipoforina também transporta os lipídios já estocados no corpo gorduroso para os sítios de utilização. O principal lipídio transportado é o diacilglicerol, mas o colesterol, hidrocarbonetos, ácidos graxos livres, carotenoides e fosfolipídios também podem ser transportados (CHINO & GILBERT, 1971; GONDIM et al., 1989). A lipoforina não é endocitada por nenhum tecido; após liberar os lipídios para estoque no corpo gorduroso, sua função de transporte é restabelecida (TSUCHIDA & WELLS, 1988; SOULAGES & WELLS, 1994). Estudos bioquímicos e imunocitoquímicos em larvas de *Aeschna cyanea*, uma espécie de libélula, confirmam a hipótese de que a lipoforina não é endocitada por células intestinais durante seu carregamento (BAUERFEIND & KOMNICK, 1992). Uma das particularidades do metabolismo de lipídios em insetos é a especificidade da lipoforina para o tecido de entrega. A mesma lipoproteína pode fazer a entrega de DAG para o corpo gorduroso, ou transportar mais hidrocarbonetos para a cutícula de *M. sexta*, a depender da situação metabólica (ARRESE et al., 2001),

suportando as hipóteses de que há a presença de um receptor para a lipoforina envolvida no processo de transferência nos tecidos.

A literatura científica pouco consegue explicar a respeito do processo de transferência dos ácidos graxos digeridos do intestino para a lipoforina da hemolinfa. Autores relatam que a transferência inicia-se por ligação da lipoforina a um receptor específico para ela presente nos tecidos, essa transferência dos lipídios ocorre na superfície das células, sem que ocorra endocitose da proteína transportadora (GONDIM et al., 1989; GRILLO et al., 2003). Gondim e Wells (2000) conseguiram caracterizar a ligação da lipoforina a receptores de células intestinais de larvas de *M. sexta* utilizando preparações de membrana. Em *M. sexta*, uma proteína de membrana com atividade característica de ligação à lipoforina foi identificada no corpo gorduroso das larvas. Após processos de purificação, esse suposto receptor foi isolado e identificado como uma proteína de 120 kDa (TSUCHIDA & WELLS, 1990).

A participação de uma partícula transferidora de lipídios (LTP) também tem sido descrita como de grande importância nessa transferência. A LTP é um lipoproteína de densidade muito alta (VHDL) que já foi isolada a partir da hemolinfa de várias espécies (BLACKLOCK & RYAN, 1994; RYAN et al., 1986) e sua função está relacionada, provavelmente, com a redistribuição de lipídios entre lipoforinas e entre lipoforina e as membranas dos tecidos (ARRESE et al., 2001; RYAN & VAN DER HORST, 2000). Sendo assim, o destino final do transporte dos lipídios da dieta é a estocagem no corpo gorduroso. O corpo gorduroso funciona nos insetos como um tecido de função análoga à do fígado e do tecido adiposo em vertebrados, sendo responsável pela síntese da maior parte das lipoproteínas presentes na hemolinfa e o principal sítio de estocagem de glicogênio (BEENAKKERS et al., 1985).

Dessa forma, em suma, o metabolismo de lipídios em insetos inicia-se na digestão dos lipídios oriundos da dieta através da ação de lipases, sendo os ácidos graxos liberados pela digestão absorvidos através dos enterócitos e transportados até o local de estoque ou utilizados através de uma lipoproteína chamada lipoforina. Para que ocorra esse transporte, a lipoforina liga-se a receptores específicos presentes na membrana dos enterócitos, como descrito na literatura. Os ácidos graxos são transportados ligados à lipoforina pela hemolinfa até o órgão-alvo, havendo interação com uma segunda lipoproteína chamada de LTP

(partícula transferidora de lipídios), favorecendo a entrega do lipídio transportado para estocagem (corpo gorduroso) ou para utilização imediata em outro tecido.

2.6 Triacilglicerol lipase (TAG-lipase)

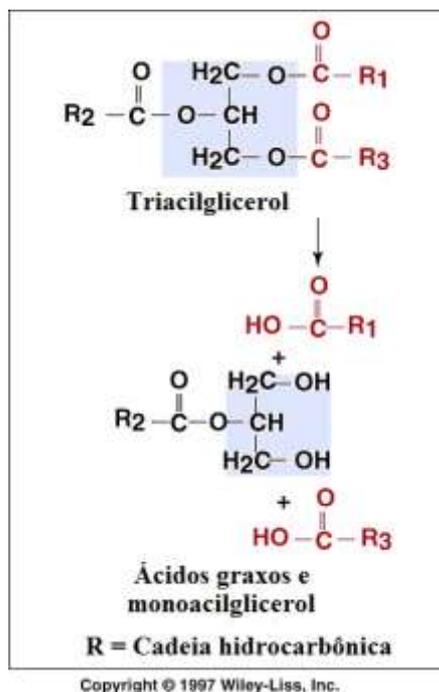
Assim como em outros animais, os insetos obtêm seus nutrientes através da alimentação, sendo na fase larval onde ocorre o grande armazenamento de nutrientes. O triacilglicerol (TAG) é o principal componente lipídico da dieta de insetos, incluindo também fosfolipídios e esteróis (TURUNEN & CRAILSHEIM, 1996). As células intestinais produzem lipases que hidrolisam TAGs, formando monoacilgliceróis e ácidos graxos livres, para que então sejam absorvidos (CANAVOSO et al., 2001). Em insetos, as lipases têm papéis-chave na aquisição, armazenamento e mobilização de lipídios e também são fundamentais para processos fisiológicos que sustentam a reprodução de insetos, desenvolvimento, defesa contra patógenos e estresse oxidativo, e sinalização por liberação de feromônios (HORNE et al., 2009).

O intestino médio constitui o principal local de digestão e absorção de lipídios provenientes da dieta, portanto, a atividade de enzimas como triacilglicerol lipase, fosfolipases e colesterol esterases no intestino e em outros tecidos torna-se imprescindível para o metabolismo energético de insetos (GRILLO et al., 2007; CHRISTELLER et al., 2011). Por ação dessas enzimas, os produtos gerados pela digestão (ácidos graxos livres, colesterol não-esterificado e lisofosfolipídios) são absorvidos através das células epiteliais do intestino até alcançarem a hemolinfa, porém a forma como esses compostos são incorporados ao intestino ainda não é bem esclarecida (MAJEROWICZ & GONDIM, 2013).

A TAG- lipase tem sido bastante estudada, porém, apenas em extratos brutos de algumas espécies de insetos. A enzima, durante a catálise, hidrolisa ligações ésteres de moléculas de triacilglicerol, com preferência por ácidos graxos insaturados e que estejam nas posições 1 e 3 da molécula (Figura 9) (BOLLADE et al., 1970; HOFFMAN & DOWNER, 1979; PISTILLO et al., 1998). Diferentes lipases de diferentes espécies possuem regiões da sequência de aminoácidos altamente conservadas, principalmente as regiões responsáveis pela ligação dos lipídios à enzima (ligação do substrato à enzima), que consiste na sequência dos aminoácidos Gly-X-Ser-X-Gly. Já a tríade catalítica Ser-Asp-His presente no sítio ativo é

outra sequência bastante conservada entre diferentes lipases, sendo sua presença essencial para a atividade catalítica, sendo o resíduo de serina da tríade indispensável para a catálise. (HIDE et al., 1992). A importância do resíduo de serina da tríade catalítica foi constatada em estudos com substituição desses resíduos em sequências altamente conservadas de lipoproteína lipase de humanos. Após as substituições foi observada diminuição significativa da atividade da enzima (FAUSTINELLA et al., 1991). Estudos utilizando técnicas de cristalografia em lipase pancreática de humanos revelaram a presença de um resíduo de serina na localização N-terminal da sequência de aminoácidos, correspondente ao resíduo de serina da tríade catalítica (WINKLER et al., 1990).

Figura 9 – Mecanismo de ação das Triacilglicerol lipases



Fonte: Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas, THOMAS DEVLIN, 5ª edição.

Outro componente bastante conservado nas sequências de todos os membros da família lipase são os resíduos de cisteína. Eles aparecem conservados em 8 posições e provavelmente possuem papel importante na formação de pontes dissulfeto necessárias para a manutenção da estrutura e função da enzima (HIDE et al., 1992).

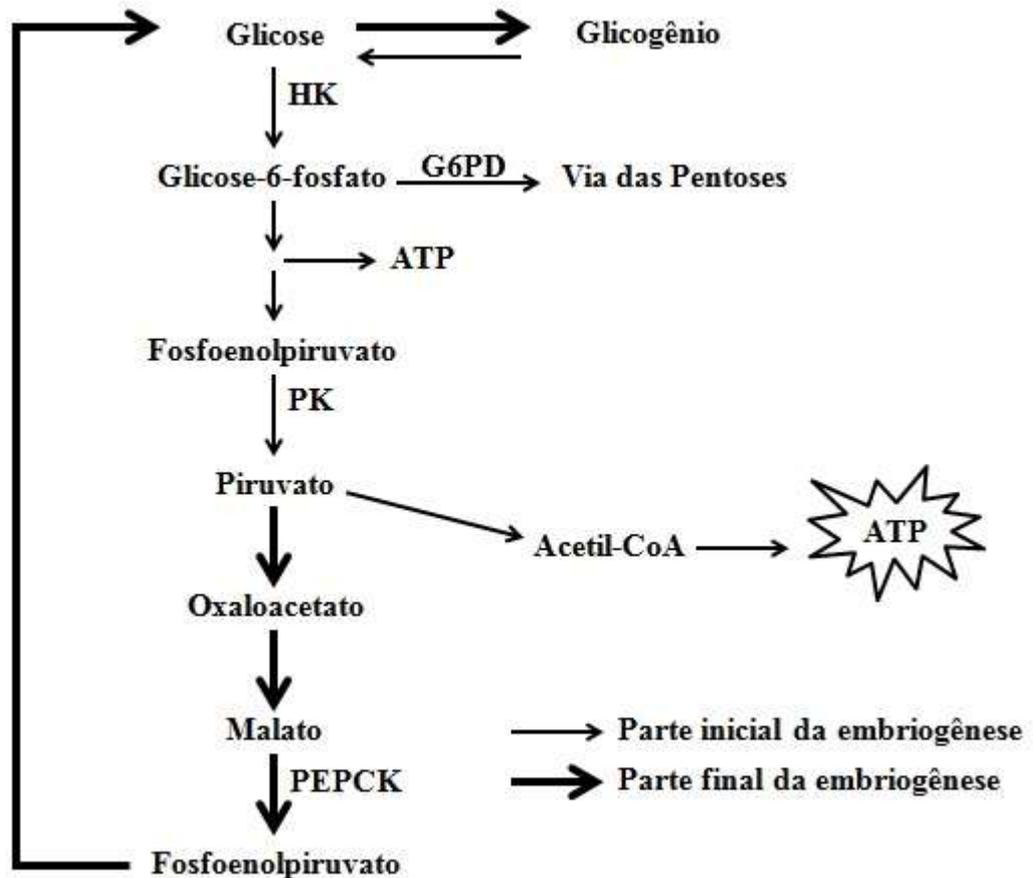
Estudos demonstraram que, no intestino do inseto *Periplaneta americana*, a ação da lipase promove a clivagem de ácidos graxos localizados nas posições sn-1 e sn-3 da molécula de triacilglicerol, sugerindo que há grande analogia entre lipases de insetos e lipases de mamíferos (BOLLADE et al., 1970). Estudos com insetos revelaram a presença de atividade lipásica em algumas espécies como *Locusta migratoria*, *Drosophila melanogaster*, *Panstrongylus megistus*, *Manduca sexta*, *Bombyx mori* e *Pieris brassicae* (WEINTRAUB & TIETZ, 1973; SMITH et al., 1994; CANAVOSO et al., 2004; ARRESE & WELLS, 1994; PONNUVEL et al., 2003; ZIBAE, 2012).

Em mamíferos, as lipases podem ter função digestiva (lipase gástrica e pancreática) e também na mobilização de reservas energéticas (lipoproteína lipase) (WINZELL et al., 1998). As funções das lipases em insetos são correspondentes, confirmando a importância dessa classe de enzimas para o metabolismo energético.

2.7 Metabolismo de glicídios em insetos

O metabolismo de glicídios é de grande importância para o desenvolvimento e homeostase energética de todos os organismos, sendo o catabolismo de carboidratos a via principal de obtenção de energia durante o desenvolvimento embrionário (GUIZZO et al., 2012). Durante a embriogênese, período de maior demanda energética para todos os organismos, o catabolismo de biomoléculas, como proteínas, carboidratos e lipídios assume posição importante. Os níveis de atividade catabólica de carboidratos e a eficiência do ciclo de Krebs constituem vias reguladoras da homeostase energética em insetos (CAMPOS et al., 2006). Durante o metabolismo energético, as unidades de glicose-6-fosfato que são necessárias como fonte de carbono para o ciclo de Krebs, são disponibilizadas de acordo com as reservas de glicose ou por fontes externas ao inseto (THOMPSON & DAHLMAN, 1999). Durante o desenvolvimento do inseto, a glicólise é a via do catabolismo de carboidratos mais intensa (LAHNSTEINER & PATARNELLO, 2003). Moraes et al. (2007), em estudos de atividade enzimática e quantificação de metabólitos da via glicolítica em *Boophilus microplus*, propuseram esquema para o metabolismo de glicose durante a fase embrionária, fornecendo informações sobre o funcionamento dessa via também para outras fases do desenvolvimento (Figura 10).

Figura 10 – Esquema proposto para o metabolismo de glicose em *Boophilus microplus* durante o desenvolvimento embrionário. HK — Hexoquinase, G6PDH — Glicose 6-fosfato desidrogenase, PK — Piruvato Quinase e PEPCK — Fosfoenolpiruvato quinase.



Fonte: Adaptado de MORAES et al., 2007.

Assim como em mamíferos, em insetos, a glicose é armazenada na forma de glicogênio, sendo a trealose a forma disponível de glicose na hemolinfa em maiores concentrações (BECKER et al., 1996). A trealose é um dissacarídeo não-redutor constituído por duas moléculas de glicose e presente em altas concentrações na hemolinfa da maioria dos insetos testados, com concentrações variadas, a depender do estado de alimentação. Estudos sugerem que a trealose é sintetizada no corpo gorduroso, sendo formada a partir do glicogênio estocado, e através da ação da enzima trealase, sua hidrólise fornece a glicose na hemolinfa para utilização imediata. Este dissacarídeo é liberado para a hemolinfa de acordo com a demanda energética, tendo seus níveis aumentados durante o desenvolvimento embrionário e contração durante o voo, por exemplo (LOPES & VILLELA, 1972). A trealose da hemolinfa

parece ser a fonte principal de síntese de reservas de glicogênio em ovos de insetos (SANTOS et al., 2008), como também demonstrado por Katagiri et al. (1998) em estudos com fêmeas de *Bombix mori*, onde a injeção de um inibidor de trealase (Trehazolin) causou redução do conteúdo de glicogênio nos ovos e aumento da concentração de trealose na hemolinfa.

A maior ou menor viabilidade dos insetos em campo está relacionada com a estocagem suficiente de nutrientes na fase larval, que serão utilizados como fonte de energia nos processos de metamorfose, provendo reservas de nutrientes para o inseto adulto (MIRTH & RIDDIFORD, 2007).

2.8 Importância dos estudos sobre a biologia dos insetos

Devido às poucas informações a respeito da biologia e metabolismo dos insetos, o controle de diversas pragas em pequenas plantações é realizado de forma precária e ineficaz, na maioria das vezes. A infestação por *R. palmarum* em pequenas e grandes plantações de palmáceas constitui grande problema para os produtores. Ainda não há forma eficaz de controle para a praga, sendo o controle realizado pela remoção mecânica dos insetos adultos, com o auxílio de armadilhas contendo feromônios de agregação sintéticos (NAVARRO et al., 2002).

O controle ineficaz e o aumento da resistência das pragas a inseticidas agrícolas têm levado a um maior interesse dos pesquisadores em desenvolver bioinseticidas que tragam maior custo-benefício e que sejam eficazes no controle, além de serem biocompatíveis. Dessa forma, o número de estudos sobre a biologia dos insetos e principalmente sobre o sistema digestivo deles tem aumentado nas últimas décadas, com o propósito de identificar novos alvos potenciais para controle. Esses meios de controle de pragas de insetos baseados em sua biologia são também chamados de meios de controle biorracionais (SILVA et al., 2012).

Atualmente, algumas das principais técnicas no controle de pragas baseiam-se em atuar na inibição seletiva de enzimas digestivas do inseto, provocando efeitos prejudiciais no crescimento das larvas, por evitarem a digestão e assimilação de nutrientes, causando retardo do desenvolvimento e conseqüente morte (ALARCÓN et al., 2002). É conhecido que as

próprias plantas possuem mecanismos de defesa contra fitófagos baseados na inibição de proteases do inseto-praga (RYAN, 1981).

O motivo para o sistema digestivo de insetos serem o grande foco das pesquisas é a sua potencialidade como alvo para controle. As funções digestivas representam um modelo riquíssimo de informações sobre seu metabolismo, já que os insetos fornecem excelente modelo para estudar enzimas digestivas, especialmente porque existem espécies adaptadas a quase todos os tipos de habitat e hábitos alimentares (BÉDIKOU et al., 2010).

Com os avanços das técnicas de proteômica, genômica e metabolômica, motivadas pelo número crescente de genomas completos de plantas e insetos, há uma grande expectativa de que mais detalhes sejam revelados sobre a fisiologia da digestão em insetos, favorecendo novas perspectivas para técnicas de controle (SILVA et al., 2012).

O epitélio intestinal é a maior interface entre um inseto e o meio ambiente. Neste conceito, é razoável se pensar que a interferência no processo digestivo dos insetos deva culminar em comprometimento da sua sobrevivência. Hoje, a procura por novos métodos de controle, que agem através do intestino, vem crescendo e estratégias baseadas em biomoléculas (inibidores de enzimas, lectinas, quitinases, etc.) já estão sendo testadas. Porém, antes de pensarmos em métodos de controle temos que ter, primeiramente, um conhecimento sólido sobre a fisiologia do inseto a ser combatido. Assim, os estudos sobre morfologia e processos digestivos se tornam essenciais.

2.9 Guanilidrazonas

As guanilidrazonas representam um grupo de compostos que compreendem diferentes classes químicas, contendo um grupo guanidino ligado a um grupo hidrazina (LEE et al., 2005). As guanilidrazonas são compostos que possuem variados efeitos farmacológicos já descritos na literatura. Guanilidrazonas apresentam atividade inibitória sobre serino-proteases (DIMENSIONAL PHARMACEUTICALS, 1999). Serino-proteases estão envolvidas no processo de digestão (Tripsina e Quimotripsina), formação e dissolução de coágulos (Trombina, Plasmina) (TAPPARELLI et al., 1993), amplificação da resposta imunitária (elastase) e outras atividades biológicas.

São também potentes inibidores da enzima NO sintase e por diminuírem a liberação de óxido nítrico (NO), podem ser utilizados como anti-inflamatórios por inibirem a secreção de citocinas por macrófagos e outras células (inibem inflamação mediada por NO). Além disso, por inibirem seletivamente NO sintase, esses compostos podem ser utilizados no tratamento de enfermidades cardiovasculares e de suas complicações, quando causadas pela liberação de NO. O efeito de guanilidrazonas sobre a NO sintase ocorre devido à ligação covalente e irreversível com o grupo prostético da enzima, causando perda da atividade catalítica (LEE et al., 2005). Guanilidrazonas também inibem a captação de arginina por células tumorais e inflamatórias (CYTOKINE PHARMASCIENCES, 2001).

Bairwa et al. (2010) descreveram atividade anti-tuberculose de compostos híbridos formados por guanilidrazonas e ácido cinâmico, tendo a porção guanilidrazona papel no sequestro da endotoxina lipopolissacarídica bacteriana, devido ao caráter catiônico de sua estrutura. Guanilidrazonas também já foram descritas devido ao seu potencial inibitório sobre o estresse oxidativo presente nas complicações da Diabetes. Complicações pulmonares crônicas em diabéticos são bastante comuns, sendo causada principalmente pelo estresse oxidativo gerado e pela formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs). As guanilidrazonas previnem a formação de AGEs por possuírem em sua estrutura um grupamento hidrazina que reage com grupamentos glioxal, metilglioxal e desoxiglicosona (THORNALLEY, 2003). Além disso, possuem efeito direto (em doses baixas) sobre o estresse oxidativo por atuarem sobre a catalase e catabolismo de poliaminas (NILSSON, 1999).

Devido à variedade de atividades biológicas onde serino-proteases, NO sintase e mecanismos do estresse oxidativo estão envolvidos, o desenvolvimento e pesquisa por novas substâncias (como guanilidrazonas) que atuem nesses alvos têm aumentado bastante nos últimos anos, a fim de buscar compostos mais seletivos e com menos toxicidade, a fim de prover novas alternativas de tratamento para diversas enfermidades e também para outras aplicações que envolvam esses mecanismos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar o metabolismo energético das larvas do inseto *Rhynchophorus palmarum*, e caracterizar a atividade da TAG-lipase em diferentes tecidos.

3.2 Objetivos específicos

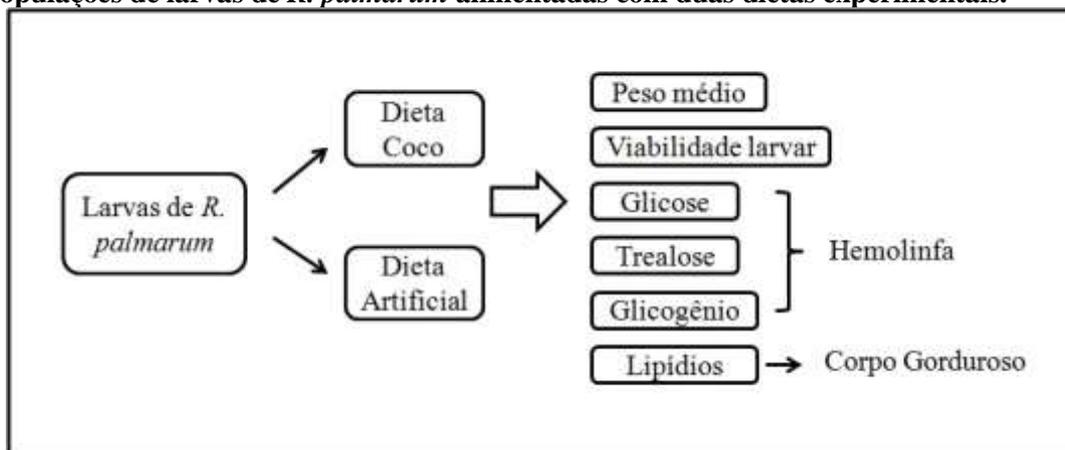
- Manter criação de larvas de *Rhynchophorus palmarum* em laboratório:
 - Fazer estudo comparativo da viabilidade das larvas submetidas à dieta com mesocarpo de coco e dieta artificial, avaliando o peso médio;
 - Avaliar a disponibilidade de carboidratos na hemolinfa do inseto (glicose, trealose e glicogênio) e de lipídios no corpo gorduroso.
- Caracterizar atividade da TAG-lipase em diferentes tecidos de larvas de *Rhynchophorus palmarum*;
 - Avaliar a atividade lipásica em diferentes condições (pH, temperatura, curva temporal, curva de inibição, efeito do sal);
 - Avaliar diferenças na atividade entre os estágios de desenvolvimento;
 - Avaliar o efeito de guanilidrazonas sintéticas na atividade TAG-lipase.

4 METODOLOGIA

4.1 Avaliação da viabilidade larvar frente a duas dietas experimentais

A metodologia da avaliação da viabilidade larvar de *R. palmarum* foi esquematizada na figura 11.

Figura 11 – Esquema da metodologia utilizada para dosagem de variados parâmetros em populações de larvas de *R. palmarum* alimentadas com duas dietas experimentais.



Fonte: Autor, 2014

4.1.1 Insetos

As larvas do inseto *Rhynchophorus palmarum* foram obtidas de uma colônia mantida no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Insetos da Universidade Federal de Alagoas. As larvas foram mantidas a 28°C com umidade relativa entre 70 e 80% e alimentadas com mesocarpo de coco ou dieta artificial (SARRO et al., 2005) (Tabela 1) em quantidades equivalentes.

4.1.2 Avaliação do desenvolvimento larvar e peso médio

Grupos de 20 larvas, três dias após a eclosão foram submetidas à dieta artificial (Tabela 1) e dieta natural com mesocarpo de coco, em quantidades equivalentes. O desenvolvimento larvar (viabilidade e ganho de peso) e demais parâmetros foram acompanhados durante 15, 30, 45 e 60 dias.

Tabela 1 – Componentes da dieta artificial de larvas de *Rhynchophorus palmarum*.

Componentes	Quantidades
Ácido propiônico	0,37mL
Açúcar refinado	5,5g
Ágar-ágar	10g
Água destilada	100mL
Aveia em flocos	17g
Farinha de milho fina (fubá)	32,5g
Fibra de cana	26g
Solução Vitamínica	10mL

Fonte: Adaptado de SARRO et al., 2005.

4.1.3 Dosagem dos níveis de glicose, trealose e glicogênio das larvas

A hemolinfa das larvas foi coletada em solução salina contendo feniltiouréia (3-13mg/mL) (Sigma Aldrich[®], St. Louis, EUA), mantidas em gelo, centrifugadas (5min - 13000g e o sobrenadante utilizado. A concentração de glicose foi determinada por incubação durante 30 min a 37 °C utilizando kit comercial, conforme as instruções do fabricante (glucox[®] Kit enzimático para dosagem de glicose; Doles, Inc.). Para determinação de trealose, as amostras foram incubadas com trealase (0,1 U, Sigma Aldrich[®], St. Louis, EUA) em tampão fosfato 40 mM, pH 5,5 por 4 horas a 40 °C (MARIANO et. al., 2009). Após a incubação, a quantidade de glicose derivada da hidrólise da trealose foi determinada como descrito acima.

Na avaliação do teor de glicogênio as larvas foram dissecadas e os corpos gordurosos retirados para análise. Os tecidos homogeneizados em solução tampão contendo acetato de sódio 10 mM, pH 4,8 foram submetidos a centrifugação a 10.000g por 10 min. Alíquotas do sobrenadante foram incubadas com 1 unidade de amiloglicosidase (Sigma Aldrich[®], St. Louis, EUA) por 4 h a 40 °C e a concentração de glicose foi determinada a partir do glicogênio, por incubação durante 30 min a 37 °C.

4.1.4 Dosagem dos níveis de lipídios no corpo gorduroso das larvas

O ensaio com vanilina foi utilizado para medida de lipídios no corpo gorduroso (WILLIAMS et al., 2011). Aos tubos com os tecidos homogeneizados foi adicionado ácido sulfúrico, e em seguida levados a incubação a 95 °C por 10 min. Alíquotas de 5 mL de vanilina foram adicionadas e as amostras mantidas no escuro por 45 min com conseguinte leitura a 530 nm. O cálculo da concentração de lipídios nas amostras foi realizado utilizando uma curva padrão de trioleína.

4.2 Caracterização da atividade TAG-lipase

A metodologia da caracterização da atividade TAG-lipase em *R. palmarum* foi esquematizada na figura 12.

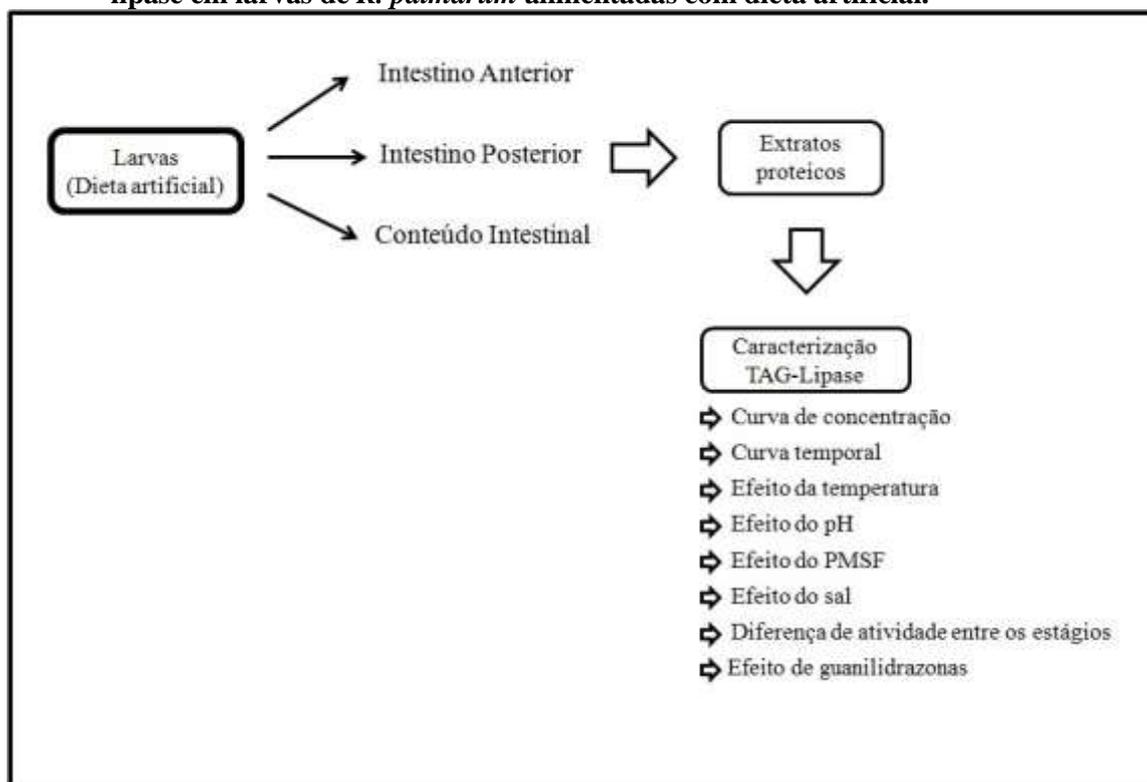
4.2.1 Preparação dos extratos proteicos para avaliação da atividade Triacilglicerol-lipase

Larvas de 4º instar de *R. palmarum* foram dissecadas em salina 0,15M e o intestino médio anterior, intestino médio posterior e o conteúdo intestinal foram posteriormente macerados em salina, separadamente, e sonicados por 10 min em banho sonicador (Ultra Cleaner 700, Unique®, São Paulo, Brasil). Em seguida, os macerados foram centrifugados (6.000 g / 20 min) em centrífuga refrigerada (Sigma 3K30 Centrifuge, Sigma Centrifuges®, Shrewsbury, Inglaterra) e os sobrenadantes obtidos foram utilizados imediatamente como fonte de enzima para as medidas de atividade. Os testes de atividade foram realizados com larvas provenientes da dieta que culminou em maior viabilidade. Neste trabalho, o intestino médio anterior e posterior foram mencionados como intestino anterior e intestino posterior.

4.2.2 Dosagem de proteínas

As proteínas solúveis dos extratos proteicos de tecidos digestivos das larvas foram dosadas pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino como padrão.

Figura 12 - Esquema da metodologia utilizada para caracterização da atividade TAG-lipase em larvas de *R. palmarum* alimentadas com dieta artificial.



Fonte: AUTOR, 2014.

4.2.3 Dosagem de atividade TAG- lipase

A dosagem da atividade Triacilglicerol Lipase (TAG-lipase) foi realizada pelo método colorimétrico proposto por Choi et al (2003) utilizando 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) e 2,3-dimercapto-1-propanol tributirato (DMPTB), ambos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA). O princípio do teste consiste no uso do DMPTB como substrato para a TAG-lipase presente na amostra. Os grupos tiol livres que são gerados a partir da hidrólise do DMPTB pela lipase, reduzem o DTNB desenvolvendo uma coloração amarela. Para otimizar este método, anteriormente descrito por Kurooka et al. (1977), foi utilizado como branco uma mistura de reação sem a presença do substrato DMPTB e com a presença da amostra, a fim de contabilizar a atividade de esterases não-específicas.

A mistura de reação padrão contém 0,2 mM DMPTB, 0,8 mM DTNB, 1 mM EDTA, 0,05% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) e água deionizada. Para a detecção específica da atividade da lipase nos extratos de tecidos, foi utilizado um branco que não continha DMPTB. A mistura de reação foi incubada com os extratos proteicos por 30 min à 37 °C em

banho-maria (Water bath 1100, FANEM[®], Guarulhos, Brasil) e a leitura realizada posteriormente em espectrofotômetro UV VIS (UV mini-1240, Shimadzu[®], Quioto, Japão) no comprimento de onda de 405nm (CHOI et al., 2003). Todos os testes foram realizados em triplicata e expressos nos gráficos em atividade específica (U de enzima/ μ g de proteína).

4.2.4 Medida da atividade TAG-lipase em função da concentração dos extratos proteicos

A atividade TAG-lipase foi avaliada conforme descrito no tópico anterior. A atividade enzimática foi avaliada nos extratos de intestino anterior e intestino posterior nas concentrações de 2,5 μ g/mL, 5 μ g/mL, 7,5 μ g/mL e 10 μ g/mL de proteína. Nos testes com o extrato do conteúdo intestinal, a atividade enzimática foi avaliada nas concentrações de 1 μ g/mL, 2 μ g/mL, 3 μ g/mL, e 4 μ g/mL de proteína. Todos os testes foram feitos em triplicata.

4.2.5 Medida da atividade TAG-lipase em função do tempo

Para avaliação da curva temporal, a atividade TAG-lipásica foi medida após diferentes tempos de incubação à 37° C. Para os testes de caracterização da atividade foram utilizados concentrações padrão dos extratos proteicos de cada tecido. Foram utilizados 5 μ g/mL de proteína para os testes com intestino anterior e posterior e 4 μ g/mL de proteína para os testes com conteúdo intestinal.

4.2.6 Efeito da temperatura

Para avaliação do efeito da temperatura na atividade enzimática, a mistura de reação com os extratos nas concentrações padrão foram incubados em diferentes temperaturas e a medida realizada conforme descrito no item 4.2.3.

4.2.7 Efeito do pH

A medida da atividade lipásica em diferentes valores de pH foi realizada utilizando tampão Tris-HCl 1M (pH 7,0-9,0) e tampão Acetato de Sódio 1M (pH 5,5-6,5). O pH foi ajustado pela adição de HCl ou ácido acético. O protocolo de dosagem foi realizado como descrito no item 4.2.3.

4.2.8 Efeito do Fluoreto Fenilmetanosulfonil (PMSF)

Para determinação do efeito do PMSF (Sigma Aldrich[®], St. Louis, EUA) sobre a atividade lipásica, concentrações crescentes dessa substância foram incubadas por 10 minutos com o extrato proteico e a atividade lipásica foi medida como descrito no item 4.2.3.

4.2.9 Efeito da força iônica sobre a atividade lipásica

Para determinação do efeito do sal sobre a atividade lipásica, concentrações crescentes de cloreto de sódio (NaCl) (Vetec[®], Rio de Janeiro, Brasil) foram adicionadas à mistura de reação e a atividade lipásica foi medida como descrito no item 4.2.3.

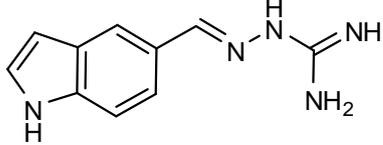
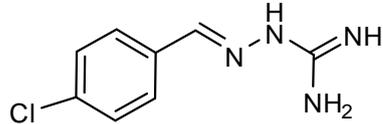
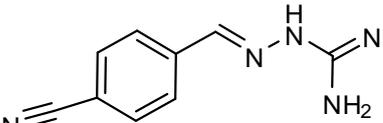
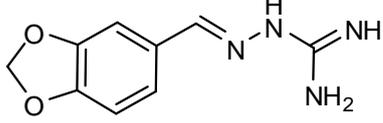
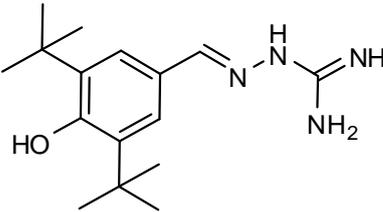
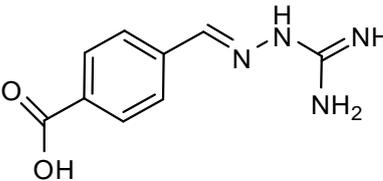
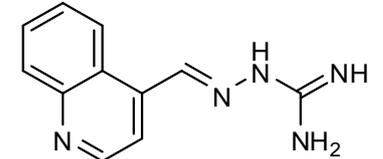
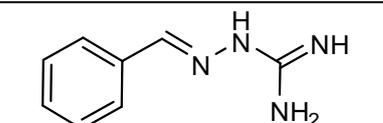
4.2.10 Medida da atividade lipásica em diferentes estágios de desenvolvimento do *R. palmarum*

Os extratos proteicos dos tecidos foram obtidos como descrito no item 4.2.1. Os estágios de desenvolvimento do inseto onde a atividade enzimática foi avaliada foram: larva (L2), larva (L4), pupa e inseto adulto. A dosagem da atividade foi realizada conforme descrito no item 4.2.3.

4.2.11 Efeito de guanilidrazonas na atividade TAG-lipase

As guanilidrazonas foram obtidas por síntese realizada pelo Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais (LPqRN) da Universidade Federal de Alagoas, foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior. Todas as guanilidrazonas foram sintetizadas na forma de sais de cloridratos, a fim de viabilizar boa solubilidade em meio aquoso (semelhante ao meio fisiológico). As estruturas químicas e os pesos moleculares dessas substâncias estão dispostos na tabela 2 e 3, respectivamente (SILVA-JUNIOR, 2013; FRANÇA, 2014; EPIFÂNIO, 2011).

Tabela 2 – Estruturas químicas das Guanilidrazonas sintéticas testadas.

W001	(<i>E</i>)-2-((1H-indol-5-il)metileno) hidrazinacarboximidamida	
W002	(<i>E</i>)-2-(4-clorobenzilideno) hidrazinacarboximidamida	
W003	(<i>E</i>)-2-(4-cianobenzilideno) hidrazinacarboximidamida	
W009	(<i>E</i>)-2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetileno) hidrazinacarboximidamida	
W010	(<i>E</i>)-2-(3,5-di- <i>tert</i> -butil-4-hidroxibenzilideno)hidrazinacarboximidamida	
W011	(<i>E</i>)-4-((2-carbamidoilhidrazona)metil) ácido benzoico	
W013	(<i>E</i>)-2-(quinolin-4-ilmetileno) hidrazinacarboximidamida	
W015	(<i>E</i>)-2-benzilidenohidrazina carboximidamida	

Fonte: AUTOR, 2014.

Para determinação do efeito dessas substâncias sobre a atividade lipásica, 0,2 mM de cada substância foi pré-incubada com o extrato proteico dos tecidos por 10 min e somente depois foram incubados por 30 min com a mistura de reação e realizada a leitura conforme o protocolo. O efeito das guanilidrazonas também foi testado em uma lipase comercial de *Candida Rugosa* (Sigma Aldrich[®], St. Louis, EUA), como controle positivo.

Tabela 3 – Pesos moleculares das Guanilidrazonas.

Guanilidrazona	Peso molecular
W001	237,69 g/mol
W002	233,10 g/mol
W003	223,66 g/mol
W009	242,66 g/mol
W010	326,86 g/mol
W011	242,66 g/mol
W013	249,79 g/mol
W015	198,65 g/mol

Fonte: AUTOR, 2014.

4.2.12 Docking molecular da guanilidrazona W011

Todas as estruturas unidimensionais das guanilidrazonas testadas foram desenhadas utilizando a versão *trial* do software *ChemDraw Ultra 10*[®] e, posteriormente, convertidas em estruturas tridimensionais, nos formatos *.pdb**, utilizando o *trial software ChemDraw 3D*[®], ambos desenvolvidos pela *CambridgeSoft*, em 1986 e atualizado até 2005.

Para a execução dos experimentos de *docking* molecular foi utilizado um *software* amplamente empregado com tal finalidade, o *AutoDock Tools*[®], versão 1.5.6.

A estrutura tridimensional da Lipase de *Candida rugosa* utilizada foi obtida do *Protein Data Bank* (PDB) sob o código 1TRH. Os contatos polares e pontes de hidrogênio formados no complexo ligante-enzima foram previstos utilizando o *trial software PyMol*[®]. O *docking* molecular foi realizado em parceria com o Laboratório de Química Medicinal (LQM) da Universidade Federal de Alagoas, supervisionado pelo Prof. Dr. João Xavier de Araújo Junior e realizado pelo mestrando Edeildo Ferreira da Silva Júnior.

4.3 Análise estatística

Os gráficos foram plotados utilizando o software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego). Todos os dados são expressos como média \pm média do erro padrão. A comparação entre os grupos foi realizada pela análise de variância (ANOVA) seguida por teste de Bonferroni. Os níveis de significância foram 0,05 e os valores de p são indicados nas legendas das figuras.

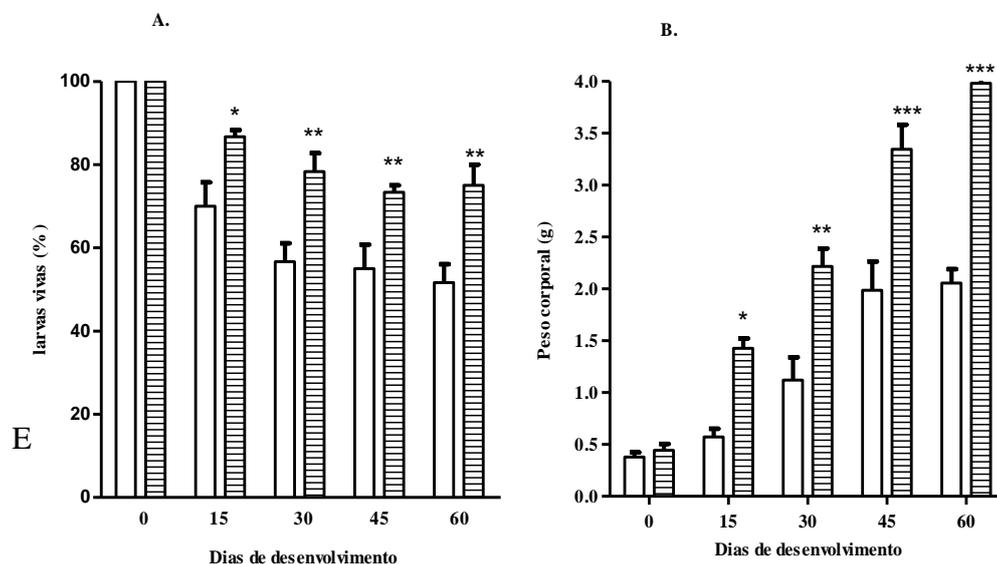
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da viabilidade larvar frente a duas dietas

Os testes de viabilidade larvar mostraram que larvas submetidas à dieta artificial tiveram uma porcentagem de mortalidade bem inferior quando comparadas as larvas em dieta natural. Essa diferença aumenta respectivamente nos dias 15, 30, 45 e 60, onde em dieta natural (mesocarpo do coco) a mortalidade é em torno de 50% já nos primeiros 15 dias, comparado à dieta artificial em torno de 10% (Figura 13A). O ganho de peso em dieta natural foi menor e mais tardio comparado a um ganho de peso rápido em dieta artificial, sendo expressivo com 15 dias e aumentando até 60 dias (Figura 13B). A dieta artificial supriu a necessidade fisiológica do inseto, refletindo em um melhor padrão de qualidade para os ensaios em laboratório. O nível de nutrientes estocados é fundamental, sobretudo no ciclo de vida de insetos holometábolos, visto que, durante alimentação na fase larvar as reservas energéticas acumuladas, além de usadas nos processos de metamorfose, irão prover reserva de nutrientes para o inseto adulto (MIRTH & RIDDIFORD, 2007).

Quanto aos níveis de glicose e trealose na hemolinfa, observou-se aumento de ambos ao longo dos dias, sobretudo em dieta artificial (Figura 14A e 14B).

Figura 13 - Medida de viabilidade (A) e peso (B) de larvas de *Rhynchophorus palmarum* submetidas a duas dietas experimentais (barras abertas dieta normal; barras tracejadas dieta artificial). As barras verticais representam a média do erro padrão em 3 determinações diferentes (* = P < 0,05; ** = P < 0,001; * = P < 0,0001).**

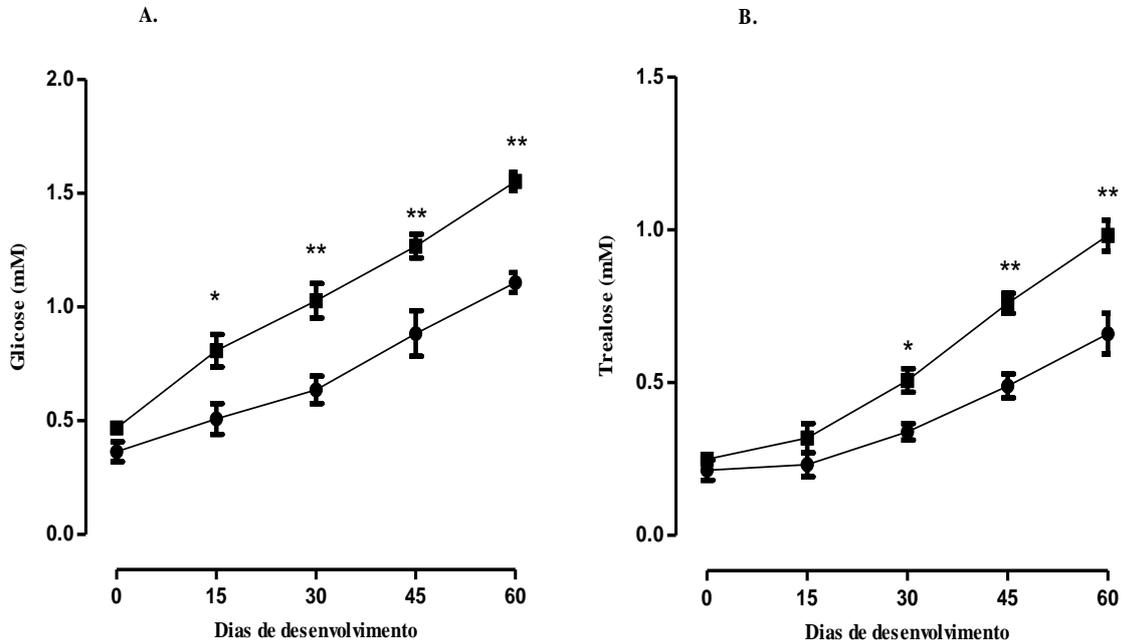


S

Fonte: AUTOR, 2014.

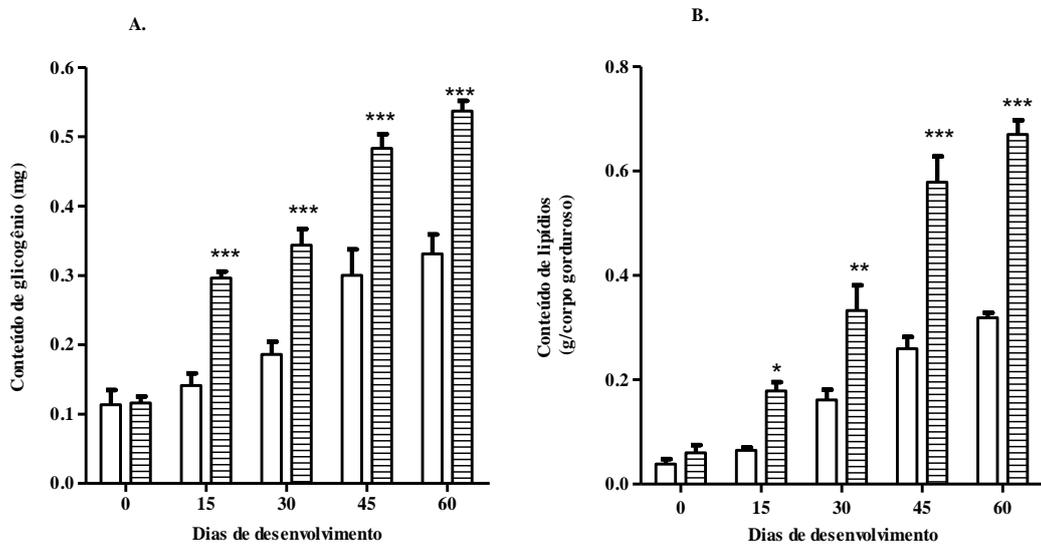
Esses aumentos refletem nas reservas de glicogênio no corpo gorduroso das larvas. O nível deste nas duas dietas aumenta ao longo dos dias, sugerindo que os carboidratos digeridos no intestino estão sendo armazenados na forma de glicogênio no corpo gorduroso. Após 15 dias, esse aumento já é significativo com a dieta artificial (Figura 15A). Esses dados são consistentes com a literatura, já que a glicose é estocada na forma de glicogênio, e este é rapidamente mobilizado para uso nos tecidos na forma de trealose (THOMPSON, 2003). Os carboidratos são utilizados para manutenção do metabolismo energético durante o período de jejum, síntese de quitina, sendo importante ainda no processo de voo nos insetos (KAUFMANN & BROWN, 2008). Ainda, estudos com vários insetos têm mostrado que a aclimação ao frio leva ao aumento no conteúdo de glicose e trealose, e essas mudanças são suportadas pela rápida mobilização de glicogênio (OVERGAARD et al., 2007; VANIN et al., 2008). Esses fatores podem estar relacionados à menor mortalidade de larvas submetidas à dieta artificial.

Figura 14 - Teor de glicose (A) e trealose (B) na hemolinfa de larvas de *Rhynchophorus palmarum* submetidas a duas dietas experimentais (círculos dieta normal; quadrados dieta artificial). As barras verticais representam a média do erro padrão em 3 determinações diferentes (* = P < 0,05; ** = P < 0,001)



Fonte: AUTOR, 2014.

Figura 15 - Teor de glicogênio (A) e triglicerídeos (B) do corpo gorduroso de larvas de *Rhynchophorus palmarum* submetidas a duas dietas experimentais (barras abertas dieta normal; barras tracejadas dieta artificial). As barras verticais representam a média do erro padrão em 3 determinações diferentes (* = P < 0,05; ** = P < 0,001; * = P < 0,0001).**



Os adipócitos de insetos estocam uma grande quantidade de lipídios, essenciais para crescimento e reprodução e ainda provém energia necessária durante os períodos longos sem alimentação (HAHN & DENLINGER, 2007). Esse perfil de estocagem de lipídios na fase larvar é encontrado ao longo dos dias, com aumento gradativo de lipídios nas duas dietas testadas. Assim como no peso das larvas e no conteúdo de glicogênio, observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos da dieta, mostrando a alta taxa de acúmulo de lipídios pela larva (Figura 15B).

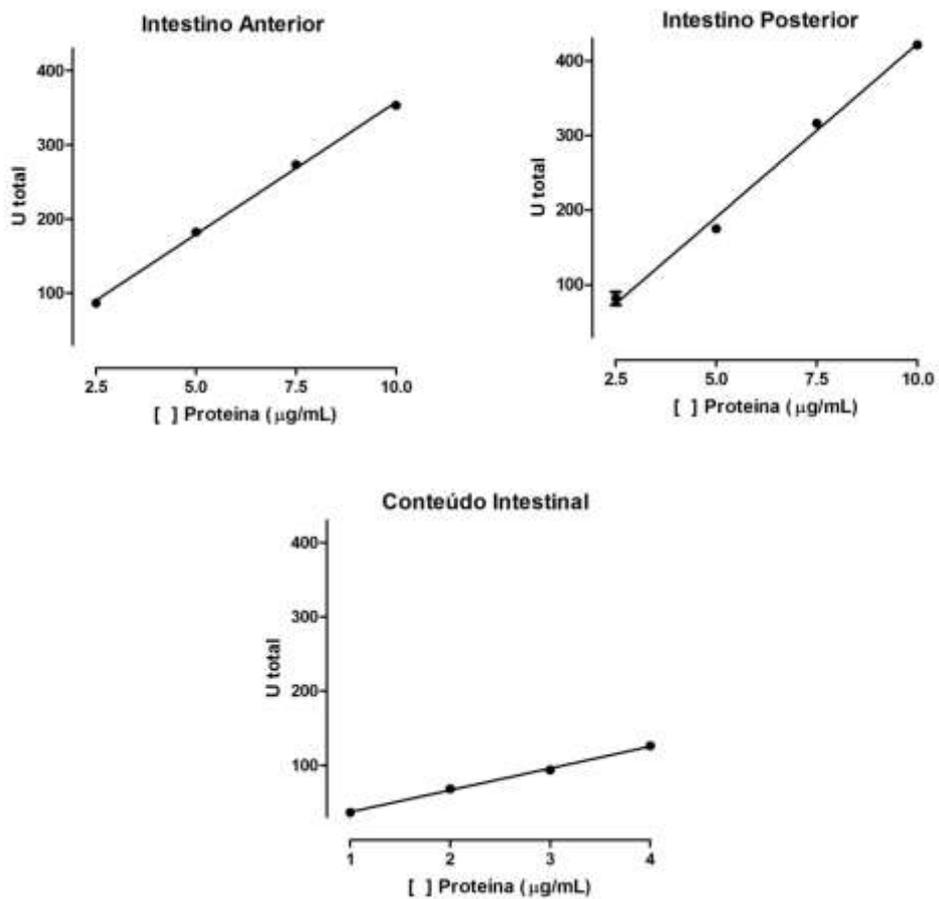
Essas considerações tem impacto direto no metabolismo energético do inseto favorecendo a sua utilização em bioensaios no laboratório, sobretudo a respeito do metabolismo de lipídios e carboidratos. As reservas lipídicas são as mais importantes reservas utilizadas pelo inseto, visto a alta demanda energética para os processos de metamorfose (HAHN & DENLINGER, 2007), desenvolvimento do embrião e períodos prolongados de voo (ZIEGLER & VAN ANTWERPEN, 2006). Representam em alguns insetos mais de 50% do seu peso seco, sendo a maior parte destes lipídios estocada na forma de triglicerídeos, normalmente sintetizados a partir de carboidratos da dieta. A função de estocagem de nutrientes é essencial para o ciclo de vida de insetos, sobretudo holometábolos, que devem acumular uma quantidade mínima de nutrientes durante os instares larvais para sobreviver durante os períodos de jejum e metamorfose.

5.2 Caracterização da atividade TAG-lipase

A caracterização da atividade TAG-lipase foi proposta com o intuito de conhecer mais a biologia e funcionamento da lipase intestinal das larvas do inseto *R. palmarum*. Na curva de concentração, onde diferentes concentrações do extrato proteico foram testadas quanto à presença de TAG-lipase, foi observado aumento da atividade enzimática em função do aumento da concentração de proteínas dos extratos em teste (Figura 16). Nesse caso, observa-se que a quantidade de ácidos graxos livres liberados foi proporcional à quantidade de enzima adicionada. Grillo et al. (2007) descreveram resultados semelhantes ao testar a atividade TAG-lipase em *Rhodnius prolixus*, confirmando o fato de que os extratos proteicos funcionam bem como fonte de enzimas e que as condições de incubação impostas são adequadas. Os resultados obtidos demonstraram alta linearidade, em todos os tecidos analisados, assim como foi observado por Choi et al. (2003) em testes utilizando como fonte de enzima uma lipase comercial liofilizada de *Candida rugosa*.

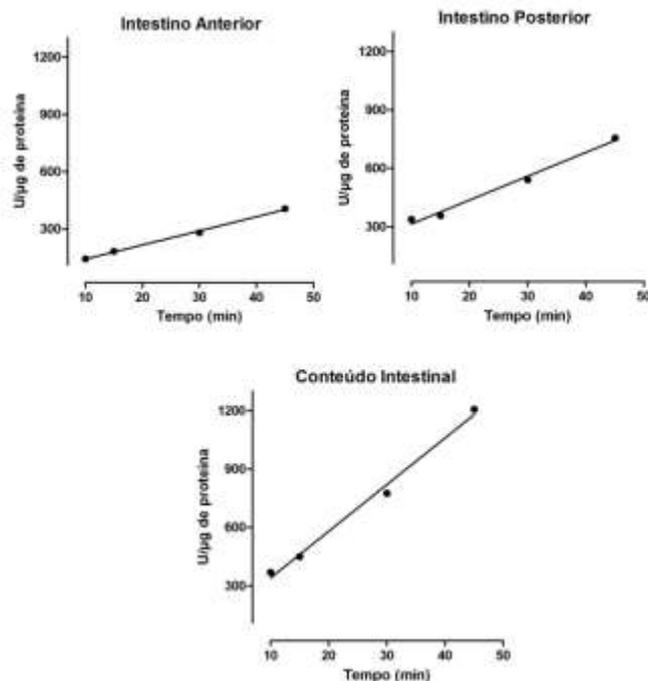
A análise do curso temporal da atividade TAG-lipase mostrou linearidade até os 45 min nas condições de incubação propostas, mostrando que o tempo de incubação padrão utilizado na metodologia desse trabalho (30 min) está dentro da linearidade e a enzima mantém-se estável no tempo de incubação escolhido. Os testes enzimáticos devem usar como tempo de incubação valores que se encaixem no perfil de linearidade. Choi et al. (2003) também utilizaram 30 min como tempo de incubação por ser um valor que pertence à faixa de linearidade do método (Figura 17).

Figura 16 – Avaliação da atividade TAG-lipase em tecidos digestivos de *Rhynchophorus palmarum* em função da concentração de proteínas de extratos proteicos dos tecidos.



Fonte: AUTOR, 2014.

Figura 17 – Curso temporal da atividade TAG-lipase de tecidos digestivos de larvas de *R. palmarum*. Intestino anterior (5µg/mL de proteína); Intestino posterior (5µg/mL de proteína) e Conteúdo intestinal (40µg/mL de proteína).



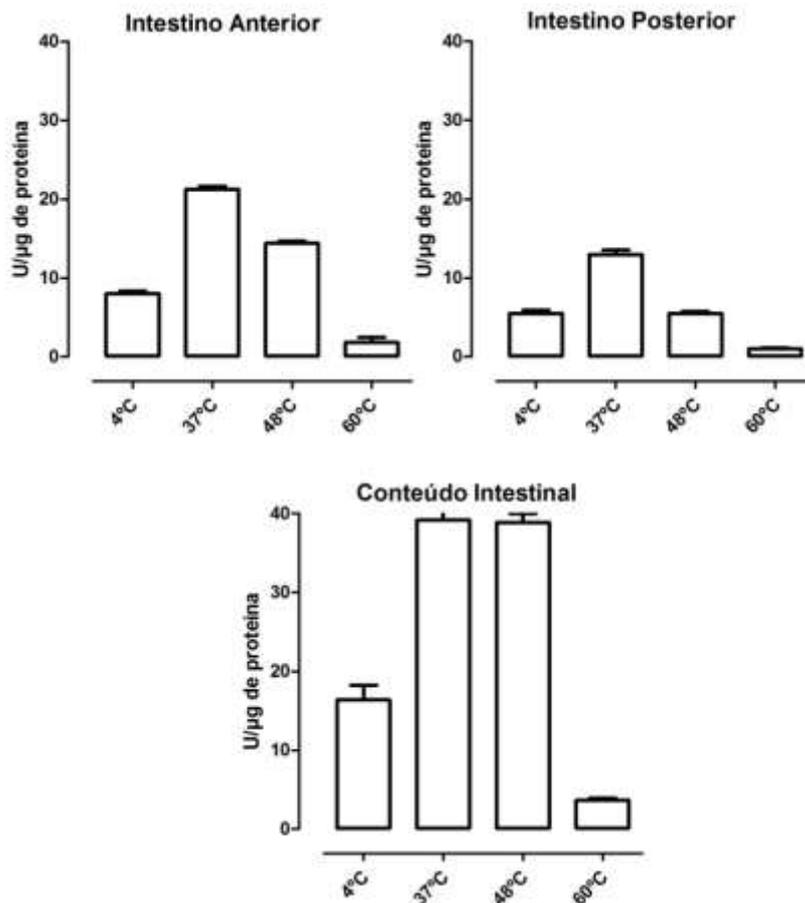
Fonte: AUTOR, 2014.

Temperatura e pH são dois fatores importantes para o bom funcionamento de uma enzima, portanto, a regulação desses fatores em testes enzimáticos é de extrema importância (ZIBAEE, 2012). Toda enzima tem sua temperatura ótima de funcionamento, onde sua atividade é máxima, e a velocidade da reação se intensifica com o aumento da temperatura. Porém, temperaturas extremas desnaturam a estrutura proteica da enzima, ocasionando perda de sua atividade catalítica (ARREGUÍN-ESPINOSA et al., 2000). A TAG-lipase das larvas de *R. palmarum* apresentou temperatura ótima de 37 °C na maioria dos tecidos testados, apresentando no conteúdo intestinal uma temperatura ótima também em 48 °C. Também é importante destacar que foi observado atividade lipásica significativa em temperaturas muito baixas (4 °C). Assim como foi observado na lipase de larvas de *R. palmarum*, o aumento da temperatura ocasiona perda gradativa da função enzimática, até a total desnaturação proteica (Figura 18), aspecto também observado por Arreguín-Espinosa et al. (2000) em larvas de *Cephaloleia presignis*. Zibae et al. (2008) identificaram temperatura ótima da lipase de larvas de *Chilo suppressalis* também em torno de 37–40 °C e Zibae e Fazeli-Dinan (2012) encontraram valores de atividade enzimática máxima em temperaturas em torno de 35-40 °C

nas larvas de *Naranga aenescens*. Temperatura ótima em torno de 30 °C foi observada em lipase purificada do intestino médio da borboleta branca *Pieris brassicae* (ZIBAEE, 2012).

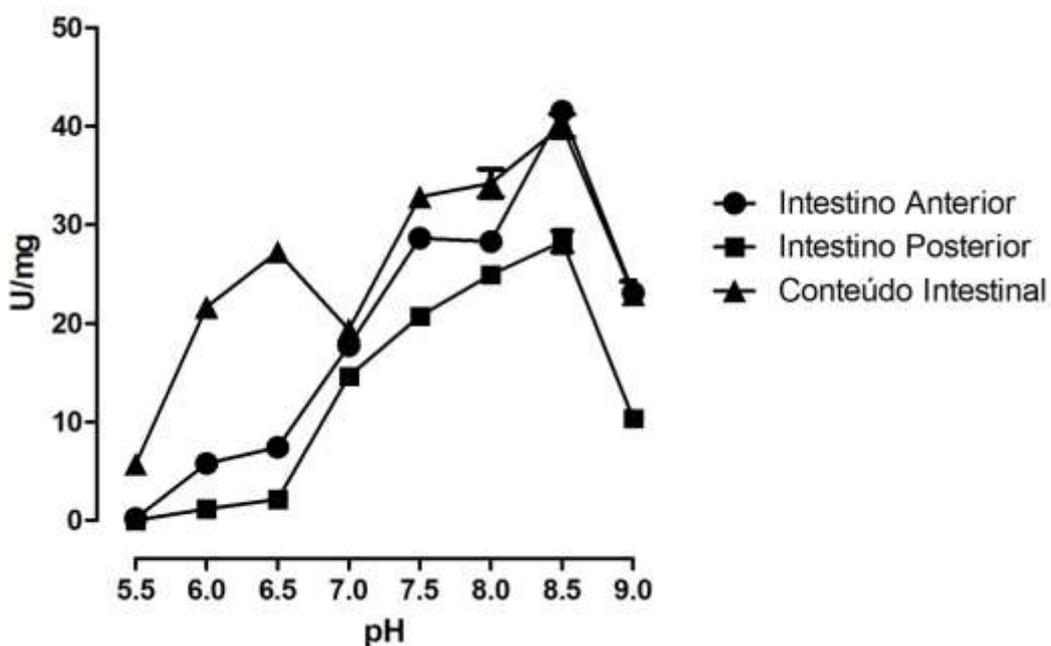
Já a variação de pH pode alterar a função enzimática porque as enzimas podem possuir aminoácidos com grupos ionizáveis nos seus sítios ativos, que podem se alterar durante as variações. Além disso, outros aminoácidos que não pertencem ao sítio ativo também podem conter grupos ionizáveis e essas variações podem ocasionar mudanças na conformação da proteína e conseqüentemente na sua função (ARREGUÍN-ESPINOSA et al., 2000). A TAG-lipase de *R. palmarum* tem seu pH ótimo em torno de 8.5 (Figura 19).

Figura 18 – Efeito da temperatura na atividade TAG-lipase de tecidos digestivos de larvas de *R. palmarum*. Intestino anterior (5µg/mL de proteína); Intestino posterior (5µg/mL de proteína) e Conteúdo intestinal (40µg/mL de proteína). As barras verticais representam a média do erro padrão em 3 determinações diferentes.



Fonte: AUTOR, 2014.

Figura 19 – Efeito do pH na atividade TAG-lipase de tecidos digestivos de larvas de *R. palmarum*. Intestino anterior (5µg/mL de proteína); Intestino posterior (5µg/mL de proteína) e Conteúdo intestinal (40µg/mL de proteína).



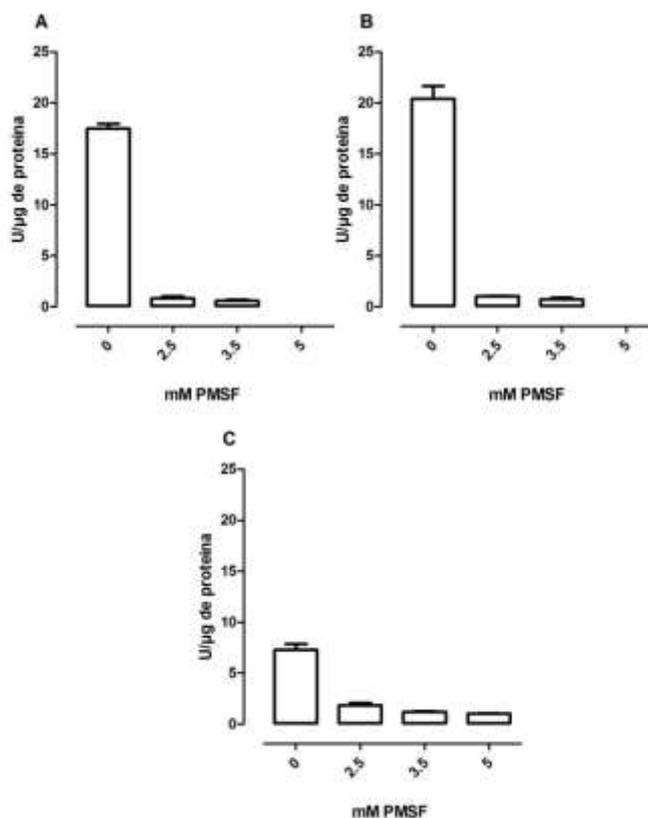
Fonte: AUTOR, 2014.

O valor encontrado foi diferente dos valores descritos na literatura para outras espécies de coleópteros, onde o pH ótimo situa-se em um pH neutro (7,0) ou ligeiramente ácido (5,0) (COPPEDGE et al., 1994; RYMERSON & BODNARYK, 1995; TERRA & CRISTOFOLETTI, 1996; KURODA et al., 1996; NOVILLO et al., 1997). Em outras espécies da família Curculionidae foram descritos duas faixas de pH ótimo, uma de 5,0-6,0 e outro em 9,0-10,0 correspondente ao intervalo de pH de proteases de cisteína e de serina, respectivamente (GIRARD et al., 1998; BONADÉ-BOTTINO et al., 1999). Um pH ótimo em torno de 7,0 - 7,5 também foi observado em tecido de intestino médio de *Rhodnius prolixus* (GRILLO et al., 2007). Zibae et al. (2008) demonstraram pH ótimo 10,0 para larvas do lepidóptero *Chilo suppressalis*. Em *Cephaloleia Presignis* o pH ótimo foi encontrado em pH neutro (7,0) (ARREGUÍN-ESPINOSA et al., 2000). Assim, dentre tantas variações, é bem conhecido que os insetos são capazes de regular rigidamente o pH do intestino para fornecer condições ideais para o processo digestivo, tendo sido relatado variações de três unidades de pH ao longo do trato digestivo do coleóptero *Costelytra zealandica* (BIGGS & MCGREGOR, 1996). A rígida regulação do pH intestinal em insetos evita variações de pH que podem afetar as taxas de reação, alterando o estado de carga do substrato ou o sítio ativo

da enzima. As enzimas geralmente possuem seu pH ótimo compatível com o pH do órgão em que estão localizadas, o pH luminal do intestino médio é básico, o que valida os resultados encontrados para larvas de *R. palmarum*, sendo o pH ótimo 8,5. Extremos de pH e de temperatura podem também romper as ligações de hidrogênio da enzima, presentes em sua estrutura tridimensional, causando desnaturação da proteína (ZHENG & COHEN, 2000).

O efeito do PMSF, inibidor de serino proteases, sobre a atividade TAG-lipase foi avaliado em concentrações crescentes da substância (Figura 20). Os resultados dos testes demonstraram diminuição da atividade enzimática à medida que a concentração de PMSF na mistura de reação foi aumentada. Nos tecidos digestivos do intestino anterior e posterior foi observada inibição total da atividade TAG-lipase após incubação com 5 mM de PMSF. No conteúdo intestinal de larvas de *R. palmarum* a incubação com 2,5mM de PMSF resultou em diminuição expressiva da atividade enzimática, cerca de 75%. Esses resultados sugerem que a TAG-lipase de *R. palmarum* possui, provavelmente, resíduo de serina em seu sítio ativo. Grillo et al. (2007) observaram resultados semelhantes em *Rhodnius prolixus*, onde a atividade lipásica do conteúdo intestinal diminuiu quase 30% após incubação com 2,5 mM de PMSF. Efeitos semelhantes também foram observados na TAG-lipase de glândulas acessórias reprodutivas de *Phlebotomus papatasi* (ROSETTO et al., 2003). Investigações em *Pieris brassicae* utilizando zimograma demonstraram ausência de qualquer efeito inibitório na atividade da lipase digestiva purificada (ZIBAEE, 2012). Em outro trabalho, com estudos com o coleóptero *Cephaloleia presignis*, também não foi observada inibição da lipase da hemolinfa do inseto por PMSF, porém, a enzima foi inibida por outros inibidores de protease diferentes de serina (ARREGUÍN-ESPINOSA et al., 2000). Este fato sugere que essas lipases não possuem resíduos de serina em seu sítio ativo. Os resultados encontrados para o efeito de PMSF sobre a atividade TAG-lipase de tecidos digestivos das larvas de *R. palmarum* são compatíveis com os descritos na literatura, onde é descrito que a inibição de lipases ocorre na concentração de 3 mM de PMSF (ARREGUÍN-ESPINOSA et al., 2000). A relação dos resíduos de serina, inibidores de serino-proteases e a atividade enzimática confirmam a importância da tríade catalítica no sítio ativo de lipases.

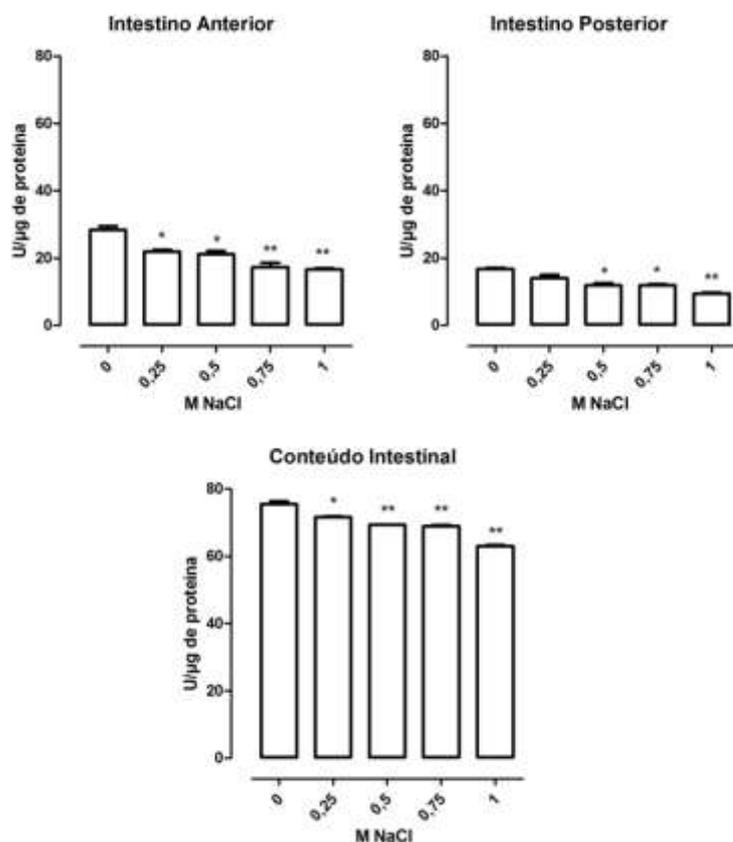
Figura 20 – Efeito do PMSF na atividade TAG-lipase de tecidos digestivos de larvas de *R. palmarum*. Intestino anterior (5 µg/mL de proteína); Intestino posterior (5 µg/mL de proteína) e Conteúdo intestinal (40 µg/mL de proteína). As barras verticais representam a média do erro padrão em 3 determinações diferentes.



Fonte: AUTOR, 2014.

O efeito da força iônica (NaCl) sobre a atividade TAG-lipásica nos tecidos digestivos de larvas de *R. palmarum* demonstrou leve perda da atividade (Figura 21). A máxima perda de estabilidade da enzima analisada foi com a concentração de NaCl 1M, havendo perda de atividade de cerca de 40% nos tecidos do intestino e perda de 16% na atividade lipásica do conteúdo intestinal. Estudo envolvendo purificação da lipase digestiva de *Pieris brassicae* também avaliou o efeito da força iônica (NaCl) na atividade da enzima, a fim de prever o efeito causado pelo sal durante as etapas de purificação que utilizaram eluição com gradiente de NaCl em colunas cromatográficas. Os resultados encontrados por Zibae (2012) demonstraram alto efeito inibitório sobre a lipase após a purificação, perda de cerca de 60% na atividade enzimática na concentração de NaCl 0,5M.

Figura 21 - Efeito da força iônica (NaCl) na atividade TAG-lipase de tecidos digestivos de larvas de *R. palmarum*. Intestino anterior (5µg/mL de proteína); Intestino posterior (5µg/mL de proteína) e Conteúdo intestinal (40µg/mL de proteína). As barras verticais representam a média do erro padrão em 3 determinações diferentes. (* = P < 0,05; ** = P < 0,001).



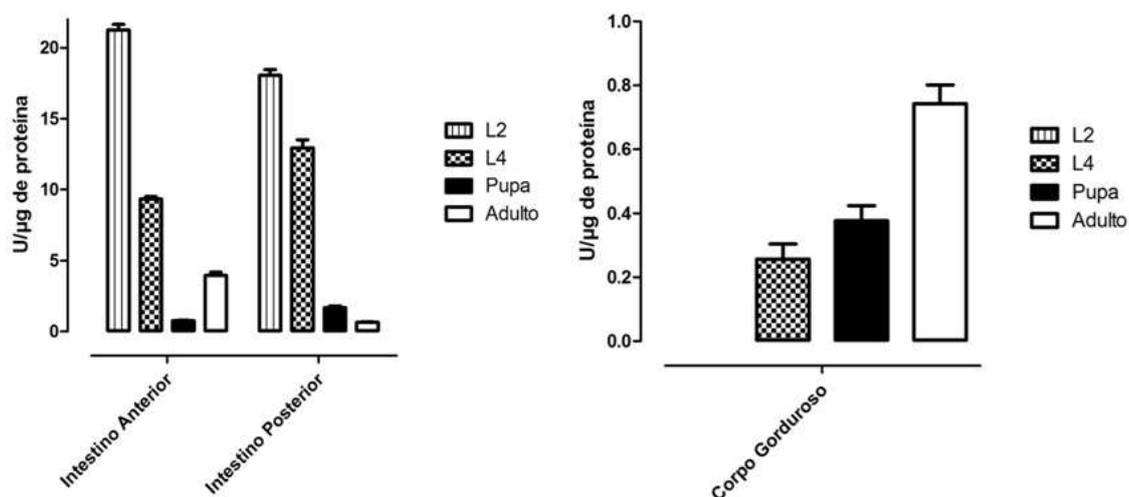
Fonte: AUTOR, 2014.

Outros estudos que avaliaram o efeito da força iônica (NaCl) em lipases demonstraram efeito contrário ao observado em *R. palmarum*. Grillo et al (2007) observaram aumento da catálise após incubação prévia dos extratos enzimáticos do intestino de *R. prolixus* com concentrações de 0-1M de NaCl. Essa dependência enzimática de NaCl também foi observada em lipase do corpo gorduroso de *Locusta migratoria* (HIRAYAMA & CHINO, 1987). A variação entre o efeito inibitório ou estimulante da atividade de TAG-lipases parece estar relacionada às interações eletrostáticas envolvidas na ligação do substrato ao sítio ativo da enzima (GRILLO et al., 2007).

O *R. palmarum* possui diferenças no metabolismo energético ao longo de suas fases de desenvolvimento, por ser um inseto holometábolo, durante as fases larvais o inseto armazena lipídios e glicogênio para que possa ser utilizado como fonte de energia na fase adulta (ZIEGLER, 1991). Assim, diferenças entre os perfis enzimáticos entre os estágios de

desenvolvimento de *R. palmarum* foram previstos. A dosagem da atividade TAG-lipase nos tecidos em diferentes estágios de desenvolvimento é mostrada na figura 22.

Figura 22 – Atividade TAG-lipase de tecidos digestivos em diferentes estágios de desenvolvimento de *R. palmarum*. Barras pretas representam o estágio de pupa e barras brancas o inseto adulto. As barras verticais representam a média do erro padrão em 3 determinações diferentes.

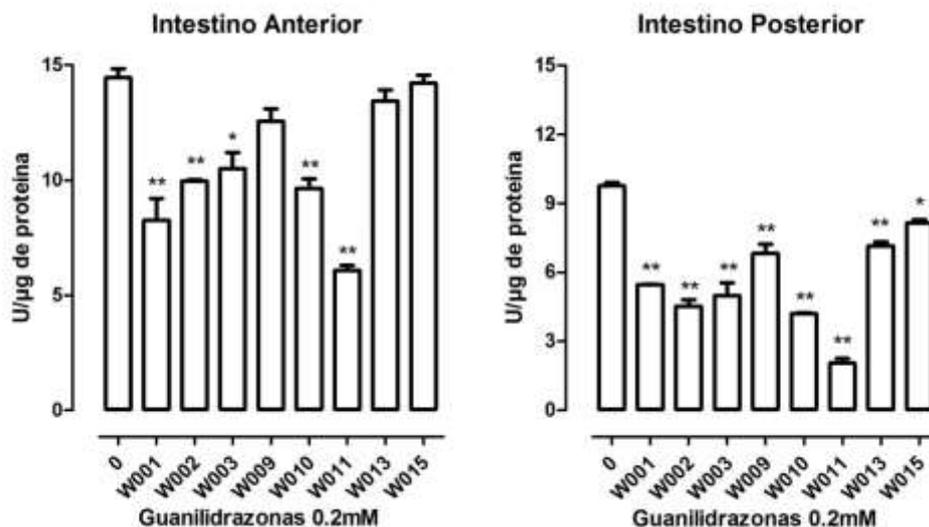


Fonte: AUTOR, 2014.

Nos resultados é possível observar um aumento da atividade TAG-lipase no corpo gorduroso dos ínstares finais (pupa e inseto adulto) ao contrário do que é observado no corpo gorduroso de estágios larvais iniciais, evidenciando a importância do funcionamento da enzima para mobilização de reservas energéticas que foram estocadas nos estágios iniciais de desenvolvimento.

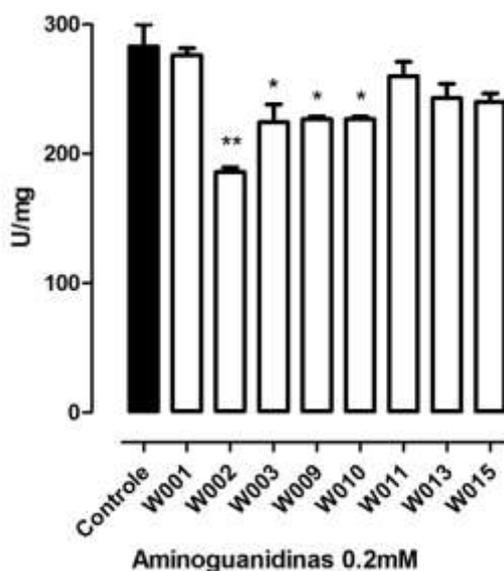
A lipase é uma serino-protease e por isso o efeito inibitório das guanilidrazonas sobre sua ação foi testado. O efeito inibitório da atividade TAG-lipase do intestino anterior e posterior foi observado para a maioria das guanilidrazonas testadas (Figura 23). A inibição foi significativa para quase todos os compostos, quando comparadas ao grupo controle, sendo a inibição mais expressiva causada pelo composto W011 (em ambos os tecidos), onde foi observada perda de 57% da atividade TAG-lipase no intestino anterior e de quase 80% no intestino posterior. Efeitos inibitórios também foram encontrados em teste realizado com Lipase comercial de *Candida rugosa* (Sigma Aldrich®, St. Louis, EUA), que foi utilizado como controle positivo, mostrando inibição com diferenças significativas na maioria das guanilidrazonas testadas (Figura 24).

Figura 23 - Efeito de guanilidrazonas sintéticas na atividade TAG-lipase de tecidos digestivos de larvas de *R. palmarum*. Intestino anterior (5µg/mL de proteína) e Intestino posterior (5µg/mL de proteína). As barras verticais representam a média do erro padrão em 3 determinações diferentes (* = P < 0,05; ** = P < 0,001).



Fonte: AUTOR, 2014.

Figura 24 - Efeito de guanilidrazonas sintéticas na atividade da Lipase comercial de *Candida rugosa* (1U). As barras verticais representam a média do erro padrão em 3 determinações diferentes (* = P < 0,05; ** = P < 0,001).



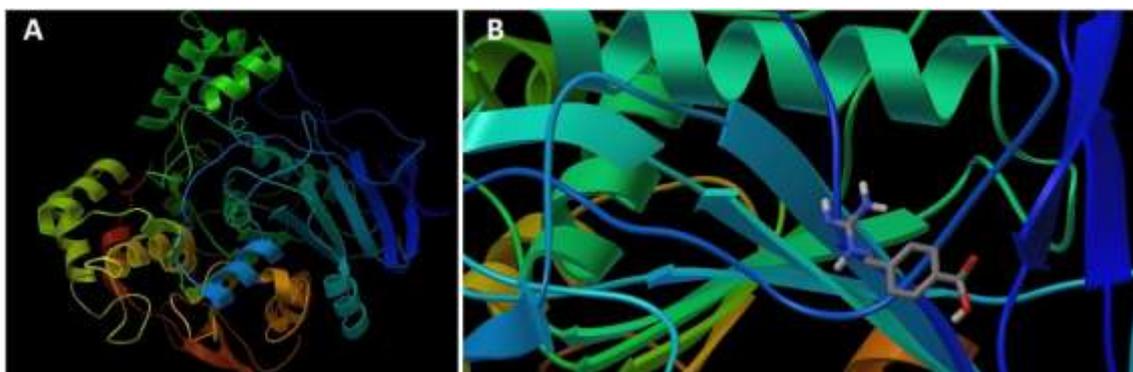
Fonte: AUTOR, 2014.

Com relação às modificações estruturais planejadas dos compostos, grupamentos volumosos em *meta* e *para* foram utilizados como parâmetro para avaliar a influência do

efeito do impedimento estérico na ligação dos compostos à enzima. A introdução de grupos eletrorretiradores em *para*, possibilitou observar se o efeito indutivo de elétrons era capaz de influenciar a atividade inibitória dos compostos sobre as lipases. A variação do núcleo aromático benzeno por núcleos maiores como, por exemplo, indólico, permitiu verificar se um domínio hidrofóbico maior teria capacidade de influenciar na interação composto/enzima, em termos de encaixe molecular. Diante de tais modificações, observou-se que a introdução de grupos volumosos e anéis modificados conferiam um melhor perfil inibidor, principalmente aos compostos 1 e 10 (indol e 4-hidroxi-3,5-*ditert*-butila, respectivamente). Além disso, verificou-se também que o efeito elétron indutivo conduz a uma diminuição do potencial inibidor dos compostos, fato esse observado nos compostos 2 e 3.

O composto 11 exibiu o maior perfil inibitório das lipases presentes tanto no intestino anterior quanto no posterior, possivelmente devido à presença do domínio ligante de hidrogênio da carboxila em *para* do anel aromático, que conferiu à estrutura do mesmo uma maior capacidade de interagir com os resíduos da sequência de aminoácidos presentes no sítio de ligação do substrato da enzima (Glicina-Serina-Glicina), conduzindo ao bloqueio deste e, conseqüentemente, inibindo a enzima. A figura 25A mostra a estrutura tridimensional da lipase de *Candida rugosa* e na figura 25B é mostrado o complexo formado pela ligação da guanilidrazona W011 à resíduos de aminoácidos da lipase.

Figura 25 – Docking molecular da lipase comercial de *Candida rugosa* com a guanilidrazona W011 utilizando o software *AutoDock Tools*® (versão 1.5.6). (A) Estrutura tridimensional da enzima lipase; (B) Complexo formado pela ligação da guanilidrazona W011 à efuresíduos de aminoácidos da lipase.

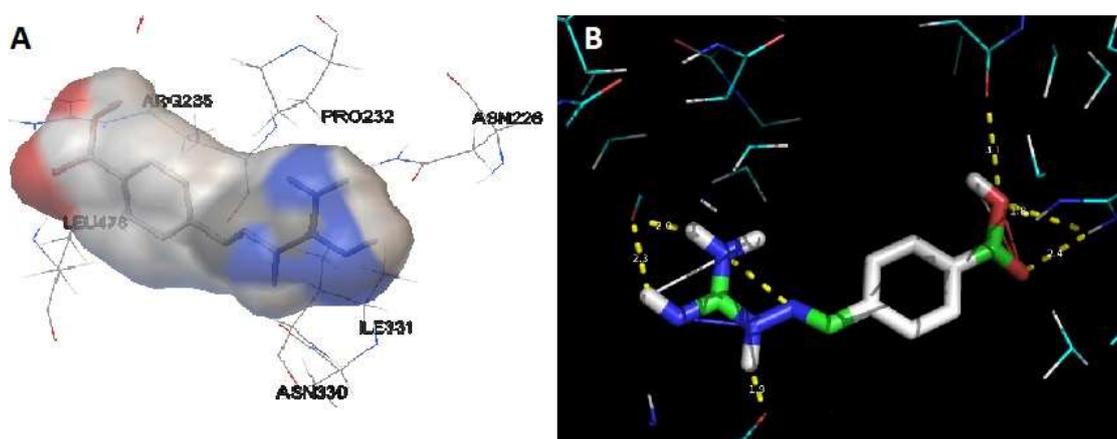


Fonte: AUTOR, 2014.

O *docking* molecular revelou valores de constante de inibição de 131,81 μM para W011, além de energia de ligação correspondente a -5,39 kcal/mol (Figura 26).

No intestino anterior, outros compostos se mostraram detentores de significativa atividade inibitória sobre a lipase sendo, em ordem decrescente de atividade, compostos 11, 1, 10, 2 e 3. Já no intestino posterior, alguns compostos se destacaram como detentores de ação inibitória sobre a lipase sendo, em ordem decrescente, composto 11, 10, 2, 3, 1, 9, 13 e 15. Ademais, observou-se que atividades inibitórias significativas estão relacionadas com compostos contendo grupos volumosos no anel aromático.

Figura 26 – *Docking* molecular da Lipase comercial de *Candida rugosa* com a guanilidrazona W011 utilizando o software *AutoDock Tools*[®] (versão 1.5.6). (A) Ligação da guanilidrazona W011 com a enzima lipase, evidenciando os resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação; (B) Pontes de hidrogênio (tracejados amarelos) formadas entre a enzima e a substância W011 (trial software *PyMol*[®]).



Constante de inibição = 131.81 μM
Energia de ligação = -5.29

Fonte: AUTOR, 2014.

Perfis de inibição diferentes foram encontrados para as lipases presentes no intestino anterior e posterior, porém estudos com eletroforese SDS-PAGE não demonstraram composição diferente no perfil de proteínas em ambos os tecidos. Provavelmente, a diferença entre os efeitos inibitórios dos compostos entre os tecidos deve-se à composição do material em processo de digestão em cada um deles, que possivelmente deve interferir na ligação dos compostos ao sítio de ligação do substrato da enzima.

As guanilidrazonas são conhecidas por seu efeito inibidor sobre a enzima NO sintase, além de inibir também algumas vias do estresse oxidativo. Também já foram descritas como inibidores da apoptose induzida por diabetes (GIARDINO et al., 1998). Guanilidrazonas também são importantes inibidores de serino-proteases (DIMENSIONAL PHARMACEUTICALS, 1999), sendo provavelmente essa a explicação para o seu efeito inibitório observado na TAG-lipase de larvas de *R. palmarum*. Comparando os efeitos inibitórios expressivos causados pelo PMSF, também um inibidor de serino-proteases, provavelmente a perda de atividade enzimática ocorre por interação dessas guanilidrazonas com o sítio ativo da enzima (presença da tríade catalítica). Contudo, as guanilidrazonas analisadas, principalmente a substância W011, podem constituir nova ferramenta para o controle da praga-agrícola *R. palmarum*, pois ao agirem inibindo a TAG-lipase das larvas de insetos, alteram o metabolismo energético das larvas, impedindo que seu desenvolvimento aconteça de forma normal.

6 CONCLUSÃO

Este estudo buscou analisar, primeiramente, a viabilidade das larvas criadas em laboratório com dois tipos de dietas diferentes: dieta natural (mesocarpo de coco) e dieta artificial. Os resultados obtidos indicaram que colônias de larvas alimentadas com dieta artificial apresentaram maior viabilidade, maior ganho de peso e ainda maiores níveis de glicogênio e lipídios no corpo gorduroso do inseto. Esse fato reflete em maiores estoques energéticos alcançados com a nova dieta, essenciais para manutenção energética durante o ciclo de vida do inseto. A maior viabilidade larvar alcançada com a dieta artificial a colocou como primeira escolha para manutenção das colônias em nosso laboratório, fornecendo-nos um melhor padrão do material utilizado para nossos ensaios.

A caracterização da atividade TAG-lipase forneceu muitas informações, até então desconhecidas, sobre a fisiologia digestiva do inseto *R. palmarum*. As informações agora disponíveis servirão como base para outras pesquisas a respeito do metabolismo energético do inseto, que serão desenvolvidas no nosso laboratório.

Além disso, a investigação dos efeitos inibitórios das guanilidrazonas sobre a TAG-lipase de *R. palmarum* fornece indícios de potenciais alvos e ferramentas para controle desta praga-agrícola, evidenciando-se a necessidade de estudos mais aprofundados sobre o assunto. As perspectivas futuras para continuidade do trabalho incluem a continuação dos estudos

sobre o metabolismo energético das larvas de *R. palmarum*, a partir de agora focando nas proteínas transportadoras de ácidos graxos (FATPs) sob o ponto de vista da Biologia Molecular.

REFERÊNCIAS

AKAM, M. Hox and Hom: Homologous gene clusters in insects and vertebrates. **Cell**. v.57, 1989, p.347-354.

ALARCÓN, F. J.; MARTÍNEZ, T. F.; BARRANCO, P.; CABELLO, T.; DÍAZ, M.; MOYANO, F. J. Digestive proteases during development of larvae of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Coleoptera: Curculionidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v.32, 2002, p.265–274.

ALMEIDA, A. A. Natureza dos danos causados por insetos em grãos armazenados. In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 1987. Campinas, SP. **Anais...** Campinas: Fundação Cargill, 1989. v.4, p. 16-32.

ALMEIDA, J. C.; ALBUQUERQUE, A. C.; LUNA-ALVES LIMA, E. A. Viabilidade de *Beauveria Bassiana* (Bals.) Vuill. reisolado de ovos, larvas e adultos de *Anthonomus grandis* (Boheman) (Coleoptera: Curculionidae) artificialmente infectado. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**. v.72, n.4, 2005, p.473-480.

ARAÚJO, R. A.; GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, M. G. A.; FERREIRA, G. H. Enhanced activity of carbohydrate and lipid-metabolizing enzymes in insecticide-resistant populations of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Bulletin of Entomological Research**. v. 98, 2008, p.417–424.

ARREGUÍN-ESPINOSA, R.; ARREGUÍN, B.; GONZÁLEZ, C. Purification and properties of a lipase from *Cephaloleia presignis* (Coleoptera, Chrysomelidae). **Biotechnology and Applied Biochemistry**. v.31, 2000, p.239–244.

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 Biochemistry and Molecular Biology**. v.31, 2001, p.7–17.

ARRESE, E. L.; PATEL, R. T.; SOULAGES, J. L. The main triglyceride-lipase from the insect fat body is an active phospholipase A1: identification and characterization. **Journal of Lipid Research**. v.47, 2006, p.2656–2667.

ARRESE, E. L.; WELLS, M. A. Purification and properties of a phosphorylatable triacylglycerol lipase from the fat body of an insect, *Manduca sexta*. **Journal of Lipid Research**. v.35, n.9, 1994, p.1652-1660.

BACIC, A.; HARRIS, P. J.; STONE, B. A. Structure and function of plant cell walls. In: STUMPF, P. K.; CONN, E. E. (Eds.). **The biochemistry of plants**. Nova Iorque: Academic Press, 1988, v.14, p.297–371.

BAIRWA, R.; KAKWANI, M.; TAWARI, N. R.; LALCHANDANI, J.; RAY, M. K.; RAJANB, M. G. R.; DEGANI, M. S. Novel molecular hybrids of cinnamic acids and guanylhydrazones as potential antitubercular agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v.20, 2010, p.1623–1625.

BATISTA, D. P. C. **Preparação de microcompósito polimérico e sua avaliação como matriz para bioinseticidas entomopatogênicos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2014.

BAUERFEIND, R.; KOMNICK, H. Lipid-loading and unloading of lipophorin in the midgut epithelium of dragonfly larvae, *Aeshna cyanea*. **Journal of Insect Physiology**. v.38, 1992, p.147–160.

BAKER, J. E. Properties of glycosidases from the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Insect Biochemistry**. v.21, 1991, p.615–621.

BECKER, A.; SCHLÖDER, P.; STEELE, J. E.; WEGENER, G. The regulation of trehalose metabolism in insects. **Experientia**. v.52, 1996, p.433–439.

BÉDIKOU, E. M.; KONÉ, M. F.; AHI, A. P.; GONNETY, J. T.; FAULET, B. M.; KOUAMÉ, L. P.; NIAMKÉ, S. L. α -Mannosidases from the digestive fluid of *Rhynchophorus Palmarum* larvae as novel biocatalysts for transmannosylation reactions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.162, 2010, p.307–320.

BEENAKKERS, A. M. T.; VAN DER HORST, D. J.; VAN MARREWIJK, W. J. Insect lipids and lipoproteins, and their role in physiological processes. **Progress in Lipid Research**. v.24, n.1, 1985, p.19-67.

BEHMER, S. T.; ELIAS, D. O.; GREBENOK, R. J. Phytosterol metabolism and absorption in the generalist grasshopper, *Schistocerca americana* (Orthoptera: criidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**. v.42, 1999, p.13–25.

BILLINGSLEY, P. F.; DOWNE, A. E. R. Ultrastructural changes in posterior midgut cells associated with blood feeding in adult female *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). **Canadian Journal of Zoology**. v.61, 1983, p.2574-2586.

BIGGS, D. R.; MCGREGOR, P. G. Gut pH and amylase and protease activity in larvae of the New Zealand grass grub (*Costelytra zealandica*; Coleoptera: Scarabidae) as a basis for selecting inhibitors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v.26, 1996. p.69–75.

BLACKLOCK, B. J.; RYAN, R. O. Hemolymph lipid transport. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v.24, 1994, p.855–873.

BOLLADE, D.; PARIS, R.; MOURINS, M. Digestive enzymes. In: LEHANE, M. J.; BILLINGSLEY, P. F. (Eds.). **Biology of the Insect Midgut**. Londres: Chapman & Hall, 1970, p.293-320.

BONADÉ-BOTTINO, M.; LERIN, J.; ZACCOMER, B.; JOUANIN, L. Physiological adaptation explains the insensitivity of *Baris coerulescens* to transgenic oilseed rape expressing oryzacystatin I. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v.29, 1999, p.131–138.

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

BROADWAY, R. M.; DUFFEY, S. S. The effect of dietary protein on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. **Journal of Insect Physiology**. v.32, 1985, p.673–680.

CAMPOS, E.; MORAES, J.; FAÇANHA, A. R.; MOREIRA, E.; VALLE, D.; ABREU, L.; MANSO, P. P. A.; NASCIMENTO, A.; PELAJO-MACHADO, M.; LENZI, H.; MASUDA, A.; VAZ-JUNIOR, I. S.; LOGULLO, C. Kinetics of energy source utilization in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) embryonic development. **Veterinary Parasitology**. v.138, 2006, p.349–357.

CANAVOSO, L. E.; FREDE, S.; RUBIOLO, E. R. Metabolic pathways for dietary lipids in the midgut of hematophagous *Panstrongylus megistus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v.34, 2004, p.845-854.

CANAVOSO, L. E.; JOUNI, Z. E.; KARNAS, K. J.; PENNINGTON, J. E.; WELLS, M. A. Fat Metabolism in Insects. **Annual Review of Nutrition**. v.21, 2001, p.23–46.

CANAVOSO, L. E.; WELLS, M. A. Metabolic pathways for diacylglycerol biosynthesis and release in the midgut of larval *Manduca sexta*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v.30, 2000, p.1173-1180.

CANAVOSO, L. E.; YUN, H. K.; JOUNI, Z. E.; WELLS, M. A. Lipid transfer particle mediates the delivery of diacylglycerol from lipophorin to fat body in larval *Manduca sexta*. **Journal of Lipid Research**. v.45, n.3, 2004, p.456-465.

CASTRO, J. M. C.; LIMA, C. R. F.; SANTANA, M. L. P. Nematóide do anel vermelho do coqueiro e medidas de manejo. In: **Instruções Técnicas da Embrapa Semiárido**. Petrolina: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2009. 4p. Disponível em: <http://www.cpatas.embrapa.br:8080/public_eletronica/downloads/INT88.pdf>. Acesso em: 12 de março de 2014.

CHINO, H. Lipid transport: biochemistry of hemolymph lipophorin. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. (Eds.). **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. Oxford: Pergamon Press, 1985, v.10, p. 115–135.

CHINO, H.; GILBERT, L. I. The uptake and transport of cholesterol by haemolymph lipoproteins. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v.1, 1971, p.337-347.

CHOI, S. J.; HWANG, J. M.; KIM, S. I. A Colorimetric Microplate Assay Method for High Throughput Analysis of Lipase Activity. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**. v. 36, n.4, 2003, p.417-420.

CHOWN, S. L.; NICOLSON, S. W. **Insect Physiological Ecology: Mechanisms and Patterns**. Oxford: Oxford University, 2004. 256 p.

CHRISTELLER, J. T.; AMARA, S.; CARRIÈRE, F. Galactolipase, phospholipase and triacylglycerol lipase activities in the midgut of six species of lepidopteran larvae feeding on different lipid diets. **Journal of Insect Physiology**. v.57, 2011, p.1232-1239.

COPPEDGE, B. R.; JONES, J. M.; FELTON, G. W.; STEPHEN, F. M. Examination of midgut proteases of the adult southern pine beetle (Coleoptera: Scolytidae). **Journal of Entomological Science**. v.29, 1994, p.457-465

CYTOKINE PHARMASCIENCES, South Warner Road (King of Prussia, PA). Bianchi, M.; Cerami, A.; Tracey, K.; Urich, P. **Composiciones de guanilhidrazona para el tratamiento de enfermedades inflamatorias**. ES n. 2 277 600, 1995 Jan 19, 2001 Dez 05.

DEMIR, E.; DICKSON, B. J. Fruitless splicing specifies male courtship behavior in *Drosophila*. **Cell**. v.121, 2005, p.785-794.

DIMENSIONAL PHARMACEUTICALS. Eagleview Corporate Center (Exton, PA). Bruce E. Tomczuk; Richard M. Soll; Tiambao Lu; Cynthia L. Fedde; Carls R. Illig; Thomas P. Markotan; Thomas Stagnaro. **Aminoguanidinas y alcoxiguanidinas como inhibidores de proteasa**. ES n.2 174 309, 1997 Nov 26, 1999 Set 29.

DÖNITZ, J.; GROSSMANN, D.; SCHILD, I.; SCHMITT-ENGEL, C.; BRADLER, S.; PRPIC, N. M.; BUCHER, G. TrOn: An Anatomical Ontology for the Beetle *Tribolium castaneum*. **Plos One**. v.8, 2013, 8p.

EPIFÂNIO, W. A. N. **Síntese e avaliação citotóxica de derivados aminoguanidínicos planejados como protótipos de fármacos antineoplásicos**. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia). Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2011.

ESSER, R.; MEREDITH, J. **Red ring nematode**. Nematology Circular of the Florida Department of Agriculture. Gainesville , 1987, n.141.

FAUSTINELLA, F.; SMITH, L.; SEMENKOVICH, C.; CHAN, L. Structural and functional roles of highly conserved serines in human lipoprotein lipase: evidence that serine 132 is essential for enzyme catalysis. **Journal of Biological Chemistry**. v.266, 1991, p.9481-9485.

FERNANDO-WARNAKULASURIYA, G.; TSUCHIDA, K.; WELLS, M.A. Effect of dietary lipid content on lipid transport and storage during larval development of *Manduca sexta*. **Insect Biochemistry**. v.18, 1988, p.211-214.

FERREIRA, J. M. S.; MICHEREFF FILHO, M. Pragas e métodos de controle. In: FONTES, H. R.; FERREIRA, J. M. S.; SIQUEIRA, L. A. (Eds.). **Sistema de produção para cultura do coqueiro**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2002. 65p, p.35-49. (Sistemas de Produção, 1). Disponível em: <<http://www.cpatc.embrapa.br/download/SP1.pdf>>. Acesso em: 09 de março de 2014.

FONTES, H. R.; RIBEIRO, F. E.; FERNANDES, M. F. Introdução. In: FONTES, H. R.; RIBEIRO, F. E.; FERNANDES, M. F. (Eds.). **Coco, produção**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2003, 106 p. (Frutas do Brasil, 27).

FRANÇA, P. H. B. **Planejamento e síntese de novos derivados aminoguanidínicos visando à atividade leishmanicida**. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia). Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2014.

GASSEN, D. N. **Insetos subterrâneos prejudiciais às culturas no sul do Brasil**. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1989. 49p. (EMBRAPA-CNPT. Documentos, 13).

GIARDINO, I.; FARD, A. K.; HATCHELL, D. L.; BROWNLEE, M. Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation, and oxidant-induced apoptosis. **Diabetes**. v.47, 1998, p.1114-1120.

GIBLIN-DAVIS, R. M. Borers of palms. In: HOWARD, F.W.; MOORE, D.; GIBLIN-DAVIS, R.M.; ABAD, R.G.(Eds.). **Insects on palms**. CABI Publishing, 2001, p.267-304.

GIRARD, C.; LE MÉTAYER, M.; BONADÉ-BOTTINO, M.; PHAM-DELÉGUE, M. H.; JOUANIN, L. High level of resistance to protease inhibitors may be conferred by proteolytic cleavage in beetle larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 28, 1998, p.229–237.

GONDIM, K. C.; OLIVEIRA, P. L.; MASUDA, H. Lipophorin and oogenesis in *Rhodnius prolixus*: Transfer of phospholipids. **Journal of Insect Physiology**. v.35, n.1, 1989, p.19-27.

GONDIM, K. C.; WELLS, M. A. Characterization of lipophorin binding to the midgut of larval *Manduca sexta*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v.30, 2000, p.405–413.

GRIFFITH, R. Red ring disease of coconut palm. **Plant Disease**. v.71, 1987, p.193–196.

GRILLO, L. A. M. **Metabolismo de lipídios no intestino do inseto *Rhodnius prolixus***. Tese (Doutorado em Química Biológica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

GRILLO, L. A. M.; MAJEROWICZ, D.; GONDIM, K. C. Lipid metabolism in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae): Role of a midgut triacylglycerol-lipase. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v.37, 2007, p.579–588.

GRILLO, L. A. M.; PONTES, E. G.; GONDIM, K.C. Lipophorin interaction with the midgut of *Rhodnius prolixus*: Characterization and changes in binding capacity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v.33, n.4, 2003, p.429-438.

GUIZZO, M. G.; ABREU, L.; MASUDA, A.; LOGULLO, C.; VAZ-JUNIOR, I. S. Metabolismo de biomoléculas na embriogênese do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.40, 2012, p.1-12.

HAGLEY, E. A. C. On the life history and habitats of the palm weevil *Rhynchophorus palmarum* (L.). **Annals of the Entomological Society of America**. v.58, 1965, p.22-28.

HAHN, D. A.; DENLINGER, D. L. Meeting the energetic demands of insect diapause: nutrient storage and utilization. **Journal Insect Physiology**. v.53, 2007, p.760–773.

HIDE, W. A.; CHAN, L.; LI, W. H. Structure and evolution of the lipase superfamily. **Journal of Lipid Research**. v.33, 1992, p.167-178.

HIRAYAMA, Y.; CHINO, H. A new method for determining lipase activity in locust fat body. **Insect Biochemistry**. v.17, 1987, p.85–88.

HOFFMAN, A. G. D.; DOWNER, R. G. H. End product specificity of triacylglycerol lipases from intestine, fat body, muscle and haemolymph of the American cockroach, *Periplaneta Americana*. **Lipids**. v.14, 1979, p.893-899.

HORNE, I.; HARITOS, V. S.; OAKESHOTT, J. G. Comparative and functional genomics of lipases in holometabolous insects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v.39, 2009, p.547–567.

IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. **Levantamento sistemático da produção agrícola**: Janeiro 2014. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/default.asp?t=5&z=t&o=1&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1&u7=1&u8=1&u9=1&u10=1&u11=1&u12=3&u13=1&u14=26674&u15=24&u16=1>>. Acesso em 09 de março de 2014.

JAFFÉ, K.; SÁNCHEZ, P. **Final report of project on ethological study of *Rhynchophorus palmarum***. Universidad Simón Bolívar-FONAIAP, Caracas, 1990.

KARLSON, P. New concepts on the mode of action of hormones. **Perspectives in Biology and Medicine**. v.6, 1963, p.203-214.

KATAGIRI, N.; ANDO, O.; YAMASHITA, O. Reduction of glycogen in eggs of the silkworm, *Bombyx mori*, by use of a trehalase inhibitor, trehalozin, and diapause induction in glycogen-reduced eggs. **Journal of Insect Physiology**. v.44, 1998, p.1205–1212.

KAUFMANN, C.; BROWN, M.R. Regulation of carbohydrate metabolism and flight performance by a hypertrehalosaemic hormone in the mosquito *Anopheles gambiae*. **Journal Insect Physiology**. v.54, 2008, p.367-377.

KUNIEDA, T.; FUJIYUKI, T.; KUCHARSKI, R.; FORET, S.; AMENT, S.A.; TOTH, A.L.; OHASHI, K.; TAKEUCHI, H.; KAMIKOUCHI, A.; KAGE, E.; MORIOKA, M.; BEYE, M.; KUBO, T.; ROBINSON, G. E.; MALESZKA, R. Carbohydrate metabolism genes and pathways in insects: insights from the honey bee genome. **Insect Molecular Biology**. v.15, 2006, p.563–576.

KURODA, M.; ISHIMOTO, M.; SUZUKI, K.; KONDO, H.; ABE, K.; KITAMURA, K.; ARAI, S. Oryzacystatins exhibits growth-inhibitory and lethal effects on different species of bean insects pest, *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera) and *Riptortus clavatus* (Hemiptera). **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v.60, 1996, p.209–212.

KUROOKA, S.; OKAMOTO, S.; HASHIMOTO, M. A novel and simple colorimetric assay for human serum lipase. **Journal of Biochemistry**. v.81, 1977, p.361-369.

LAHNSTEINER, F.; PATARNELLO, P. Investigations on the metabolism of viable and nonviable gilthead sea bream (*Sparus aurata*) eggs. **Aquaculture**. v.223, 2003, p.159–174.

LEE, A. J.; NOON, K. R.; JIANMONGKOL, S.; LAU, M.; JENKINS, G. J.; OSAWA, Y. Metabolism of aminoguanidine, diaminoguanidine, and NG-amino-L-arginine by neuronal NO-synthase and covalent alteration of the heme prosthetic group. **Chemical Research in Toxicology**. v.18, 2005, p.1927-1933.

LEHANE, M. J. Biology of blood-sucking insects. **Harper Collin Academic**. 1991, p.77-85.

LEHANE, M. J. Peritrophic matrix structure and function. **Annual Review of Entomology**. v.42, 1997, p.525-550.

LOPES, C. P.; VILELLA, G. G. Trealose e trealase em *Tenebrio molitor* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.70, 1972, p.577-583.

LORINI, I. Aplicação do manejo integrado de pragas em grãos armazenados,. In: Simpósio de Proteção de Grãos Armazenados, 1993. Passo Fundo, RS. **Anais...** Passo Fundo: Embrapa – CNPT, 1993. p. 117 – 126.

MAGALHÃES, J. A. S.; MORAES NETO, A. H. A.; MIGUENS, F. C. Nematodes of *Rhynchophorus palmarum*, L. (Coleoptera: Curculionidae), vector of the Red Ring disease in coconut plantations from the north of the Rio de Janeiro State. **Parasitology Research**. v.102, 2008, p.1281–1287.

MAJEROWICZ, D. **Estudo da expressão gênica da Proteína Ligadora de Acil-Coenzima A 1 de *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) e sua inibição por RNA de interferência.** Dissertação (Mestrado em Química Biológica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

MAJEROWICZ, D.; GONDIM, K. C. Insect Lipid Metabolism: Insights into Gene Expression Regulation. In: MANDAL, S. S. (Ed.). **Recent Trends in Gene Expression**. Nova Iorque: Nova Science Publishers, cap.7, 2013.

MARANHÃO, Z. G. **Entomologia Geral**. 2ª edição, São Paulo, Nobel, 1977.

MARIANO, A. C.; SANTOS, R.; GONZALEZ, M. S.; FEDER, D.; MACHADO, E. A.; PASCARELLI, B.; GONDIM, K. C.; MEYER-FERNANDES, J. R. Synthesis and mobilization of glycogen and trehalose in adult male *Rhodnius prolixus*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**. v.72, n.1, 2009, p.1-15.

MIRTH, C. K.; RIDDIFORD, L. M. Size assessment and growth control: how adult size is determined in insects. **Bio Assays**. v.29, 2007, p.344–355.

MORAES, J.; GALINA, A.; ALVARENGA, P. H.; REZENDE, G. L.; MASUDA, A.; VAZ-JUNIOR, I. S.; LOGULLO, C. Glucose metabolism during embryogenesis of the hard tick *Boophilus microplus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part A, v.146, 2007, p.528-533.

MURRAY, A.; HUNT, T. **The cell cycle**. Ed. Oxford University, Oress, New York, 1993.

NAVARRO, D.M.A.F.; MURTA, M.M.; DUARTE, A.G.; LIMA, I.S.; NASCIMENTO, R.R.; SANT'ANA, A.E.G. Aspectos práticos relacionados ao uso do Rincoforol, o feromônio de agregação da Broca-do-olho-do-coqueiro *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) no controle de pragas do coqueiro. Análise de sua eficiência em campo. **Química Nova**. v. 25, 2002, p.32-36.

NEGRISOLI-JÚNIOR, A. S.; SILVA, E. S.; NEGRISOLI, C. R. B.; SANTOS, N. L., GUZZO, E. C. **Criação em laboratório da broca-do-olho-do-coqueiro *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) visando pesquisas para o controle das suas larvas**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2011. 6p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Comunicado Técnico, 116).

NILSSON, B. O. Biological effects of aminoguanidine: an update. **Inflammation Research**. v.49, 1999, p.509-515.

NIOT, I.; POIRIER, H.; TRAN, T. T.; BESNARD, P. Intestinal absorption of long-chain fatty acids: evidence and uncertainties. **Progress in Lipid Research**.v.48, 2009, p.101-115.

NOVILLO, C.; CASTANERA, P.; ORTEGO, F. Characterization and distribution of chymotrypsin-like and other digestive proteases in Colorado potato beetle larvae. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**. v.36, 1997, p.81–201.

OVERGAARD, J.; MALMENDAL, A.; SORENSEN, J. G.; BUNDY, J.G.; LOESCHCKE, V.; NIELSEN, N. C.; HOLMSTRUP, M. Metabolomic profiling of rapid cold hardening and cold shock in *Drosophila melanogaster*. **Journal Insect Physiology**. v.53, 2007, p.1218–1232.

PISTILLO, D.; MANZI, A.; TINO, A.; BOYL, P. P.; GRAZIANI, F.; MALVA, C. The *Drosophila melanogaster* lipase homologs: a gene family with tissue and developmental specific expression. **Journal of Molecular Biology**. v.276, 1998, p.877-885.

PONNUVEL, K. M.; NAKAZAWA H.; FURUKAWA, S.; ASAOKA, A.; ISHIBASHI, J.; TANAKA, H.; YAMAKAWA, M. A lipase isolated from the silkworm *Bombyx mori* shows antiviral activity against nucleopolyhedrovirus. **Journal of Virology**. v.77, 2003, p.10725-10729.

RAFAEL, J. A.; MELO, G. A. R.; CARVALHO, C. J. B.; CASARI, S. A.; CONSTANTINO, R. **Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia**. São Paulo: Holos editora, 2012. 810p.

ROSETTO, M.; BELARDINELLI, M.; FAUSTO, A. M.; MARCHINI, D.; BONGIORNO, G.; MAROLI, M.; MAZZINI, M. A mammalian-like lipase gene is expressed in the female reproductive accessory glands of the sand fly *Phlebotomus papatasi* (Diptera, Psychodidae). **Insect Molecular Biology**. v.12, 2003, p.501–508.

RUBIO, G. J. D.; BUSTILLO, P. A. E.; VALLEJO, E. L. F.; ACUÑA, Z. J. R.; BENAVIDES M. P. Alimentary Canal and Reproductive Tract of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae). **Neotropical Entomology**. v.37, 2008, p.143-151.

RYAN, C. A. Protease Inhibitors. In: MARCUS, A. (Ed.). **Biochemistry of Plants**. Nova Iorque: Academic Press, 1981, v.16, p.351-370.

RYAN, R. O.; VAN DER HORST, D. J. Lipid transport biochemistry and its role in energy production. **Annual Review of Entomology**. v.45, 2000, p.233-260.

RYAN, R. O.; WELLS, M. A.; LAW, J. H. Lipid transfer protein from *Manduca sexta* hemolymph. **Biochemical and Biophysical Research Communication**. v.136, 1986, p.260–265.

RYMERSON, R. T.; BODNARYK, R. P. Gut protease activity in insect pests of canola. **Canadian Entomologist**. v.127, 1995, p.41–48.

SAKAI, T.; KITAMOTO, T. Differential roles of two major brain structures, mushroom bodies and central complex, for *Drosophila* male courtship behavior. **Journal of Neurobiology**. v.66, 2006, p.821–834.

SANTOS, R.; MARIANO, A. C.; ROSAS-OLIVEIRA, R.; PASCARELLI, B.; MACHADO, E. A.; MEYER-FERNANDES, J. R.; GONDIM, K. C. Carbohydrate Accumulation and Utilization by Oocytes of *Rhodnius prolixus*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**. v.67, 2008, p.55–62.

SARRO, F. B.; CROCOMO, W. B.; FERREIRA, J. M. S.; ARAUJO, R. P. C.; LABINAS, A. M. Feeding substrates to black coconut bunch weevil, *Homalinotus coriaceus* (Gyllenhal) (Coleoptera: Curculionidae), rearing in laboratory. **Neotropical Entomology**. v.34, 2005, n.3.

SASSER, J. N.; FRECKMAN, D. W. A world perspective on nematology: the role of the society. In: VEECH, J. A.; DICKSON, D. W. (Eds.). **Vistas on nematology**. Hyattsville: Soc Nematol, 1987, p.7–14.

SILVA, C. P.; LEMOS, F. J. A.; SILVA, J. R. **Digestão em insetos**. In: TERMIGNONI, C.; MASUDA, H.; SILVA-NETO, M. A. C.; VAZ-JUNIOR, I. S.(Eds.). *Tópicos Avançados em Entomologia Molecular*. Rio de Janeiro: INCT-EM, 2012. 582p.

SILVA-JUNIOR, E. F. **Síntese de derivados aminoguanidínicos para obtenção de protótipos com potencial antidiabético, atuando através da inibição dos produtos finais de glicação avançada**. XXIII Encontro de Iniciação Científica da Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2013.

SMITH, G. M.; ROTHWELL, K.; WOOD, S. L.; YEAMAN, S. J.; BOWNES, M. Specificity and localization of lipolytic activity in adult *Drosophila melanogaster*. **Biochemical Journal**. v.304, 1994, p.775-779.

SMITH, A. F.; TSUCHIDA, K.; HANNEMAN, E.; SUZUKI, T. C.; WELLS, M. A. Isolation, characterization, and cDNA sequence of two fatty acid-binding proteins from the midgut of *Manduca sexta*. **Journal of Biological Chemistry**. v.267, 1992, p.380-384.

SOULAGES, J. L.; WELLS, M. A. Lipophorin, the structure of an insect lipoprotein and its role in lipid transport in insects. **Advances in Protein Chemistry**. v.45, 1994, p.371-415.

STEELE, J. E. Glycogen phosphorylase in insects. **Insect Biochemistry**. v.12, 1982, p.131-147.

SUAREZ, R. K.; DARVEAU, C. A.; WELCH, K.C.; O'BRIEN, D. M.; ROUBIK, D. W.; HOCHACHKA, P. W. Energy metabolism in orchid bee flight muscles: carbohydrate fuels all. **Journal of Experimental Biology**. v.208, 2005, p.3573-3579.

TAPPARELLI, C.; METTERNICH, R.; EHRHARDT, C.; COOK, N. S. Synthetic low-molecular weight thrombin inhibitors: molecular design and pharmacological profile. **Trends in Pharmacological Science**. v.14, 1993, p.366-376.

TERRA, W. R.; CRISTOFOLETTI, P. T. Midgut proteases in three divergent species of Coleoptera. **Comparative Biochemistry and Physiology: Part B**. v.113, 1996, p.725-730.

THOMPSON, S. N. Trehalose: the insect 'blood' sugar. **Advances in Insect Physiology**. v.31, 2003, p.205-285.

THOMPSON, S. N.; DAHLMAN, D. L. Blood sugar formation due to abnormal elevated gluconeogenesis: aberrant regulation in a parasitized insect, *Manduca sexta* Linnaeus. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1454, 1999, p.133-142.

THORNALLEY, P. J. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. **Archives of Biochemistry and Biophysical**. v.419, 2003, p.31-40.

TSUCHIDA, K.; WELLS, M. A. Digestion, absorption, transport and storage of fat during the last larval stadium of *Manduca sexta*: Changes in the role of lipophorin in the delivery of dietary lipid to the fat body. **Insect Biochemistry**. v.18, n.3, 1988, p.263-268.

TSUCHIDA, K.; WELLS, M. A. Isolation and characterization of a lipoprotein receptor from the fat body of an insect, *Manduca sexta*. **Journal of Biological Chemistry**. v.265, 1990, p. 5761–5767.

TURUNEN, S. Metabolic pathways in the midgut epithelium of *Pieris brassicae* during carbohydrate and lipid assimilation. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v.23, 1993, p.681–689.

TURUNEN, S.; CRAILSHEIM, K. Lipid and sugar absorption. In: LEHANE, M. J.; BILLINGSLEY, P.F. (Eds.). **Biology of insect midgut**. Londres: Chapman & Hall, p.293-320, 1996.

VANIN, S.; BUBACCO, L.; BELTRAMINI, M. Seasonal variation of trehalose and glycerol concentrations in winter snow-active insects. **Cryo Letter**. v.29, 2008, p.485–491.

VIANA, P. F. **Manejo de *Diabrotica speciosa* na Cultura do Milho**. Sete Lagoas: Embrapa, 2010. 6p. (Embrapa, Circular Técnica, 141).

VLEUGELS, R.; LENAERTS, C.; VANDEN BROECK, J.; VERLINDEN, H. Signalling properties and pharmacology of a 5-HT₇-type serotonin receptor from *Tribolium castaneum*. **Insect Molecular Biology**. v.23, 2014, p.230-243.

WANDERLEY, M.; LOPES, G. M. B. Importância socioeconômica da produção de coco seco no Brasil. In: CINTRA, F. L. D.; FONTES, H. R.; PASSOS, E. E. M. et al. (Eds.). **Fundamentos tecnológicos para a revitalização das áreas cultivadas com coqueiro gigante no Nordeste do Brasil**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2009. v.233, p.14-23.

WATTANAPONGSIRI, A. **A revision of the genera *Rhynchophorus* and *Dynamis* (Coleoptera: Curculionidae)**. Department of Agriculture Science Bulletin. Bangkok I, 1966, p.1-328.

WEINTRAB, H; TIETZ, A. Triglyceride digestion and absorption in the locust, *Locusta migratoria*. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.306, 1973, p.31-41.

WEINTRAUB, H; TIETZ, A. Lipid absorption by isolated intestinal preparations. **Insect Biochemistry**. v.8, 1978, p.267-274.

WILLIAMS, C. M.; THOMAS, R. H.; MACMILLAN, H. A.; MARSHALL, K. E.; SINCLAIR, B. J. Triacylglyceride measurements in small quantities of homogenised insect tissue: comparison and caveats. **Journal of Insect Physiology**. v.57, 2011, p.1602-1613.

WINKLER, F. K.; D'ARCY, A.; HUNZIKER, W. Structure of human pancreatic lipase. **Nature**.v.343, 1990, p.771-774.

WINZELL, M. S.; LOWE, M. E.; ERLANSON-ALBERTSON, C. Rat gastric procolipase: sequence, expression, and secretion during high-fat feeding. **Gastroenterology**. v.115, 1998, p.1179-1185.

WOODCOCK, T. S.; BOYLE, E. E.; ROUGHLEY, R. E.; KEVAN, P. G.; LABBEE, R. N.; SMITH, A. B. T.; GOULET, H.; STEINKE, D.; ADAMOWICZ, S. J. The diversity and biogeography of the Coleoptera of Churchill: insights from DNA barcoding. **Biomed Central Ecology**. v.13, 2013, p.1-15.

YAPI, D. Y. A.; GNAKRI, D.; NIAMKE, S. L.; KOUAME, L. P. Purification and Biochemical Characterization of a Specific β -Glucosidase from the Digestive Fluid of Larvae of the Palm Weevil, *Rhynchophorus palmarum*. **Journal of Insect Science**. v.9, 2009, p.1-13.

YIN, A.; PAN, L.; ZHANG, X.; WANG, L.; YIN, Y.; JIA, S.; LIU, W.; XIN, C.; LIU, K.; YU, X.; SUN, G.; AL-HUDAIB, K.; HU, S.; AL-MSSALLEM, I. S.; YU, J. A transcriptomic study of the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* embryogenesis. **Insect Science**. 2013, 43p.

ZENG, F.; COHEN, A. C. 2000. Partial characterization of α -amylase in the salivary glands of *lygus Hesperus* and *L. lineolaris*. **Comparative Biochemistry and Physiology: Part B**. v.126, 2000, p.9–16.

ZIBAE, A. A digestive lipase of *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera: Pieridae): Purification, characterization, and host plants effects. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.81, n.1, 2012, p.1–19.

ZIBAE, A.; BANDANI, A. R.; KAFIL, M.; RAMZI, S. 2008. Characterization of α -amylase in midgut and salivary glands of *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae), rice striped stem borer. **Journal of Asia-Pacific Entomology**. v.11, 2008, p.201–205.

ZIBAE, A.; FAZELI-DINAN, M. Purification and characterization of a digestive lipase in rice green semi-looper, *Naranga aenescens* Moore (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Entomology and Zoology Studies**. v.1, 2012, p.35–84.

ZIEGLER, R. Changes in lipid and carbohydrate metabolism during starvation in adult *Manduca sexta*. **Journal of Comparative Physiology B**. v.161, 1991, p.125–131.

ZIEGLER, R.; VAN ANTWERPEN, R. Lipid uptake by insect oocytes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v.36, 2006, p.264–272.