



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL  
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA – IQB  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA - PPGQB

CAMILA PEREIRA DE LIMA CHICUTA

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO E DE FRAÇÕES PROTEICAS DAS  
SEMENTES DE *Crotalaria stipularia* (DESV., 1814) (FARBALES: FABACEAE)  
SOBRE A SOBREVIVÊNCIA E PARÂMETROS NUTRICIONAIS DE *Tribolium*  
*castaneum* (HERBST, 1797) (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)

MACEIÓ

2019

CAMILA PEREIRA DE LIMA CHICUTA

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO E DE FRAÇÕES PROTEICAS DAS  
SEMENTES DE *Crotalaria stipularia* (DESV., 1814) (FARBALES: FABACEAE)  
SOBRE A SOBREVIVÊNCIA E PARÂMETROS NUTRICIONAIS DE *Tribolium*  
*castaneum* (HERBST, 1797) (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química e Biotecnologia – IQB da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a aprovação e obtenção do título de mestra em Química e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Francis Soares Gomes

Coorientadora: Profa. Dra. Ruth Rufino do Nascimento

MACEIÓ

2019

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

C533a Chicuta, Camila Pereira de Lima.

Avaliação do efeito do extrato e de frações proteicas das sementes de *Crotalaria stipularia* (Desv., 1814) (Farbales: Fabaceae) sobre a sobrevivência e parâmetros nutricionais de *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae) / Camila Pereira de Lima Chicuta. - 2019  
91 f. : il color.

Orientador: Francis Soares Gomes.

Coorientadora: Ruth Rufino do Nascimento.

Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2019.

Bibliografia: f. 77-91.

1. Controle de pragas. 2. Hemaglutinação. 3. Inseticidas biológicos. I. Título.

CDU: 632.937



PPGQB

Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia



FOLHA DE APROVAÇÃO

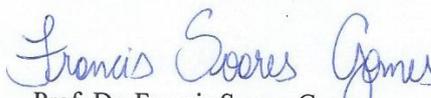
CAMILA PEREIRA DE LIMA CHICUTA

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO E DE FRAÇÕES PROTEICAS DAS SEMENTES DE *Crotalaria stipularia* (DESV., 1814) (FARBALES: FABACEAE) SOBRE A SOBREVIVÊNCIA E PARÂMETROS NUTRICIONAIS DE *Tribolium castaneum* (HERBST, 1797) (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

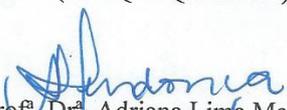
Dissertação aprovada em 30 de julho de 2019.

COMISSÃO JULGADORA:

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

  
Prof. Dr. Ruth Rufino do Nascimento  
(PPGQB/IQB/UFAL) Coorientador (a)

  
Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira  
(PPGQB/IQB/UFAL)

  
Prof. Dr. Adriana Lima Mendonça  
(UNIT/UFAL)

Dedico este trabalho aos meus pais Cláudia Chicuta e Silvestre Chicuta, pelo amor, compreensão e por sempre estarem ao meu lado.

## **AGRADECIMENTOS**

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

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

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

Ao meu namorado, Wellington Gomes, pela sinceridade, pelo incentivo, amor e carinho.

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

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

À minha tia e prima, Cléa e Larissa, por serem tão presentes na minha vida, por todo o apoio e carinho que têm por mim.

Ao meu orientador do mestrado, Professor Francis Soares Gomes, por me orientar com dedicação, sendo sempre atencioso e educado, não só comigo, mas com todos a sua volta.

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

Aos professores parceiros do Laboratório de Metabolômica e Proteômica, professora Edma Miranda e Hugo Juarez, pela convivência amigável e pelos ensinamentos.

À uma das pessoas mais incríveis que eu tive o prazer de conhecer, Janaína Kívia, pela amizade, por estar sempre ao meu lado durante toda a realização desse trabalho, sem você teria sido muito difícil e você sabe que eu poderia escrever essa página inteira agradecendo a você.

À amiga mais louca que Deus me deu, Andréa Carla, pela amizade, por todo o apoio emocional e profissional, pela ajuda na realização das etapas deste trabalho, e sobretudo pelo crescimento que pude obter pela convivência com você, você e Janaína são luz na minha vida.

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

Aos membros do Laboratório de Fisiologia de Insetos, Professor Luciano Aparecido Meirelles Grillo, por abrir as portas do laboratório onde foi realizado grande parte deste trabalho e aos seus orientandos, Antônio Thomás, Josiel da Silva, Mariana Macedo e Camilla Camerino, por serem sempre atenciosos e prestativos, contribuindo muito com esse trabalho.

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

Aos amigos que o Laboratório de Metabolômica e Proteômica me deu, Maria Laís, Marta Ângelo, João Arthur, Nayara, Tatielle, Alexandra, Roberta, Thaianny, Dávida e Fabiana, pelos momentos de descontração que deixaram meus dias mais leves.

Aos colegas Monizy, Stella e Ricardo, pelas xícaras de café.

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

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

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

À FAPEAL e ao CNPq, pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

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

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

O custo do cuidado é sempre  
menor que o custo do reparo.

Marina Silva

## RESUMO

O besouro castanho avermelhado, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae), é um dos insetos praga de grãos que mais gera danos à indústria de produtos de armazenamento. Para controlar esta praga, utiliza-se, principalmente, agrotóxicos. Entretanto, a resistência adquirida por insetos e a elevada toxicidade desses compostos sobre o ambiente e organismos não-alvos têm levado a um aumento na busca por produtos naturais não tóxicos e efetivos no controle de insetos praga. Extratos e lectinas (proteínas ou glicoproteínas que reconhecem carboidratos e aglutinam células) isoladas de plantas têm apresentado atividade inseticida e por esse motivo têm sido bastante estudados. Dentre elas, *Crotalaria stipularia*, pertencente à família Fabaceae, apresenta ampla distribuição em ambientes de Mata Atlântica sendo importante na alimentação bovina. Assim, o presente estudo objetivou analisar a atividade inseticida do extrato e frações lectínicas das sementes de *C. stipularia* sobre os insetos adultos de *T. castaneum*. Para tanto, foi preparado o extrato bruto em Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 das sementes da planta, seguido de precipitação salina com sulfato de amônio. Posteriormente, extrato e fração foram quantificados pelo método de Bradford e avaliados quanto à presença de lectinas. Em seguida, foram preparadas soluções de diferentes concentrações para o extrato (2%, 5% e 10% p/v) e para a fração (0,5%, 1%, 2% e 5% p/v). Foram avaliados a atividade inseticida do extrato e fração, a deterrência alimentar, os parâmetros nutricionais dos insetos tratados, os efeitos do extrato e lectina na reprodução desses insetos, além do perfil bioquímico apresentado por eles ao fim dos 28 dias de ensaio. O extrato (10% p/v) de *C. stipularia* causou a mortalidade de 100% dos insetos de *T. castaneum*, apresentando também uma atividade deterrente (10% p/v), além de exercer efeitos antinutricionais, afetando a reprodução e interferindo no metabolismo de proteínas, colesterol, triglicerídeos e de carboidratos dos insetos tratados. A fração proteica 20%, causou a mortalidade dos insetos em menor proporção que o extrato, revelando que a mortalidade pode estar também associada a outros metabólitos presentes no extrato e ausentes na fração, ou ocorre a sinergia entre eles. Diferentemente do extrato, a fração não apresentou atividade deterrente, porém afetou nos parâmetros nutricionais do inseto, além de alterar a reprodução e o metabolismo. Desta forma, sementes de *C. stipularia* são um biomaterial com potencial para ser utilizado no controle de *T. castaneum*.

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

## ABSTRACT

The reddish-brown beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae), is one of the insect pest of stored grains that further damages the storage product industry. To control this pest, pesticides are mainly used. However, insect resistance and the high toxicity of these compounds to the environment and non-target organisms have led to an increase in the search for toxicity-free and effective natural products to control pest insects. Extracts and lectins (proteins or glycoproteins that recognize carbohydrates and agglutinate cells) isolated from plants have shown insecticidal activity and for this reason have been well studied. *Crotalaria stipularia*, Fabaceae, are widely distributed in environments of Atlantic Forest being important in the bovine as food for. Thus, the objective of this study was to analyze the insecticidal activity of the extract and lectin fractions of *C. stipularia* seeds on adult insects of *T. castaneum*. These are, the crude extract was prepared in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 of the plant seeds, followed by saline precipitation with ammonium sulfate. Subsequently, extract and fraction were quantified using the Bradford method and evaluated for the presence of lectins. Then, solutions of different concentrations were prepared for the extract (2%, 5% and 10% w/v) and for the fraction (0.5%, 1%, 2% and 5% w/v). The insecticidal activity of the extract and fraction, the dietary determination, the nutritional parameters of the treated insects, the effects of the extract and lectin on the reproduction of these insects were evaluated, besides the biochemical profile presented by them after the 28 days of the test. The extract (10% w/v) of *C. stipularia* caused 100% mortality of *T. castaneum* insects, also presenting a deterrent activity (10% w/v), besides exerting antinutritional effects, affecting reproduction and interfering in the metabolism of proteins, cholesterol, triglycerides and carbohydrates of the treated insects. On the other hand, the protein fraction 20% caused mortality of the insects to a lesser extent than the extract, revealing that mortality may also be associated with other metabolites present in the extract and absent in the fraction or the synergy between them. Unlike the extract, the fraction did not present deterrent activity, however it affected in the nutritional parameters of the insect, besides altering the reproduction and the metabolism. In this way, seeds of *C. stipularia* are a biomaterial with potential to be used in the control of *T. castaneum*.

**Key words:** pest control, hemagglutination, bioinsecticide.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: maiores produtores de grãos do mundo.	18
Figura 2: estados que se destacam como maiores produtores de grãos do Brasil.	19
Figura 3: fases de larva (A e B), pupa (C) e adulto (D) de <i>T. castaneum</i> .	23
Figura 4: ciclo de vida de <i>T. castaneum</i> .	24
Figura 5: diferenciação da fêmea e do macho de <i>T. castaneum</i> na fase de pupa.	25
Figura 6: Esquema representando a aglutinação de eritrócitos promovida por lectinas. (A) Rede de aglutinação formada pela ligação de uma lectina aos carboidratos da superfície dos eritrócitos, e vista a olho nu no teste na placa de hemaglutinação (C). (B) Inibição da formação da rede de aglutinação por carboidratos livres e visto a olho nu pela precipitação dos eritrócitos na placa de hemaglutinação (D).	32
Figura 7: <i>C. stipularia</i> .	43
Figura 8: distribuição da <i>C. stipularia</i> no território brasileiro.	43
Figura 9: sementes de <i>C. stipularia</i> em diferentes estágios de maturação.	46
Figura 10: placa de microtitulação.	47
Figura 11: atividade hemaglutinante.	47
Figura 12: tratamento após colocado na placa de Petri.	53
Figura 13: vargem seca de <i>C. stipularia</i> atacada por espécie de lagarta.	55
Figura 14: sobrevivência dos adultos de <i>T. castaneum</i> tratados com diferentes doses do extrato de <i>C. stipularia</i> expressos pela curva de Kaplan-Meier.	59
Figura 15: deterrência alimentar dos insetos de <i>T. castaneum</i> tratados com diferentes doses do extrato de <i>C. stipularia</i> .	60
Figura 16: parâmetros nutricionais de adultos de <i>T. castaneum</i> mantidos em dietas artificiais constituídas por discos de farinha de trigo preparados com Tris-HCl 50 mM (controles) ou extratos das sementes de <i>C. stipularia</i> . A taxa de crescimento relativo (A) indica a quantidade de biomassa em mg obtida todos os dias por mg de peso corporal inicial. A taxa de consumo relativo (B) indica a quantidade de dieta consumida em mg por mg de peso corporal de	

- insetos por dia. A eficiência na conversão de alimentos ingeridos (B) (%) indica a quantidade de alimento ingerido pelos insetos como biomassa. 61
- Figura 17: número de larvas eclodidas através da reprodução de insetos de *T. castaneum* tratados com o controle (Tris-HCl 50 mM) e com diferentes doses de extrato de *C. stipularia*. 62
- Figura 18: perfil bioquímico do corpo macerado adultos de *T. castaneum* mantidos em dietas artificiais constituídas por discos de farinha de trigo preparados com Tris-HCl 50 mM (controles) ou extratos das sementes de *C. stipularia*. Nível de proteínas totais (A) em mg/mL, glicose (B) em mg de glicose/ mg de proteína, colesterol (C) em mg de colesterol/ mg de proteína e triglicerídeos (D) em mg de triglicerídeos/ mg de proteína. 65
- Figura 19: Eletroforese com gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10 % - 1: Extrato de *C. stipularia*, 2: fração 20% de *C. stipularia*. 68
- Figura 20: sobrevivência dos adultos de *T. castaneum* tratados com diferentes doses da fração 20% de *C. stipularia* e tris-HCl 50 mM como tratamento controle. 68
- Figura 21: deterrência alimentar dos insetos de *T. castaneum* tratados com diferentes doses do extrato de *C. stipularia*. 70
- Figura 22: parâmetros nutricionais de adultos de *T. castaneum* mantidos em dietas artificiais constituídas por discos de farinha de trigo preparados com Tris-HCl 50 mM (controles) ou fração 20% das sementes de *C. stipularia*. A taxa de crescimento relativo (A) indica a quantidade de biomassa em mg obtida todos os dias por mg de peso corporal inicial. A taxa de consumo relativo (B) indica a quantidade de dieta consumida em mg por mg de peso corporal de insetos por dia. A eficiência na conversão de alimentos ingeridos (B) (%) indica a quantidade de alimento ingerido pelos insetos como biomassa. 71
- Figura 23: número de larvas eclodidas através da reprodução de insetos de *T. castaneum* tratados com o controle (Tris-HCl 50 mM) e com diferentes doses da fração 20% das sementes de *C. stipularia*. 72
- Figura 24: perfil bioquímico do corpo macerado adultos de *T. castaneum* mantidos em dietas artificiais constituídas por discos de farinha de trigo preparados com Tris-HCl 50 mM (controles) ou fração 20% das sementes de

*C. stipularia*. Nível de proteínas totais (A) em mg/mL, glicose (B) em mg de glicose/ mg de proteína, colesterol (C) em mg de colesterol/ mg de proteína e triglicerídeos (D) em mg de triglicerídeos/ mg de proteína.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: lectinas de origem vegetal e seus mecanismos de ação, em alguns insetos	35
Tabela 2: levantamento dos municípios que aderiram à distribuição da <i>Crotalaria</i> como forma de controle do <i>Aedes</i> até março de 2016.	
Tabela 2: quantidade de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g) adicionada por fração	47
Tabela 4: doses do extrato testadas nos bioensaios para avaliação do extrato	50
Tabela 4: doses da fração testadas nos Bioensaios para avaliação da fração	51
Tabela 5: teste hemaglutinante do extrato	53
Tabela 6: teste de inibição da atividade hemaglutinante do extrato bruto de <i>C. stipularia</i> por carboidratos e glicoproteína	54
Tabela 7: análise qualitativa dos principais componentes fitoquímicos do extrato aquoso e da fração proteica de <i>C. stipularia</i>	56
Tabela 8: fracionamento salino. Concentração e AHE das frações oriundas do fracionamento salino com sulfato de amônio - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	65

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MDIC - Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços

GABA - Ácido gama-aminobutírico

DDT - Dicloro-difenil-tricloroetano

TDF - Teflubenzuron

DDF - Diflubenzuron

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	18
<b>2.1 Produção de Grãos</b> .....	18
<b>2.2 Insetos Praga</b> .....	20
<b>2.3 Ordem Coleoptera e Produtos Armazenados</b> .....	21
<b>2.4 <i>Tribolium castaneum</i></b> .....	22
<b>2.5 Métodos De Controle De Pragas</b> .....	25
2.5.1 Método químico.....	26
<b>2.6 Mecanismos de Defesa das Plantas</b> .....	28
<b>2.7 Extratos de Plantas no Controle de Pragas</b> .....	29
<b>2.8 Lectinas</b> .....	31
2.8.1 Funções e aplicações biotecnológicas.....	33
2.8.1.1 Atividade inseticida de lectinas e mecanismos de ação.....	34
<b>2.9 <i>Crotalaria stipularia</i></b> .....	40
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	44
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	44
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	44
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	45
<b>4.1 Insetos</b> .....	45
<b>4.2 Identificação da Espécie <i>C. stipularia</i></b> .....	45
<b>4.3 Obtenção das Sementes da <i>C. stipularia</i></b> .....	45
<b>4.4 Preparo do Extrato Bruto das Sementes em Diferentes Estágios de Maturação</b> .....	45
<b>4.5 Atividade Hemaglutinante</b> .....	46
<b>4.6 Teste de Inibição a Carboidratos</b> .....	48
<b>4.7 Precipitação com Sulfato de Amônio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a Partir do Extrato da <i>C. stipularia</i></b> .....	48
<b>4.8 Eletroforese</b> .....	49
<b>4.9 Determinação da Concentração de Proteína</b> .....	49
<b>4.10 Análise Fitoquímica</b> .....	49
4.10.1 Testes para fenóis, taninos pirogálicos e taninos flobatênicos.....	50

4.10.2 Testes para para antocianina e antocianidina, flavonas, flavonois e xantonas, chalconas e auronas, flavanonóis.....	50
4.10.3 Teste para leucoantonocianidinas, catequinas e flavanonas.....	50
4.10.4 Testes para flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas.....	50
4.10.5 Teste para esteroides e triterpenoides.....	50
4.10.6 Teste para saponinas.....	51
<b>4.11 Preparo das Soluções Testadas.....</b>	<b>51</b>
<b>4.12 Bioensaio.....</b>	<b>52</b>
4.12.1 Avaliação da atividade inseticida de extrato e fração Proteica.....	52
4.12.1.1 Deterrência alimentar e aspectos nutricionais.....	53
4.12.1.2 Efeitos na reprodução.....	53
4.12.1.3 Efeitos bioquímicos.....	53
<b>4.13 Análise Estatística.....</b>	<b>54</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>55</b>
<b>5.1 Atividade Hemaglutinante do Extrato Bruto das Sementes de <i>C. stipularia</i> de Diferentes Estágios de Maturação.....</b>	<b>55</b>
<b>5.2 Teste de Inibição a Carboidratos.....</b>	<b>56</b>
<b>5.3 Análise fitoquímica do extrato aquoso e fração proteica de <i>C. Stipularia</i>.....</b>	<b>57</b>
<b>5.4 Resultados dos Bioensaio com o Extrato das Sementes de <i>C. stipularia</i>.....</b>	<b>58</b>
<b>5.5 Fracionamento Salino do Extrato.....</b>	<b>66</b>
<b>5.6 Resultados dos Bioensaio com a Fração 20% das sementes de <i>C. stipularia</i>.....</b>	<b>68</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>75</b>
<b>7 PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>76</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>77</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O armazenamento de grãos e seus subprodutos fornecem o ambiente favorável para a infestação e a disseminação de insetos, como é o *T. castaneum* (Herbst 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae) conhecido vulgarmente como besouro castanho avermelhado ou caruncho (LORINI, 2002). As larvas e os adultos são pragas que infestam cereais moídos, sementes e grãos, entre outros produtos de armazenamento (ATHIÉ; PAULA, 2002). Insetos e plantas mantêm complexos mecanismos de interações na natureza que podem ser benéficos para ambos ou para apenas um deles (HOLTZ et al., 2003; VALUEVA; MOSLOV, 2004). Grande parte da evolução das interações entre insetos e plantas ocorre em nível químico. A defesa química das plantas envolve a participação de metabólitos primários (por exemplo, proteínas de defesa) e secundários (por exemplo, alcalóides, flavonóides, taninos e rotenóides) (CHRISPEELS; RAIKHELB, 1991; PEUMANS; VAN DAMME, 1995; MELLO; SILVA-FILHO, 2002; NAPOLEÃO, 2012).

Para o controle de populações de insetos-praga são utilizados muitos pesticidas (FLORES et al., 2004). Entretanto, esses compostos possuem elevada toxicidade sobre o ambiente e organismos não-alvo, incluindo os humanos, podendo levar a distúrbios de saúde graves (FLORES et al., 2004; LIMA et al., 2009). Além disso, o uso indiscriminado de pesticidas tem originado o desaparecimento de algumas espécies de insetos benéficos, aparecimento de novas pragas e a seleção de indivíduos resistentes (FLORES et al., 2004). A variedade de compostos vegetais que podem ser utilizados no controle de pragas aumentou nas últimas décadas podendo apresentar os seguintes efeitos: repelente, inibidor de alimentação, regulador de crescimento e atividade ovicida/larvicida (MACEDO et al., 2007; COELHO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011). Lectinas, proteínas ou glicoproteínas que se ligam a carboidratos, são amplamente encontradas nas plantas e possuem um papel fisiológico importante na defesa contra microorganismos e insetos (NAPOLEÃO et al., 2011; CAMAROTI et al., 2017; PROCÓPIO et al., 2017). Essas Lectinas apresentaram efeito entomotóxico contra insetos de diversas ordens, causando perturbações nutricionais, acarretando no atraso no desenvolvimento das larvas, bem como na redução do peso e sobrevivência dos adultos emergentes (COELHO et al., 2007; MACEDO et al., 2007; PROCÓPIO et al., 2015; AGRA-NETO et al. 2014; NAPOLEÃO et al., 2013). Apesar destes efeitos, seu mecanismo de ação ainda está sendo investigado (COELHO et al., 2009; NAPOLEÃO et al., 2011).

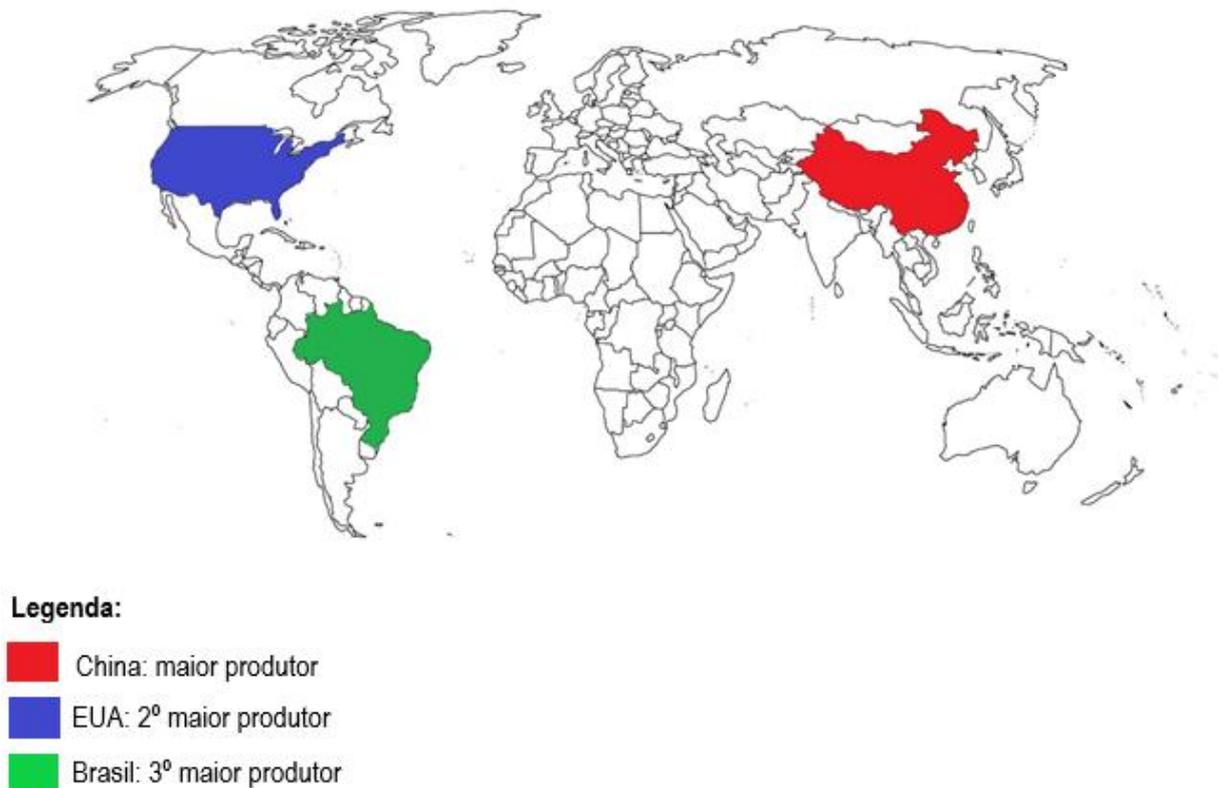
*Crotalaria stipularia* (Desv. 1814) (Farbales: Fabaceae) é uma espécie de planta amplamente distribuída na mata Atlântica brasileira. Para diferentes espécies do gênero *Crotalaria*, diversos são os usos citados, porém a constituição dos metabólitos e atividades biológicas da espécie *C. stipularia* ainda são desconhecidos. Assim a presente investigação objetiva, de maneira geral, avaliar a atividade inseticida do extrato e fração proteica de *C. stipularia*, sobre o coleóptero, *T. castaneum*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Produção de Grãos

De acordo com dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), foram produzidos mundialmente na safra de 2017, cerca de 2.859,6 bilhões de toneladas de grãos. O maior produtor de grãos do mundo, é a China, com aproximadamente, 600 milhões de toneladas produzidas, seguida por Estados Unidos da América com 500 milhões de toneladas e Brasil, com 226 milhões de toneladas de grãos produzidos em 2017. A figura 1, ilustra os maiores produtores de grãos do mundo. O grão mais produzido é o milho, com cerca de 1 bilhão de toneladas produzidas por ano, e junto com o trigo e o arroz, esses grãos correspondem a 60% da produção mundial (MAPA, 2018).

Figura 1: maiores produtores de grãos do mundo

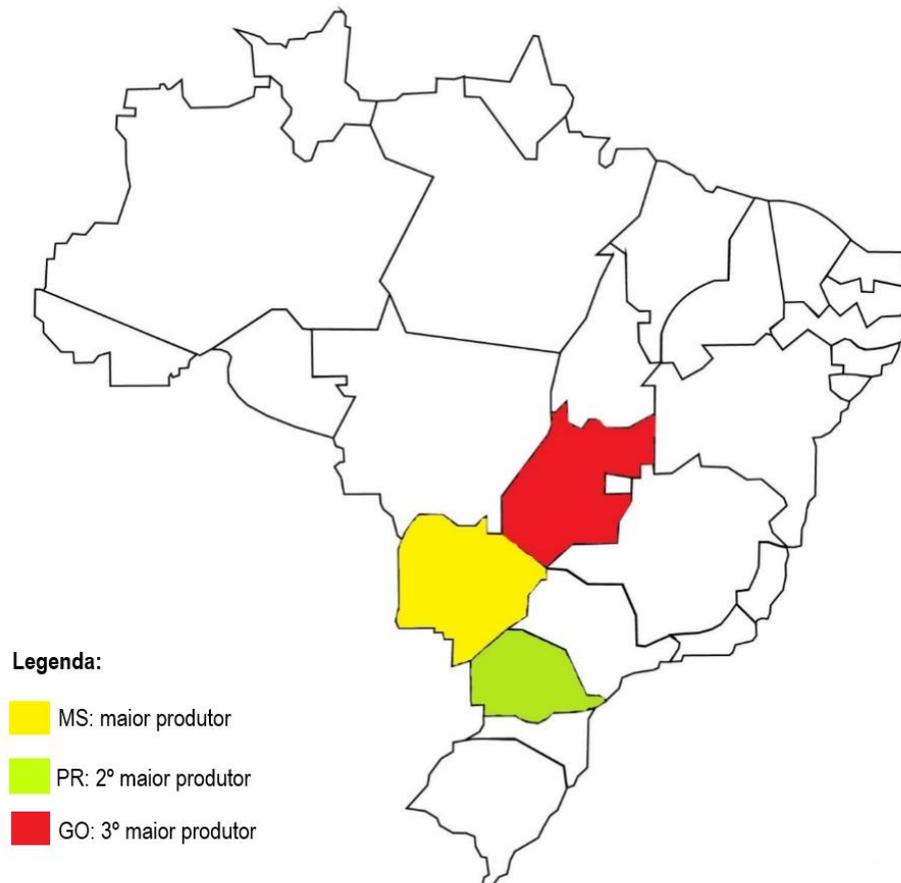


Fonte: Autor, 2018. MAPA, 2018. Adaptado de Mapa Mundi - Mapa Mundo, 2012.

O Brasil, além de produtor, é um grande exportador de grãos. Segundo o Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços (MDIC), foram exportados em 2017 aproximadamente 30 milhões de toneladas de grãos. Dentre os estados maiores

produtores, destacam-se Mato Grosso do Sul, Paraná e Goiás, como pode ser visto na figura 2. A essa grande produção está associado o fato desses estados possuírem grandes extensões de terra disponíveis para o plantio. (MAPA, 2018).

Figura 2: estados que se destacam como maiores produtores de grãos do Brasil



Fonte: autor, 2019. MAPA, 2018. Adaptado de Mapa do Brasil Preto e Branco, 2012.

A necessidade crescente por produtos para suprir a demanda mundial de alimentos, tendo em vista o crescimento populacional, exige que os grãos ou sementes colhidos nas lavouras sejam mantidos com o mínimo de perdas, quantitativas e qualitativas, até o consumo final (LORONI et al, 2015).

As perdas quantitativas médias causadas por pragas no Brasil, estimadas pela FAO e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), são de aproximadamente 10% do total produzido, o que causa grandes prejuízos na oferta destes alimentos (BRASIL, 1993; LORONI et al, 2015).

Além dessas, existem as perdas qualitativas, que são mais preocupantes, uma vez que podem comprometer totalmente o uso do grão produzido ou desclassifica-lo

para outro uso de menor valor agregado. No caso de trigo, os moinhos não aceitam lotes com insetos, pois isso comprometeria a qualidade da farinha, uma vez que poderá conter fragmentos de insetos indesejáveis na indústria de panificação e em outros subprodutos de trigo. Surge então a necessidade de se conhecer os insetos que mais geram danos a esses produtos e os possíveis métodos de controle, afim de minimizar os danos causados por essas pragas (LORONI et al, 2015).

## **2.2 Insetos Praga**

Considera-se praga para fins de controle, os insetos fitófagos a partir do momento em que atingem populações capazes de provocar danos de importância econômica. O ataque pode ocorrer nas diferentes partes dos vegetais ocasionando queda de valor comercial, de produção e até morte das plantas. Para a escolha do método mais adequado de controle das pragas é necessário a identificação do agente causador de dano, o conhecimento de sua biologia e comportamento e a caracterização da área atingida e da intensidade da infestação. Além disso, deve-se estar atento para a existência de inimigos naturais, que se alimentam das pragas e auxiliam no controle, devendo ser preservadas, mantendo-se a biodiversidade local e restringindo o uso de produtos químicos tóxicos (SALVADORI; LAU; PEREIRA, 2009).

As pragas podem ser primárias (internas e externas) ou secundárias, com alguns insetos associados. As pragas primárias são as que possuem a capacidade de atacar os grãos íntegros e sadios. Estas pragas internas possuem mandíbulas desenvolvidas para romper a película protetora dos grãos, penetrarem no seu interior e completarem seu ciclo evolutivo na região interna. Uma praga primária externa corresponde aos insetos que se alimentam da parte superficial do grão, porventura se alimentando da parte interna, quando a camada externa encontra-se destruída. As pragas secundárias são pragas que não possuem aparato para atacar os grãos íntegros, alimentando-se somente de grãos danificados. Insetos associados não atacam os grãos, alimentando-se dos detritos e fungos presentes nos grãos danificados. O ataque dos insetos aos grãos promove danos quantitativos (perda de peso provocado pela abertura de galerias), qualitativos (diminuição do valor nutritivo e da higiene) além da perda do poder germinativo e do vigor do grão (BARNEY, 1991; GALLO et al., 2002).

A presença de insetos nos grãos armazenados promove outros aspectos negativos associados. O consumo dos grãos pelos insetos resulta na liberação de

CO<sub>2</sub>, água e calor, o que pode alterar o teor de umidade do grão permitindo assim o surgimento de microrganismos. Os insetos expõem as partes nutritivas do grão quando quebram a barreira de proteção mecânica dos mesmos facilitando, assim, a infecção por fungos e outros microrganismos. Outra característica marcante dos insetos-pragas é o fato de atuarem disseminando os fungos ao longo da massa dos grãos (SAMSON et al., 1996).

Segundo Gallo et al. (2002), as pragas de armazenamento possuem características em comum que revelam sua alta capacidade de infestação e proliferação. Elas possuem um elevado potencial biótico, ou seja, apresentam alta capacidade de gerar novos indivíduos, aumentando enormemente sua população a cada geração. Outra característica é a infestação cruzada que revela a capacidade de infestar o produto tanto nas lavouras agrícolas quanto nos armazéns. Outro atributo encontrado é a polifagia que é a capacidade de atacar uma variada gama de produtos, permitindo assim, a sobrevivência das espécies em situações alimentícias variáveis.

### **2.3 Ordem Coleoptera e Produtos Armazenados**

Coleoptera é uma ordem pertencente à classe Insecta, superclasse Hexapoda, filo Artropoda e o reino Animalia. Sua classificação foi feita por Linnaeus em 1758. O termo *coleus* significa “caixinha” ou “estojo” e o termo *ptera* significa “asas”. Os coleópteros são conhecidos como besouros. Eles possuem asas anteriores modificadas denominadas de élitros que permitem a fácil distinção do grupo. O grupo apresenta entre 350.000 e 400.000 espécies, que representa 40% do total do grupo dos insetos (GALLO et al., 2002).

Os coleópteros possuem tamanhos variáveis, que vão de tamanhos diminutos (menos de 1 milímetro) até grandes tamanhos para insetos (200 milímetros de comprimento). Em geral, a morfometria de suas cabeças é arredondada, mas podem ser alongadas, formando o rostro, em cujo ápice encontra-se o aparelho bucal bem desenvolvido (tipos: prognata ou hipognata). Possuem olhos compostos (elíptica ou circular) e antenas na frente (2 a 60 artículos). Apresentam protórax bem desenvolvido e livre, além do resto do corpo ser formado pelo mesotórax (geralmente reduzido), metatórax e abdômen. Uma das características cruciais ao grupo é a presença dos élitros coriáceos ou córneos (asas anteriores modificadas), que não possuem a capacidade de dobrar nem de alçar vôo. Possuem asas posteriores membranosas

que porventura podem ser atrofiadas ou ausentes, permanecendo, quando em repouso, dobradas longitudinalmente e transversalmente. Podem possuir pernas do tipo ambulatórias (mais comum), fossoriais ou natatórias. Artículos tarsais podem variar de um a cinco, sendo comum apresentarem duas garras no último tarsômero. As larvas podem ou não apresentar pernas torácicas e dificilmente possuem larvópodos. As pupas são adécticas (sem mandíbula para escapar do casulo) e exaratas (pupa com apêndice livre), dificilmente encontrando-se do tipo obtecta (com apêndice visível anexado ao corpo) (GALLO et al., 2002; BORROR, 2005; BUZZI, 2005).

Os coleópteros geralmente são ovíparos e holometabólicos e o dimorfismo sexual não é muito evidenciado na maioria das espécies, sendo a fêmea maior que o macho. A postura dos ovos, em geral, ocorre no substrato alimentar das larvas (grãos, excremento, frutos, etc.). As larvas passam comumente por quatro a oito mudas e a duração dos variados estágios se vincula à possibilidade de sobrevivência do espécime (GALLO et al., 2002; BORROR, 2005; BUZZI, 2005).

São encontrados em quase todos os tipos de habitats, aéreos, terrestres e semi-aquáticos. Alimentam-se de uma vasta gama de alimentos (fitófagos, predadores, micófagos, necrófagos, etc.) com exceção de sangue. Variados predadores e parasitas utilizam os coleópteros (ovos, larvas, adulto) como fonte de alimento como, por exemplo, himenópteros, dípteros, aracnídeos, vertebrados, etc. Em relação a sua importância, os coleópteros possuem aspectos médicos quase que insignificantes, mas, em compensação, apresentam grande importância econômica por consumirem ou mesmo danificarem materiais valiosos ao ser humano (alimentos, roupas, madeiras, lavouras, grãos armazenados). Mais de 400 espécies de coleópteros, em registro, atacam produtos armazenados. Variadas funções ecológicas são atribuídas ao grupo, como por exemplo, controle de pragas e decomposição de matéria orgânica (coprófagos) (GALLO et al., 2002; BORROR, 2005; BUZZI, 2005).

#### **2.4 *Tribolium castaneum***

O *Tribolium castaneum* (Figura 3D) é uma das principais pragas de grãos armazenados com distribuição mundial, responsável por grandes perdas econômicas neste setor de produtos. A espécie pertence à ordem Coleoptera e família

Tenebrionidae e são popularmente conhecidos como besouro castanho (besouro vermelho) da farinha, por apresentarem uma coloração castanho-avermelhada. A família Tenebrionidae engloba mais de 30.000 espécies, das quais 100 estão associados aos grãos armazenados como pragas secundárias. O *T. castaneum* é considerado praga de produtos armazenados de importância econômica já que atacam grãos de grande valor comercial como milho, trigo e arroz. (ELIAS et al., 2008)

Os adultos de *T. castaneum* são besouros de coloração castanho-avermelhada, medindo de 2,3 mm a 4,4 mm de comprimento; o corpo é achatado e possui duas depressões transversais na cabeça, estima-se que o adulto viva cerca de 1 ano (BROWN et al, 2009; GALLO et al, 2002). Esse inseto passa por metamorfose completa em seu desenvolvimento, passando pelos quatro estágios, ovo, larva (Figura 3 A e B), pupa (Figura 3 C) e adulto.

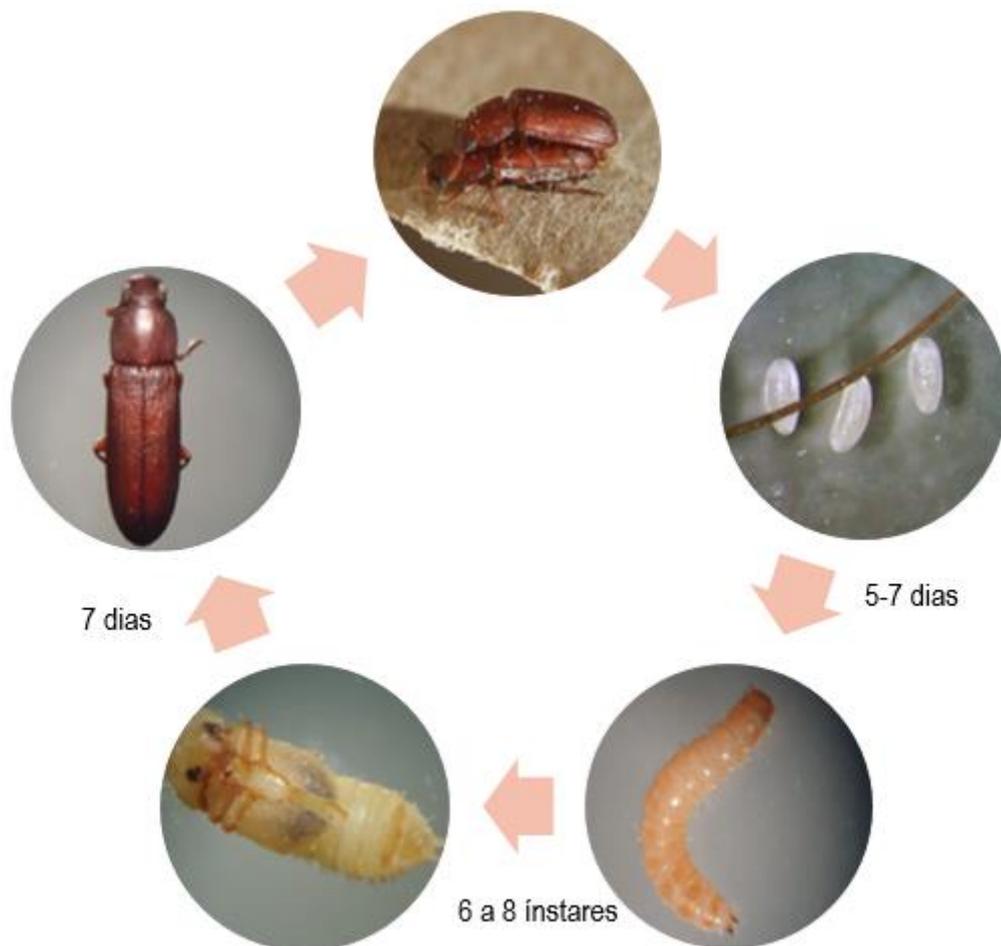
Figura 3: Fases de larva (A e B), pupa (C) e adulto (D) de *T. castaneum*



Fonte: LORONI et al, 2015.

As fêmeas colocam de 400 a 500 ovos em fendas de paredes, na sacaria e sobre os grãos, os ovos demoram de 5-7 dias para eclodirem. As larvas são branco-amareladas, cilíndricas, medindo até 7 mm de comprimento passando por 6 a 8 ínstares até chegarem à fase de pupa. O estágio de pupa dura cerca de 7 dias, o ciclo de vida (Figura 4) pode demorar de 30 a 40 dias em condições favoráveis, temperatura de 35 °C e umidade relativa do ar de 70% (BERNARDO QUÍMICA, 2006). Segundo BROWN et al (2009) é possível diferenciar o macho da fêmea na fase de pupa, conforme a figura 5, onde as pupas femininas (esquerda) podem ser distinguidas pelas pontas posteriores da genitália (setas), que estão ausentes nos machos (direita).

Figura 4: ciclo de vida de *T. castaneum*



Fonte: autor, 2019. Adaptado de LORONI et al, 2015.

Figura 5: diferenciação da fêmea e do macho de *T. castaneum* na fase de pupa



Fonte: BROWN et al (2009)

## 2.5 Métodos de Controle de Pragas

Vários métodos são utilizados para o controle de pragas agrícolas. Métodos mecânicos como corte, esmagamento e catação; métodos de controle por comportamento utilizando feromônios; métodos culturais como, por exemplo, rotações culturais, aração do solo e a escolha da época do plantio e colheita; métodos de resistência de plantas, que englobam plantas transgênicas e inseticidas; controle físico, como o uso de fogo, drenagem, inundação e temperatura; controle biológico, com a utilização de parasitóides, predadores, agentes entomopatogênicos, entre outros; controle com radiação ionizante; e os métodos químicos, por meio do uso de variados inseticidas, cuja formulação pode ser bem variada como pó seco, pó molhável, pó solúvel, granulados, emulsões, soluções concentradas, aerossóis, gasosos, suspensão líquida, pastas, microcápsulas e espalhantes adesivos (GALLO et al., 2002).

No controle de grãos armazenados se utiliza, geralmente, métodos de fumigação, polvilhamento ou pulverização, descritos a seguir, de acordo com Gallo et al. (2002):

1) A fumigação é o processo mais usual e pode ser aplicada em produtos a granel ou em produtos ensacados. Sua finalidade é exterminar os insetos nos seus variáveis estágios do ciclo biológico (ovo até adulto). Apresenta a vantagem de

necessitar de um menor tempo de exposição. Vale salientar que a fumigação de inseticidas atinge variados tipos de insetos, mas possui pouco ou nenhum efeito sobre os fungos de armazenamento.

2) O polvilhamento ocorre por meio da mistura de pó químico nos grãos e é recomendado para o tratamento de pequenas quantidades. Sua ação se torna eficaz misturando o pó direta e homoganeamente aos grãos armazenados após a fumigação.

3) A pulverização ocorre por micropulverizações com um atomizador. Algumas substâncias utilizadas são a deltametrina, bifentrina, pirimifós metil e feniltroton.

### 2.5.1 Método químico

Inseticidas são substâncias que apresentam propriedades letal, repelente, deterrente, inibidora de crescimento ou reprodução e/ou qualquer outra ação que resulte em efeito deletério sobre os insetos (ADDOR, 1994; VIEGAS JÚNIOR, 2003). A utilização de inseticidas é uma estratégia humana para o controle de insetos-pragas que vem provocando inúmeros danos à sociedade. Com o crescimento da população, aumentou também a demanda alimentar, incentivando o uso de grandes quantidades de pesticidas, uma vez que a prevenção e o combate às pragas agrícolas aumentam a quantidade e qualidade dos alimentos disponibilizados para a população (CALDAS, 2000). O enxofre, cal e alguns sais de arsênio foram as primeiras substâncias utilizadas para o combate de pragas e doenças agrícolas (SANCHES, 2003).

Somente a ação deletéria de uma substância sobre o inseto não a indica como um inseticida viável. Em condições ideais um inseticida deve possuir diversas propriedades associadas a sua atividade como: ação eficiente em baixas concentrações; ausência de toxicidade para outros animais e não possuir efeito cumulativo nos tecidos adiposos de mamíferos, incluindo humanos; ausência de fitotoxicidade; fácil manipulação, aplicabilidade e obtenção; e ser viável economicamente (ADDOR, 1994; VIEGAS JÚNIOR, 2003).

Desde a década de 40 do século passado, produtos naturais inseticidas vêm sendo usados na agricultura. Em meados da Segunda Guerra Mundial, produtos sintéticos passaram a ganhar espaço devido às pesquisas com produtos biocidas (VIEGAS JÚNIOR, 2003). Durante a Segunda Guerra, os esforços das atividades científicas das principais potências econômicas e bélicas estavam direcionados para soluções de problemas oriundos dos conflitos militares, onde algumas das armas

desenvolvidas para estes conflitos, com o propósito de eliminar os inimigos, eram os compostos organo-sintéticos. Com o fim a Segunda Guerra, o uso militar dos organo-sintéticos se tornou ocioso, sendo aproveitadas todas as estruturas laboratoriais e o conhecimento adquirido de substâncias químicas letais para outras finalidades, como o combate de insetos-praga na agricultura (MORAGAS; SCHNEIDER, 2003).

Os inseticidas utilizados atualmente em diversas partes do mundo possuem toxicologia variável. Grande parte dos inseticidas utilizados atualmente são neurotóxicos e apresentam ação rápida. Os neurotóxicos podem atuar sobre a transmissão sináptica como: organofosforados e carbamatos, que inibem a enzima acetilcolinesterase; nicotina, neonicotinóides e spinosinas, que atuam como a acetilcolina; o Cartap, que compete pelos receptores de acetilcolina; avermectinas e milbemicinas, que atuam de forma similar ao neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA); ciclodienos e fenil-pirazóis, que atuam inversamente em relação do GABA; formamidinas, que atuam como o neurotransmissor excitatório octopamina. Outros inseticidas neurotóxicos atuam na transmissão axônica, como piretróides e o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), que modulam a ação dos canais de sódio ocasionando a hiperexcitabilidade axônica levando, assim, à morte do inseto. As oxadiazinas, também atuam bloqueando os canais de sódio. Outros inseticidas atuam em nível da regulação do crescimento como: inibidores da síntese de quitina; juvenóides, que possuem ação similar aos hormônios juvenis; antijjuvenóides; e agonistas de ecdisteróides. Inseticidas inibidores da respiração celular também são encontrados, tais como inibidores do transporte de elétrons, da síntese de ATP e da ATPase. Numerosos outros inseticidas também são encontrados com ações física, protoplasmática e estomacal (GALLO et al., 2002).

Quanto aos problemas relacionados ao uso de inseticidas, pode-se relatar a ressurgência e aparecimento de novas pragas; surtos secundários; morte de insetos polinizadores; distribuição e transporte dos inseticidas além dos ambientes que foram implantados (vento e chuva); contaminação residual em alimentos; resistências de pragas; e desequilíbrios biológicos (eliminação de inimigos naturais e de competidores alimentar). Com a utilização de substâncias químicas para controlar pragas de diversos alimentos, a superdosagem de pesticidas na dieta humana pode ocasionar problemas de saúde agudos e crônicos (GALLO et al., 2002).

Além dessa gama de inseticidas mencionados, compostos de procedência natural vem ganhando espaço nos dias de hoje, pois com o aumento da variedade de substâncias naturais com ação inseticida, pode-se minimizar a tendência do aumento da emergência de populações de insetos resistentes (VIEGAS JÚNIOR, 2003; CAVALCANTE; MOREIRA; VASCONCELOS, 2006). Soluções de extrato bruto, óleos voláteis e de proteínas têm sido investigadas como preparações com ação inseticida. Apesar do fato dos inseticidas naturais, muitas vezes, não possuírem a mesma eficiência dos inseticidas sintéticos, sua utilização geralmente acarreta num menor risco ao homem e ao ambiente como também a diminuição dos efeitos deletérios sobre organismos não-alvo (MENEZES, 2005; PAIVA et al., 2011).

## **2.6 Mecanismo de Defesa das Plantas**

Plantas e insetos coexistem há mais de 350 milhões de anos. Em processo evolutivo, desenvolveram estratégias para evitar os sistemas de defesa uns dos outros. Essa corrida armamentista evolutiva entre plantas e insetos resultou no desenvolvimento de um sistema de defesa elegante em plantas que tem a capacidade de reconhecer moléculas ou sinais de células danificadas, assim como os animais, e ativa a resposta imune das plantas contra os herbívoros (HOWE; JANDER, 2008; HARE, 2011).

Para combater o ataque de herbívoros, as plantas produzem estruturas morfológicas ou metabólitos primários e secundários que têm efeitos tóxicos, repelentes e/ou antinutricionais sobre os herbívoros (USHA; JYOTHSNA, 2010; WAR et al., 2011).

As plantas confrontam os herbívoros de duas maneiras, através da defesa direta ou através da defesa indireta. Agem diretamente quando afetam a preferência ou a sobrevivência das plantas hospedeiras e o sucesso reprodutivo, e indiretamente, por meio de outras espécies, como inimigos naturais das pragas de insetos (HOWE; JANDER, 2008; DUDAREVA, et al., 2006; ARIMURA, et al., 2009).

As defesas diretas são mediadas por características da planta que afetam a biologia dos herbívoros, como proteção mecânica na superfície. Plantas podem apresentar estruturas, como pêlos, tricomas, espinhos e folhas mais grossas que dificultam o acesso aos tecidos vegetais mais internos ou podem produzir substâncias

químicas tóxicas, como terpenóides, alcalóides, antocianinas, fenóis e quinonas que matam ou retardam o desenvolvimento dos herbívoros (HANLEY, et al., 2007).

As defesas indiretas contra insetos são mediadas pela liberação de uma mistura de voláteis que atraem especificamente inimigos naturais dos herbívoros e / ou alimentos (por exemplo, néctar extra floral) e habitação para aumentar a eficácia dos inimigos naturais (ARIMURA, et al., 2009).

A pesquisa sobre interações planta-herbívoro é uma das áreas de pesquisa mais importantes e multidisciplinares em biologia vegetal envolvendo várias áreas de conhecimento para descrever processos químicos e ecológicos que influenciam o resultado de interações planta-herbívoro. A compreensão de como as plantas se comunicam com seus vizinhos, simbiontes, patógenos, herbívoros e com seus “guarda-costas” pessoais - os inimigos naturais, tanto acima quanto abaixo do solo, ainda estão incipientes. Esta é uma área que tem um grande potencial para utilização na proteção de cultivos. Compreender a natureza da expressão gênica das características defensivas da planta tem aplicação no projeto de plantas cultivadas com melhor proteção contra os herbívoros. Isso, por sua vez, reduz a necessidade do uso de pesticidas nocivos para o controle de insetos (WAR, et al., 2012).

## **2.7 Extratos de Plantas no Controle de Pragas**

O uso de plantas com propriedades inseticidas é uma prática muito antiga. Até a descoberta de inseticidas organossintéticos, na primeira metade do século passado, as substâncias extraídas de vegetais eram amplamente utilizadas no controle de insetos. As variações na eficiência do controle, devido às diferenças na concentração do ingrediente ativo entre plantas e, principalmente, os baixos efeitos residuais, que apontava à necessidade de várias aplicações em períodos curtos, fez com que os inseticidas vegetais fossem gradativamente substituídos pelos sintéticos (ROEL et al., 2000; GALLO et al., 2002).

A preocupação crescente com o meio ambiente tem sido constante e, dessa forma, observa-se o crescimento da agricultura orgânica visando evitar os efeitos prejudiciais dos produtos químicos ao agroecossistema e, assim, substituí-los por métodos alternativos de controle de pragas e doenças, preservação das propriedades do solo, manejo de plantas daninhas, cobertura morta, adubação verde e rotações de culturas, entre outras práticas (LUZ et al., 2007). Nesse contexto, segundo

VASCONCELOS et al. (2006), uma alternativa que vem sendo retomada para o controle de pragas é o uso de metabólitos secundários presentes em algumas plantas, as quais são chamadas de “plantas inseticidas”. Diversas substâncias oriundas dos produtos intermediários ou finais do metabolismo secundário dessas plantas, que podem ser encontradas nas raízes, folhas e sementes, entre eles, rotenóides, piretróides alcalóides e terpenóides, podem interferir severamente no metabolismo de outros organismos, causando impactos variáveis, como repelência, deterrência alimentar e de oviposição, esterilização, bloqueio do metabolismo e interferência no desenvolvimento, sem necessariamente causar a morte (MEDEIROS, 1990; LANCHER, 2000). Nesse último caso, pode haver retardamento no desenvolvimento do inseto, como frisaram HERNANDEZ; VENDRAMIM (1998).

Duas abordagens podem ser reconhecidas quanto à utilização de plantas com atividades sobre os insetos. Na primeira delas, a atividade é reconhecida e os compostos são isolados, identificados e posteriormente sintetizados em larga escala. Nesse processo há possibilidade de alterações de grupos funcionais responsáveis pela atividade de forma a acentuar os efeitos desejados ou diminuir a toxicidade, quando houver. No segundo caso, uma vez identificada a atividade inseticida em alguma espécie vegetal, sua utilização se dá na forma de extrato vegetal bruto (TANG; YANG, 1988).

Para avaliar os efeitos sobre insetos, os alimentos (folhas, grãos) ou as posturas são imersos por determinados períodos nos extratos, ou então estes são aplicados em dietas artificiais ou sobre as pragas, presas e hospedeiros. FERNANDES et al. (1996) constataram, como efeitos, a inibição da alimentação ou deterrência, redução de consumo alimentar, atraso no desenvolvimento, deformações, esterilidade dos adultos e mortalidade. VENDRAMIM (1997) também constatou repelência, inibição da oviposição, alterações do sistema hormonal, alterações no comportamento sexual. De acordo com GALLO et al. (2002), o objetivo principal do uso de extratos vegetais é reduzir o crescimento da população de pragas. Segundo os autores, a mortalidade do inseto é apenas um dos efeitos e que, geralmente, necessita de concentrações muito elevadas. Os efeitos de extratos de plantas na sobrevivência da fase embrionária de lepidópteros pragas são pouco conhecidos devido ao baixo ou nenhum efeito sobre os ovos. Esse fato se deve à existência de uma camada lipídica ou cerosa na parte interna do córion, com capacidade de reter substâncias tóxicas, impedindo-as de atingir o embrião. No

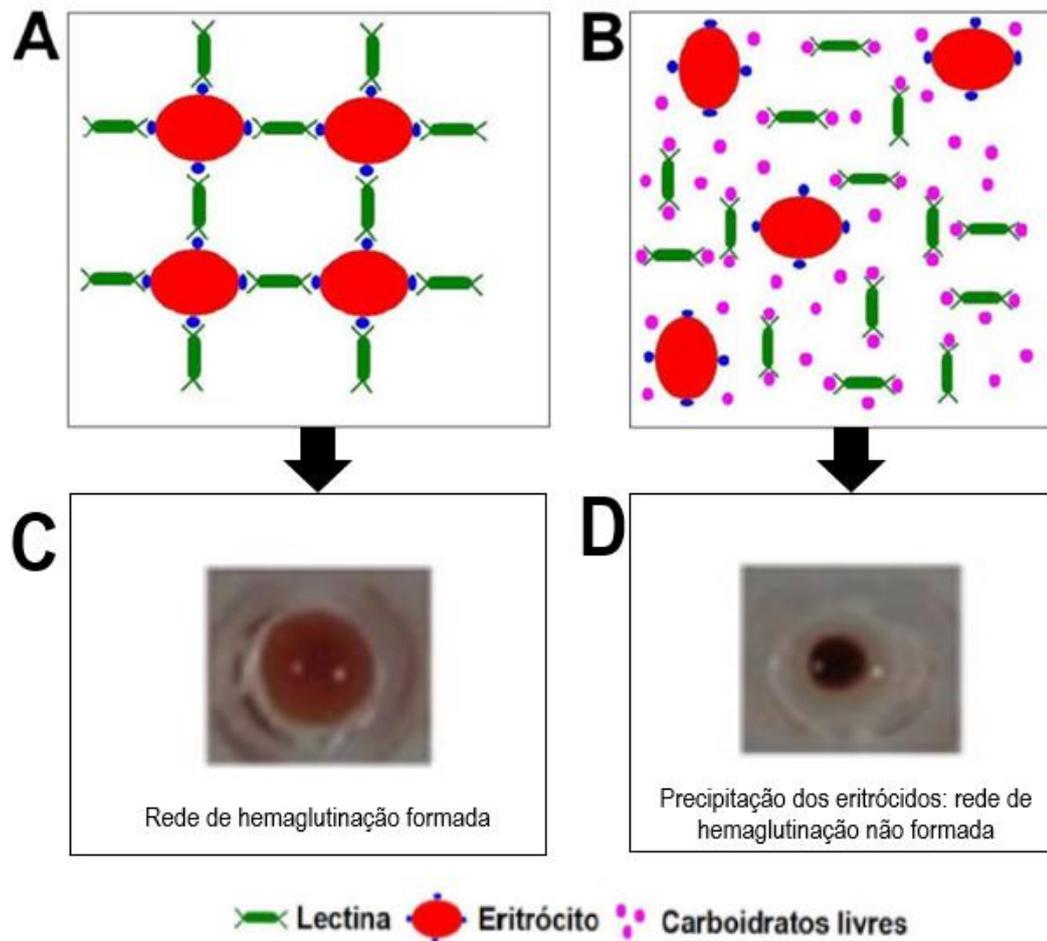
entanto, o efeito ovicida pode variar de acordo com a espécie do inseto e com as características das substâncias utilizadas (TORRES et al., 2006).

Metabólitos oriundos do metabolismo primário, como lectinas e inibidores de tripsina, também vem demonstrando potencial atividade inseticida. Estudos realizados com *Moringa oleifera* Lam., conhecida como moringa e pertencente à família Moringaceae, mostraram o potencial dessa planta no controle de insetos. O extrato aquoso de sementes apresentou ação larvicida contra *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) sendo capaz de causar 100% de mortalidade após 24 h de exposição (FERREIRA et al., 2009). Dentre os compostos responsáveis por essa ação, está a lectina, um tipo de proteína encontrada nas sementes dessa planta, que impede o processo de digestão e absorção de nutrientes nos insetos, causando morte por desnutrição (FRANCO-FRAGUAS et al., 2003; SANTOS et al., 2006).

## 2.8 Lectinas

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

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



Fonte: Paiva et al., 2011.

Devido à capacidade de ligação das lectinas, estas podem interagir com um ou mais tipos de carboidratos, de forma reversível, fornecendo grande estabilidade as ligações, que podem ser por diversas forças como: ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals e interação hidrofóbicas (LANNOO; VAN DAMME, 2010). Existem diversas formas de extração de lectinas onde inicialmente é preparado o extrato bruto, através de uma solução de extração, normalmente soluções tamponantes de variadas faixas de pH, com a finalidade de solubilizar as moléculas oriundas do material de partida. Preparações de extratos brutos também pode fazer uso de soluções salinas, a exemplo do extrato bruto de folhas de *Schinus terebinthifolius* (aroeira-da praia) e *Myracrodruon urundeuva* (GOMES et al., 2013, NAPOLEÃO et al., 2013). Extratos

aquosos também são descritos na literatura como solução de extração de lectinas (COELHO et al., 2009). Preparações ricas em lectina podem ser obtidas com o fracionamento proteico. O fracionamento salino é a técnica mais empregada em etapas de concentração de proteínas, uma vez que a adição de sal, a exemplo do sulfato de amônio ( $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ ), remove a camada de solvatação que envolve a molécula sem danificar a estrutura molecular, dificultando a sua miscibilidade no meio aquoso. Logo com a remoção da camada de solvatação há um aumento nas interações entre proteínas do meio aquoso, permitindo a formação de um denso complexo de proteínas, provocando assim a precipitação dessas proteínas e ressuspensão em volume menor, promovendo sua concentração (PROCÓPIO et al., 2017).

### 2.8.1 Funções e aplicações biotecnológicas

Diversas importâncias biológicas têm sido atribuídas as lectinas. Nas plantas, tem se observado ação defensora contra microrganismos patogênicos e insetos, bem como participação em mecanismos de nodulação, estocagem e mobilização de proteínas e carboidratos de reserva além do alongamento da parede celular (KENNEDY et al., 1995; HIRSCH, 1999; ISIDRO et al., 2001; CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002; PAES et al., 2002; LIMPENS & BISSELING, 2003). Além destas outras inúmeras atividades, muitas aplicações biológicas são encontradas como o reconhecimento, diferenciação e determinação de tipos celulares (DANGUY et al., 1998; FUNK; THOMPSON, 1998), isolamento e análise estrutural de oligossacarídeos e glicoconjugados (ENDO, 1996; HAYUNGA; SUMMER, 1986; XIE et al., 2009; YAMASHITA; OHKURA, 2014), envolvimento no processo de cicatrização (GONZÁLEZ et al., 2014), atividade antiproliferativa (SILVA et al., 2014), anti-inflamatória (LEITE et al., 2012), anti-parasitaria (CASTANHEIRA et al., 2015), antitumoral (ZHANG et al., 2015), antimutagênico e antioxidante (FRASSINETTI et al., 2015), imunomoduladora (PRASANNA; VENKATESH, 2015), antifúngica (CHIKALOVETS et al., 2015), antibacteriana (CARVALHO et al., 2015), antiviral (GORDTS et al., 2015) e inseticida (NAPOLEÃO et al., 2013).

Lectinas têm apresentado atividade entomotóxica sobre os mais variados grupos de insetos, pertencentes às Ordens Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Homoptera, Hymenoptera, Isoptera, Lepidoptera e Neuroptera (PAIVA et al., 2011). Geralmente elas resistem à degradação proteolítica no trato digestivo dos insetos e

interagem com moléculas glicosiladas, interferindo nas funções de enzimas digestivas e proteínas assimilatórias dificultando, desta forma, a digestão e a absorção de nutrientes (COELHO; MARANGONI; MACEDO, 2007; OLIVEIRA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2015).

#### 2.8.1.1 Atividade inseticida de lectinas e mecanismos de ação

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

A ingestão de lectina em dietas artificiais, ou sua expressão em plantas transgênicas são as técnicas mais empregadas para mostrar a redução no desempenho de insetos pertencentes a diferentes ordens, incluindo Lepidoptera, Coleoptera e Hemiptera (VANDENBORRE et al., 2011). Numerosos estudos têm abordado a toxicidade de lectinas, mas apenas alguns investigaram o modo de ação pelo qual as lectinas vegetais impõem efeitos prejudiciais em insetos, conforme mostrado na tabela 1 (CACCIA et al., 2012; FITCHES e GATEHOUSE, 1998; LI et al., 2009; MACEDO et al., 2004). Compreender o modo de ação das proteínas entomotóxicas também pode contribuir para a elucidação a evolução de plantas e

insetos, bem como contribuir para o desenvolvimento de estratégias menos prejudiciais para o controle de pragas.

Tabela 1: lectinas de origem vegetal e seus mecanismos de ação, em alguns insetos.

<b>Lectinas (Fonte)</b>	<b>Insetos (Ordem)</b>	<b>Mecanismo</b>	<b>Referências</b>
Folhas de <i>Myracrodruon urundeuva</i> (MuLL)	<i>Sitophilus zeamays</i> (Mots., 1855) (Coleoptera: Curculionidae)	Exerce um efeitos deletérios, sobre <i>S. zeamais</i> , interferindo negativamente no ganho de biomassa crescimento, absorção de nutrientes e na atividade de diferentes enzimas digestivas (tripsina, $\alpha$ -amilase e protease).	SOUZA, et al., 2018.
<i>Rhizoctonia solani</i> aglutinina (RSA) e <i>Sambucus nigra</i> Aglutinina I e II (SNA-I e SNA-II)	<i>Tribolium castaneum</i> (Coleoptera: Tenebrionidae)	Capacidade de passar através da matriz peritrófica, reagindo com o epitélio intestinal.	WALSKI, et al., 2014.
Sementes de <i>Moringa oleifera</i> (WSMoL)	<i>Aedes aegypti</i> (Diptera: Culicidae)	Apresentou atividade ovicida em ovos que já completaram a embriogênese e a ausência de incubação de ovos indica que embriões dentro dos ovos foram mortos.	SANTOS, et al., 2012.
Entrecasca e cerne de <i>Myracrodruon urundeuva</i> (MuBL e MuHL)	<i>Nasutitermes corniger</i> (Isoptera: Termitidae)	Inibiu as atividades da tripsina e $\beta$ -glicosidade do intestino e estimulou as atividades de endoglucanase e fosfatase ácida.	NAPOLEÃO, et al., 2010.
Sementes de <i>Dioclea violacea</i> (DVL)	<i>Anagasta kuehniella</i> (Lepidoptera: Pyralidae)	Inibiu as atividades carboidráticas presentes no intestino médio, como $\alpha$ -amilase e a glucosidase.	COELHO, et al., 2007.

<i>Galanthus nivalis</i> aglutinina (GNA)	<i>Aulacorthum solani</i> (Hemiptera: Alphididae)	Reduziu a fecundidade de <i>Aulacorthum solani</i>	DOWN, et al., 1996
---	---	--	--------------------

Fonte: autor, 2019. Adaptado de Paiva et al., 2011.

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

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

Anomalias na formação da membrana peritrófica funcional e a ruptura das estruturas de microvilosidades foram relatadas em insetos alimentados com dietas contendo lectina (FITCHES; GATEHOUSE, 1998; HOPKINS; HARPER, 2001; LI et al., 2009). (CACCIA et al. 2012) Lectina de bulbos de *Hippeastrum striatum* (Lam.) (amarílis) interagem com as células da borda em escova do intestino médio e interfere com a absorção normal de nutrientes de *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833) (Lepidoptera, Noctuidae), afetando o crescimento larval normal. Habibi et al. (2000), ao estudarem os efeitos da fitohemaglutinina (PHA) sobre o epitélio intestinal de *Lygus hesperus* (Knight, 1917) (Hemiptera: Miridae), observaram através de

imunofluorescência e microscopia eletrônica a ruptura e fechamento do lúmen deste órgão. A lectina de tubérculo de *Arum maculatum* L. (Araceae) também mostrou capacidade de se ligar à glicoproteínas no intestino médio de *Lipaphis erysimi* (Kalt., 1843) (Hemiptera : Aphididae) e *Aphis craccivora* (Koch, 1854) (Hemiptera: Aphididae) (DUTTA et al., 2005). Lectina ligadora de manose (DB1) isolada de *Dioscorea batatas* (inhame) mostrou propriedades inseticidas contra *Helicoverpa armigera* (Hubner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae), espécie de mariposa cujas lagartas têm atacado as plantações de algodão. DB1 inibiu a emergência de adultos de *H. armigera* e técnica de imunomarcagem revelou que ela se ligou à membrana peritrófica destes insetos (OHIZUMI et al., 2009).

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

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

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

Lectinas podem interferir nas funções de enzimas digestivas e proteínas assimilatórias, inibindo ou estimulando a digestão e absorção de nutrientes além de poder afetar indiretamente os mecanismos regulatórios de algumas enzimas devido à perturbação da organização da membrana peritrófica e da borda em escova

(FITCHES; GATEHOUSE, 1998; FITCHES et al., 2008; PAIVA et al., 2012). Desta forma, através dessa ligação, lectinas podem afetar o metabolismo de insetos (MACEDO et al. 2007; NAPOLEÃO et al. 2012).

Os mecanismos inseticidas podem ser: ligação à porção glicídica de enzimas glicosiladas; ligação às enzimas através de sítios diferentes do sítio de ligação ao substrato; ligação ao substrato; ou ligação tanto à enzima quanto ao substrato, aumentando a afinidade entre eles (MACEDO et al., 2007).

A modulação de atividade de enzimas digestivas por lectinas vem sendo demonstrada. A modificação dessas atividades enzimáticas consegue levar a um desequilíbrio metabólico, podendo levar a morte do inseto (MICHIELS et al., 2010). Lectina inseticida isolada da folha de *Bauhinia L. monandra* mostrou um estímulo, sobre a atividade de  $\alpha$ -amilase de homogenatos do intestino médio de *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (COLEOPTERA: BRUCHIDAE), provavelmente aumentando a afinidade da enzima ao seu substrato (MACEDO et al. 2007). As lectinas de *Galanthus nivalis* e a concanavalina A, lectina isolada de sementes de *Canavalia ensiformis* (Fabaceae), estimularam a atividade de aminopeptidase, tripsina e glucosidases no intestino de larvas de *Lacanobia oleracea* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Noctuidae) (FITCHES; GATEHOUSE, 1998). A ação pode também ser inibitória, como mostrada para a lectina isolada da folha de *M. urundeuva*, que inibiu a ação de proteases e a ação estimulatória sobre  $\alpha$ -amilase do intestino de larvas de *Aedes aegypti* (NAPOLEÃO et al., 2012).

Algumas lectinas tem o poder de ultrapassar a barreira epitelial, via transcitose, alcançando o sistema circulatório do inseto, podendo afetar moléculas de autodefesa presentes na hemolinfa (FITCHES et al., 2001). Outro tipo de ação é quando essas proteínas são internalizadas através de vesículas de células epiteliais por endocitose e atuam bloqueando a proliferação celular (YU et al., 1999). No entanto, antes de sugerir que uma lectina possa ter a ação à nível intestinal, é necessário avaliar se essas lectinas são resistentes à degradação proteolítica. Por exemplo, no estudo do mecanismo de ação inseticida da lectina isolada de *Galanthus nivalis* (Amaryllidaceae) sobre *Nilaparvata lugens* (Stål) (Homoptera: Delphacidae), evidenciou-se que a lectina não sofreu degradação proteolítica significativa quando ingerida pelos insetos (POWELL et al., 1998).

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

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

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

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

A lectina isolada de sementes de *Moringa oleifera* (WSMoL), a qual apresenta elevada solubilidade em água, mostrou ação larvicida contra *Aedes aegypti*. Além disso, extratos contendo WSMoL foram capazes de atrasar o desenvolvimento larval,

que parou no terceiro instar (COELHO et al., 2009). O desenvolvimento larval pode estar sendo comprometido pela inibição de enzimas digestivas interferindo na nutrição dessas larvas, como foi visualizado para a lectina de folha de *Bauhinia monandra* Kurz (pata-de-vaca), que estimulou em ensaios *in vitro* a atividade de  $\alpha$ -amilase em larvas de *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleóptera: Bruchidae) (MACEDO et al., 2007). Fitches e Gatehouse (1998) reportaram que, em curto prazo, a lectina de *Galanthus nivalis* apresentou efeito estimulatório sobre tripsina,  $\alpha$ -glicosidase e aminopeptidase de larvas de *L. oleracea* causando, em longo prazo, uma diminuição na atividade de  $\alpha$ -glicosidase. Larvas da mosca do melão (*Bactrocera cucurbitae* (Coquillett, 1899) (Diptera: Tephritidae)) apresentaram redução nas atividades de fosfatases ácidas e alcalinas quando alimentadas com a lectina de tubérculos de *Arisaema helleborifolium*, enquanto a atividade de esterases aumentou consideravelmente (KAUR et al., 2006).

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

## **2.9 *Crotalaria stipularia***

O gênero *Crotalaria* constitui-se em um dos maiores da família, com cerca de 690 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, principalmente no Hemisfério Sul, sendo mais rico na África e na Índia. São citadas por Lewis et al (2005) cerca de 74 espécies, sendo 59 endêmicas e, destas, 35 são da América do Sul, a

maioria das quais, no Brasil. Segundo Burkart (1952), nos neotrópicos, a área natural do gênero, abrange desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina e o Uruguai.

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

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

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

<b>Município</b>	<b>Data</b>	<b>Fonte</b>
Brasília/DF	25 Jan. 2016	Portal G1
Vianópolis/GO	23 Abr. 2015	<a href="http://www.opopular.com.br">http://www.opopular.com.br</a>
Alto Araguaia/MT	09 Mar. 2016	Site Oficial da Prefeitura
Alta Floresta/MT	18 Jan. 2016	Site Oficial da Prefeitura
Confresa/MT	29 Fev. 2016	Site Oficial da Prefeitura
Juína/MT	17 Fev. 2016	Site Oficial da Prefeitura
Primavera do Leste/MT	19 Mar. 2016	<a href="http://tvmutum.com.br">http://tvmutum.com.br</a>
Sorriso/MT	15 Dez. 2015	Site Oficial da Prefeitura
Nova Andradina/MS	25 Mai. 2015	<a href="http://drsandro.org">drsandro.org</a>
Bonito/MS	08 Mar. 2016	Site Oficial da Prefeitura
Dourados/MS	25 Mai. 2015	<a href="http://drsandro.org">drsandro.org</a>
Araxá/MG	05 Nov. 2011	Portal G1
Carmo do Rio Claro/MG	16 Out. 2010	Site Oficial da Prefeitura

Chapada do Norte/MG	30 Abr. 2013	2013 Site Oficial da Prefeitura
Frutal/MG	11 Fev. 2016	Site Oficial da Prefeitura Gov.
Valadares/MG	04 Mar. 2016	Site Oficial da Prefeitura
Ipatinga/MG	04 Fev. 2016	<a href="http://www.diariopopularmg.com.br">http://www.diariopopularmg.com.br</a>
Ituiutaba/MG	25 Mar. 2016	Site Oficial da Prefeitura
Uberaba/MG	03 Jul. 2013	Portal G1
Santo Ângelo/RS	15 Mar. 2016	<a href="http://www.jornaldasmissoes.com.br">http://www.jornaldasmissoes.com.br</a>
Santa Maria/RS	08 Mar. 2016	<a href="http://site.ufsm.br">http://site.ufsm.br</a>
Santa Catarina/SC	29 Fev. 2016	Portal G1
Andradina/SP	17 Jan. 2016	Portal G1
Apazivel/SP	25 Mai. 2015	<a href="http://drsandro.org">drsandro.org</a>
Araraquara/SP	12 Fev. 2016	Portal G1
Catanduva/SP	24 Fev. 2015	Site Oficial da Prefeitura
Jaboticabal/SP	13 Jan. 2016	Site Oficial da Prefeitura
Penápolis/SP	24 Fev. 2015	<a href="http://www.regionalpenapolis.com.br">http://www.regionalpenapolis.com.br</a>
Presidente Prudente/SP	24 Fev. 2015	Portal G1
Presidente Venceslau/SP	06 Mai. 2015	Site Oficial da Prefeitura
São José do Rio Preto/SP	26 Mar. 2015	Site Oficial da Prefeitura
Cordeiro/RJ	08 Mar. 2016	Portal G1
Rio de Janeiro/RJ	29 Mar. 2016	Site Oficial da Prefeitura

Fonte: PEIXOTO et al, 2018.

A espécie *C. stipularia* (Figura 7) é amplamente distribuída no Brasil como pode ser visto na figura 8, ocorrendo nas regiões: Norte (Acre, Pará, Roraima); Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Sergipe); Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso); Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) ([http://servicos.jbrj.gov.br/flora/search/Crotalaria\\_stipularia](http://servicos.jbrj.gov.br/flora/search/Crotalaria_stipularia)).

Figura 7: *C. stipularia*



Fonte: Autor, 2019.

Figura 8: Distribuição da *C. stipularia* no território brasileiro



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

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral:

Analisar o efeito de extrato e frações das sementes de *Crotalaria stipularia* sobre os insetos adultos de *Tribolium castaneum*.

#### 3.2 Objetivos específicos:

1. Caracterizar fitoquimicamente os componentes presentes no extrato e fração de *C. stipularia*.
2. Avaliar o potencial inseticida das preparações lectínicas (extrato e fração);
3. Avaliar a deterrência alimentar de *T. castaneum* mediante as preparações lectínicas (extrato e fração);
4. Calcular parâmetros nutricionais (taxa relativa de ganho de biomassa, taxa de consumo relativo e eficiência de conversão do alimento ingerido) de adultos de *Tribolium castaneum* que ingeriram dieta artificial contendo extrato e fração;
5. Analisar o perfil bioquímico dos insetos após a ingestão do extrato e fração de *C. stipularia*;
6. Analisar os efeitos da ingestão das preparações lectínicas (extrato e fração) sobre a reprodução de *T. castaneum*.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 Insetos**

Os insetos de *T. castaneum* utilizados neste trabalho foram obtidos de uma colônia do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos da Universidade Federal de Alagoas. A colônia era mantida à 30 °C com umidade relativa entre 70 e 80% e fotoperíodo claro/escuro de 12h e alimentada com farinha de trigo comercial. Nos experimentos foram testados os insetos adultos, machos e fêmeas, de 10 dias de idade.

### **4.2 Identificação da Espécie *C. stipularia***

Da mesma planta onde extraiu-se as sementes necessárias para a obtenção do extrato bruto, coletou-se uma amostra da espécie vegetal para identificação e deposição de exemplar no repositório do Herbário MAC do Instituto de Meio Ambiente (IMA) do Estado de Alagoas. A planta selecionada apresentava em sua estrutura todos os requisitos necessários para a devida identificação (folhas, flores, caules e vagens).

### **4.3 Obtenção das Sementes da *C. stipularia***

As sementes foram extraídas das leguminosas *C. stipularia* (Figura 9) encontradas no Povoado Saco, localizado na zona rural da cidade de Marechal Deodoro/AL (09° 42' 37" S 35° 53' 42" W). As sementes foram armazenadas em sacos lacrados e levadas ao laboratório de Laboratório de Metabolismo e Proteômica (LAMP) da Universidade Federal de Alagoas- UFAL para realização dos procedimentos experimentais.

### **4.4 Preparo do Extrato Bruto das Sementes em Diferentes Estágios de Maturação**

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

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

Figura 9: sementes de *C. stipularia* em diferentes estágios de maturação

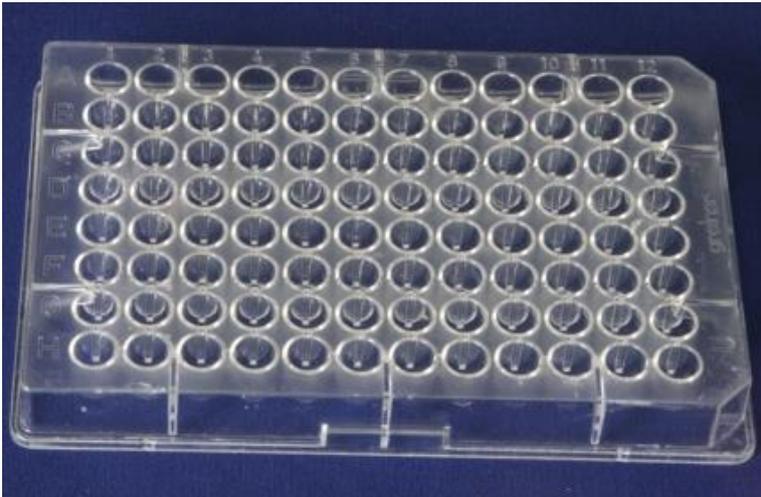


Fonte: autor, 2019.

#### 4.5 Atividade Hemaglutinante

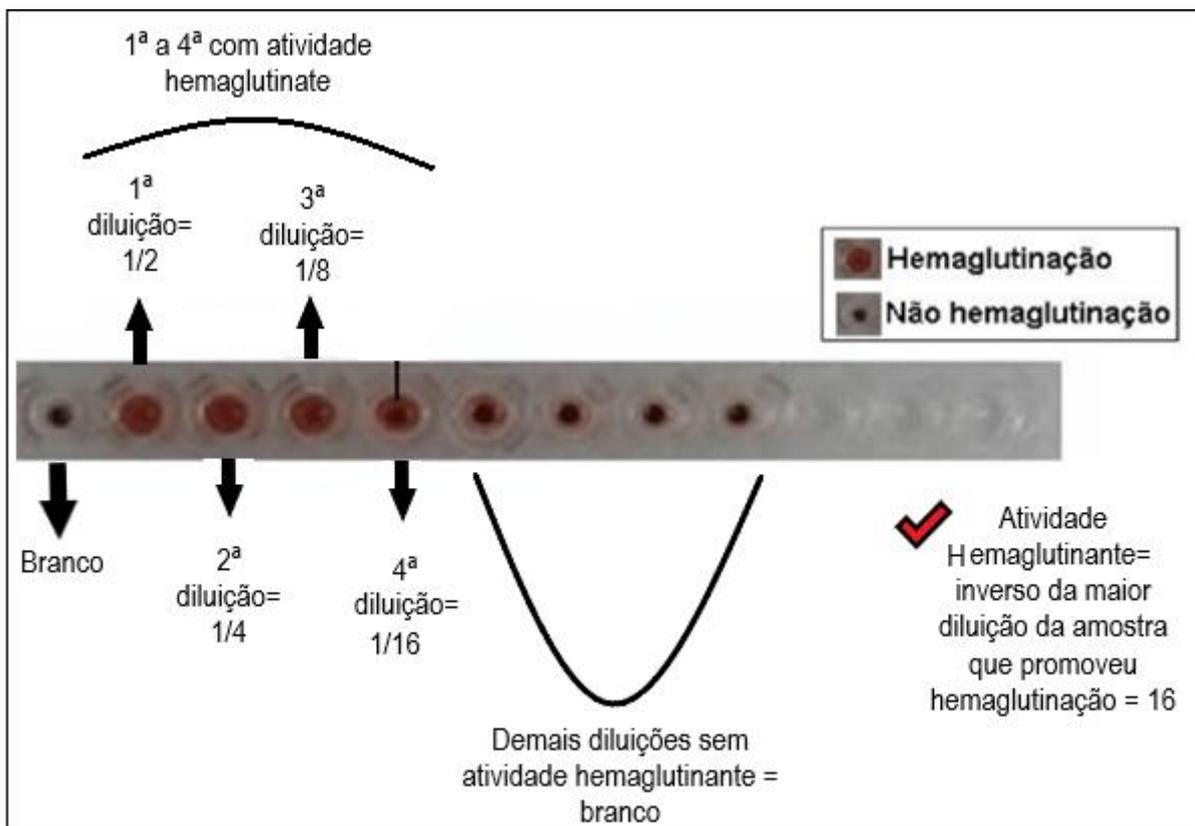
O ensaio de atividade hemaglutinante (AH) foi realizado em placas de microtitulação (Figura 10), de acordo com a metodologia descrita por Paiva e Coelho (1992). Alíquota (50  $\mu$ L) da amostra foi diluída serialmente em NaCl 0,15 M antes da adição de 50  $\mu$ L de suspensão (2,5 % v/v) de eritrócitos de coelho. A AH (título<sup>-1</sup>) foi expressa como o inverso da maior diluição da amostra que promoveu hemaglutinação, (Fígura 11). AH específica (AHE) foi definida pela razão entre o título e a concentração proteica (mg/mL).

Figura 10: placa de microtitulação



Fonte: autor, 2019.

Figura 11: mostra do teste de atividade hemaglutinante



Fonte: autor, 2019.

#### 4.6 Teste de Inibição a Carboidratos

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

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

#### 4.7 Precipitação com Sulfato de Amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a Partir do Extrato da *C. stipularia*

Após a certificação da presença de lectina no extrato bruto obtido a partir das sementes da *C. stipularia*, realizou-se uma precipitação salina com sulfato de amônio, como forma de eliminar parte das proteínas contaminantes, e concentrar a atividade lectínica. O fracionamento aplicado é mostrado na Tabela 3, e ambas as etapas de precipitação foram realizadas a 15,000 g a 4°C por 20 min, com centrífuga refrigerada (HERMLE- Z236K). O volume inicial de extrato utilizado para a precipitação foi de 10 mL O extrato utilizado foi o das sementes secas.

Tabela 3: quantidade de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (g) adicionada por fração

FRAÇÃO (%)	MASSA DE $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (G)
0-20	1,060
20-40	1,164
40-60	1,260
60-80	1,419
80-100	-

Fonte: autor, 2019.

Durante a adição do sal, tomou-se a precaução de que este procedimento fosse realizado de forma paulatina, e sob baixa agitação, visando uma solubilização

uniforme, e uma maior separação das proteínas em função do grau de solubilidade. Após a precipitação, as amostras coletadas foram submetidas ao teste de atividade hemaglutinante, para verificar em qual fração estaria concentrada a lectina.

#### **4.8 Eletroforese**

Com o objetivo de visualizar a diferença de bandas proteicas do extrato e da fração proteica de *C. stipularia*, estes foram então avaliados por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) contendo dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) usando um gel a 10 % (p/v) sob condição não redutora (LAEMMLI,1970). As bandas de polipeptídeos foram coradas com Coomassie Brilliant Blue (0,02 %, v/v) em ácido acético a 10 % (v/v). Os géis foram corados com azul de Coomassie dissolvido em ácido acético a 10 % (v/v), por 4hs e em seguida revelado com solução descorante (10 % ácido acético, 40% de metanol e 50 % água destilada).

#### **4.9 Determinação da Concentração de Proteína**

A concentração da proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976), usando albumina de soro bovino como padrão (250- 0,009 µg/mL). Para isso foram tomados 10 µL das amostras (extrato bruto e fração) diluídas (1: 10), e 190 µL de reagente de Bradford. Posteriormente as amostras foram incubadas por 5 min, e medido a absorbância a 595 nm. As unidades correspondentes são (mg/mL) de proteína.

#### **4.10 Análise Fitoquímica**

Para identificar os principais compostos do extrato aquoso e da fração proteica (F 20%) de *C. stipularia* foi realizada análise fitoquímica utilizando a análise qualitativa descrita por Matos (1988). Com base na metodologia adotada foi possível realizar a prospecção de compostos fenólicos, taninos, antocianinas e antocianidinas, flavonas, flavonóis, xantonas, chalconas, auronas, flavononóis, leconantocianidinas, catequinas, flavononas, esteroides, triterpenoides e saponinas. As reações qualitativas são 50 avaliadas por meio da mudança de coloração decorrente da presença ou ausência dos compostos supracitados. As análises foram realizadas no Laboratório de Ensino de Química da Universidade Estadual de Alagoas, sob orientação da Profa. Dra. Aldenir Feitosa dos Santos.

#### 4.10.1 Testes para fenóis, taninos pirogálicos e taninos flobatênicos

No tubo de ensaio adicionou-se três gotas de solução alcoólica de cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ), após agitação foi observada a ocorrência de alteração colorimétrica ou formação de precipitado abundante escuro. A coloração entre o azul e o vermelho é indicativa de fenóis, precipitado escuro de tonalidade azul é indicativo da presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis) e verde da presença de taninos flobafênicos (taninos condensados ou catéquicos). Para comparação foi realizado teste em branco utilizando apenas água e o cloreto férrico.

#### 4.10.2 Testes para para antocianina e antocianidina, flavonas, flavonois e xantonas, chalconas e auronas, flavononóis

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

#### 4.10.3 Teste para leucoantonocianidinas, catequinas e flavanonas

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

#### 4.10.4 Testes para flavonóis, flavanonas, flavononóis e xantonas

Foi adicionado uma fita de magnésio e 1,0 mL de HCl concentrado. Após o término da reação, indicada pela efervescência, esta alíquota foi comparada com a alíquota acidulada do teste anterior (4.10.3). O surgimento ou a 51 intensificação de cor vermelha indica a presença de flavonóis, flavononas, flavononóis e/ou xantonas, livres ou seus heterosídeos.

#### 4.10.5 Teste para esteroides e triterpenoides

O resíduo seco do béquer foi ressuspendido em 2,0 mL de clorofórmio e homogeneizado. A solução foi filtrada e adicionado 1ml de sulfato de sódio anidro

( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), para um tubo de ensaio. Foi adicionado 1,0 mL de anidro acético, em seguida agitado suavemente e adicionadas 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Agitado novamente e observada a projeção de cores indicando: coloração azul evanescente seguida de verde permanente é indicativa da presença de esteroides livres. A coloração parda até vermelha indica triterpenoides pentacíclicos livres.

#### 4.10.6 Teste para saponinas

O resíduo insolúvel em clorofórmio, separado no procedimento anterior (4.10.5), foi ressuspenso em 8,0 mL de água destilada e a solução filtrada para um tubo de ensaio. Agitou-se o tubo com a solução por 3 minutos e observou-se a formação de espuma, a qual se for persistente e abundante (colarinho) é indicativa da presença de saponinas (heterosídeos saponínicos). Todas as análises foram realizadas em triplicata, tanto para o extrato como para a F 20%.

#### 4.11 Preparo das Soluções Testadas

O extrato e fração com maior atividade hemaglutinante específica foram então pesados, para se obter as doses de 200, 100 e 40 mg de extrato/mg de farinha de trigo comercial da marca Sarandi sem fermento, seguindo a metodologia adotada por Napoleão et al., (2013). Em seguida, aos volumes das soluções foram completados para 5 mL com o tampão de extração e misturados em 2g de farinha, afim de serem pipetadas nas placas com os insetos (como descrito posteriormente). Para melhor representação as concentrações foram transformadas em porcentagem, segundo a tabela 4. O mesmo procedimento foi adotado para a fração. Foi feita a precipitação salina como descrito em 4.7, e repetiu-se o procedimento realizado com o extrato para a preparação das soluções a serem testadas, afim de se testar 100, 40, 20 e 10 mg de fração/ mg de farinha, como pode ser visto na tabela 5.

Tabela 4: doses do extrato testadas nos bioensaios para avaliação do extrato

Concentrações de extrato (mg de extrato/ mg de farinha de trigo)	Doses (m/m)
<b>200</b>	10%
<b>100</b>	5%
<b>40</b>	2%

Fonte: Autor, 2019.

Tabela 5: doses da fração testadas nos bioensaios para avaliação da fração

Concentrações de fração (mg de extrato/ mg de farinha de trigo)	Doses (m/m)
<b>100</b>	5%
<b>40</b>	2%
<b>20</b>	1%
<b>10</b>	0,5%

Fonte: Autor, 2019.

## 4.12 Bioensaios

### 4.12.1 Avaliação da atividade inseticida de extrato e fração proteica

Foi realizada através de uma adaptação do método descrito por Xie et al. (1996) e descrito por Napoleão et al. (2013) onde 5mL da amostra em tampão Tris-HCl 50mM foi misturado a 2g de farinha, agitada por 5 min. Posteriormente, 5 alíquotas de 200µL da suspensão foi colocado na placa de Petri e incubado a 56 °C por 16 horas (Figura 12). Após este período foram adicionados 20 insetos adultos de *T. castaneum*. A mortalidade ao longo do tempo foi avaliada.

O ensaio foi feito em quadruplicata com Tris-HCl 50mM pH 8,0 como controle negativo.

Figura 12: tratamento após colocado na placa de Petri



Fonte: autor, 2019

#### 4.12.1.1 Deterrência alimentar e aspectos nutricionais

Utilizando a metodologia descrita acima foi possível avaliar o índice de deterrência (ID) que foi calculado por meio da fórmula:  $ID (\%) = 100 \times (A-B)/(A)$ , onde A é a massa de alimento ingerida pelo inseto no ensaio controle, e B é a massa de alimento ingerida pelo inseto no ensaio com a amostra. Com base no ID, as amostras foram classificadas como tendo promovido: sem deterrência alimentar ( $ID < 20\%$ ), fraca deterrência alimentar ( $20\% < ID < 50\%$ ), moderada deterrência alimentar ( $50\% < ID < 70\%$ ), ou forte deterrência alimentar ( $ID > 70\%$ ) (ISMAN et al., 1990).

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

#### 4.12.1.2 Efeitos sobre a reprodução

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

#### 4.12.1.3 Efeitos bioquímicos

A fim de elucidar os possíveis efeitos da ingestão do extrato bem como da fração 20% de *C. stipularia* foram avaliados os níveis de proteínas totais, glicose,

colesterol e triglicerídeos dos insetos mortos após o término do bioensaio, descrito no item 4.12.1.

Para isto, o extrato aquoso foi obtido através da maceração dos insetos mortos (10 insetos) em 600µL de água. O volume total foi centrifugado por 15 min a 10.000 rpm a 4°C e o sobrenadante foi coletado. Para proteínas totais foi realizado o teste de Bradford (item 4.8) padrão para quantificação de proteínas. Para glicose, colesterol e triglicerídeos foi utilizada a metodologia padrão dos kit's comerciais comumente utilizados (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, BR).

#### **4.13 Análise Estatística**

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

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Atividade Hemaglutinante do Extrato Bruto das Sementes de *C. stipularia* de Diferentes Estágios de Germinação

Preparou-se, de acordo com o procedimento descrito em 4.4, dois extratos a 5% (m/v), que se diferenciam apenas pelo estágio de maturação, verde e seco, das sementes de *C. stipularia*. Esses extratos foram submetidos então ao teste de atividade hemaglutinante, apenas sendo constatado que o extrato no estágio de maturação seco, apresentou atividade pelo teste hemaglutinante, como pode ser visto na tabela 6.

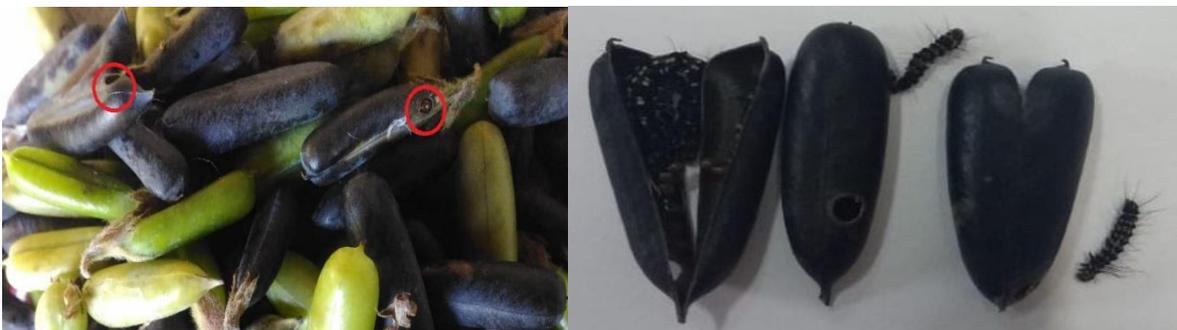
Tabela 6: teste hemaglutinante do extrato

ESTÁGIOS DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES <i>C. stipularia</i>	ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE
<b>VERDE</b>	Ausente
<b>SECO</b>	2048

Fonte: autor, 2018.

As lectinas inseticidas, são descritas como respostas induzíveis, ou seja, a planta sintetiza essa biomolécula, em resposta a uma injúria (WAR et al., 2012) como a herbivoria, por exemplo. Quando foi realizada a coleta das sementes de *C. stipularia* em Marechal Deodoro, percebeu-se que as vargens com as sementes secas, eram atacadas, enquanto que as verdes estariam isentas de ataque, conforme a figura 13, assim pode-se inferir, que esse seja um dos motivos pelos quais o estágio seco produza essa proteína.

Figura 13: vargem seca de *C. stipularia* atacada por espécie de lagarta



Fonte: autor, 2019.

## 5.2 Teste de Inibição a Carboidratos

O teste de inibição da hemaglutinação por carboidratos, é realizado normalmente com a lectina pura ou preparações lectínicas para saber a qual carboidrato especificamente essa biomolécula se liga. O processo de inibição por carboidratos ocorre em função do comprometimento do domínio de reconhecimento a carboidratos – DRC, uma vez que, os carboidratos livres em solução interagem com os sítios de ligação de lectinas impedindo parcialmente a interação da lectina com glicídios ou glicoconjugados presente na superfície da membrana plasmática dos eritrócitos, levando a uma redução significativa da atividade da lectina. O teste de inibição a carboidratos com o extrato bruto permite confirmar que a atividade hemaglutinante observada mediante o teste é proveniente de lectinas e não de outros compostos como lipídios ou polifenóis, como os taninos, que muitas vezes são abundantes em tecidos vegetais e podem formar complexos solúveis ou insolúveis com proteínas ou interagir com eritrócitos por ligações não-específicas, interferindo assim com sua atividade e resultando em um falso positivo na atividade hemaglutinante (JAKOBEK, 2015).

Os ligantes testados que causaram a inibição na atividade foram a D-galactose e D-lactose, evidenciando a presença de ao menos uma lectina na amostra, que inibiu praticamente toda a atividade hemaglutinante, que antes da inibição era 2048 e passou para 2 e 4. Os demais carboidratos testados não inibiram (NI) a atividade hemaglutinante, conforme consta na tabela 7.

Tabela 7: Teste de inibição da atividade hemaglutinante do extrato bruto de *C. stipularia* por carboidratos e glicoproteína

LIGANTE	ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE DO EXTRATO
D-FRUTOSE	NI
D-RIBOSE	NI
D-GLICOSE	NI
D-ARABINOSE	NI
D-FUCOSE	NI
D-GALACTOSE	2
D-MANOSE	NI
RAMINOSE	NI
PIRANOSE	NI
GLICOPIRANOSE	NI
N-ACETILGLICOSAMINA	NI
N-ACETILMONOSAMINA	NI
N-ACETILGALACTOSAMINA	NI
D-MALTOSE	NI

D-LACTOSE	4
FETUÍNA (GLICOPROTEÍNA)	NI

Fonte: autor, 2019. NI - Não inibiu.

### 5.3 Análise fitoquímica do extrato aquoso e fração proteica de *C. Stipularia*

Plantas podem apresentar uma gama de moléculas envolvidas na defesa contra o ataque de insetos. Qualitativamente, o extrato aquoso e a fração proteica das sementes de *C. stipularia* foram avaliados quanto à presença dos principais grupos de metabólitos secundários (compostos fenólicos, terpenóides, flavonóides, alcalóides, esteróides e saponinas) conforme apresentado na tabela 8. Foram observadas no extrato as presenças de flavonas, flavonóis, xantonas e saponinas entre os compostos fitoquímicos analisados.

Tabela 8: Análise qualitativa dos principais componentes fitoquímicos do extrato aquoso e da fração proteica de *C. stipularia*

FITOQUÍMICO	EXTRATO DE <i>C. stipularia</i>	FRAÇÃO 20%
Fenóis	-	-
Taninos	-	-
Antocianina e antocianidina	-	-
Flavonas, flavonóis e Xantonas	+	-
Chalconas e auronas	-	-
Flavononóis	-	-
Leucoantocianidinas	-	-
Catequinas	-	-
Flavononas	-	-
Esteroides	-	-
Triterpenóides	-	-
Saponinas	+	-

Fonte: autor, 2019.

Atividades inseticidas de saponinas isoladas de *Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze (Fabaceae), mesma família da espécie em estudo neste trabalho, foram relatadas contra *Aedes aegypti*. (SANTIAGO et al, 2005). Atividades antifúngicas e atividades citotóxicas de saponinas também foram relatadas contra linhas celulares de câncer de pulmão (BARILE et al. 2007).

As plantas produzem uma grande variedade de metabólitos que muitas vezes não têm função relevante nos processos fisiológicos ou bioquímicos do vegetal, mas são cada vez mais relatados como importantes mediadores das interações entre

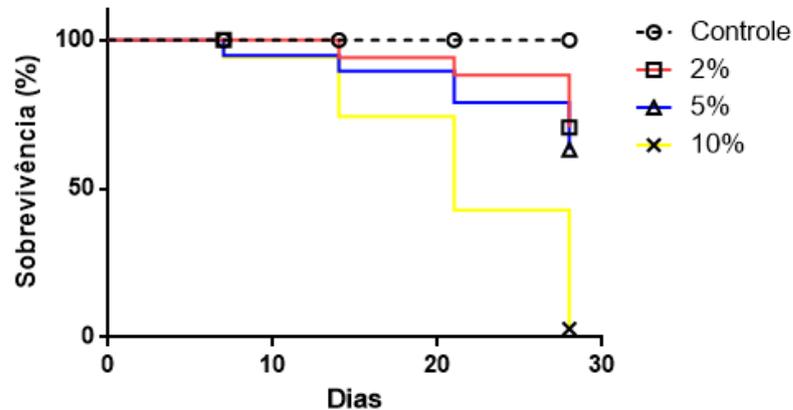
plantas e outros organismos (CESPEDES et al, 2013; BORGES et al, 2019). Sabe-se que muitos dos efeitos medicinais atribuídos às plantas são decorrentes desses metabólitos que atuam de forma isolada ou por ação sinérgica (JADON; DIXIT, 2014) não estando o efeito associado a apenas um componente. As flavonas e flavonóis são protetores químicos que absorvem luz em comprimentos de onda mais curtos do que àqueles visíveis ao olho humano, protegendo as células vegetais dos danos causados pela fotoxidação. Além dessa função protetora, esses dois flavonóides ainda funcionam como sinais atrativos para insetos como as abelhas, que enxergam na faixa extrema do ultravioleta (FERREIRA et al, 2008). Já as xantonas (naturais e sintéticas) apresentaram ação antimicrobiana (GHOSAL; CHAUDHURI, 1975; GHOSAL et al., 1978).

Esses metabólitos apresentam diferentes efeitos sobre os insetos herbívoros. Quando ingeridos, podem induzir danos por diferentes mecanismos, entre esses, a interação e modificação da permeabilidade das membranas celulares (saponinas) (PAIVA et al, 2012). Além dos metabólitos secundários, compostos do metabolismo primário como lectinas possuem um papel fisiológico importante na defesa contra microorganismos e insetos (NAPOLEÃO et al., 2011; CAMAROTI et al., 2017; PROCÓPIO et al., 2017). Para concentrar as proteínas presentes no extrato *C. stipularia*, procedeu-se o fracionamento salino. Na análise fitoquímica realizada com a fração proteica, não foi detectada a presença de nenhum dos compostos característicos do metabolismo secundários das plantas. A ausência desses metabólitos enaltece o processo de fracionamento salino que foi realizado como objetivo de se obter uma fração enriquecida de lectina.

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

A ingestão do extrato aquoso de *C. stipularia* pelos insetos de *T. castaneum* resultou na mortalidade de 100% dos insetos na dose de 10% ao passar os 28 dias de experimento enquanto que no controle todos os insetos permaneceram vivos, como pode ser visto na figura 14. As doses de 2% e 5%, também causaram a mortalidade dos insetos, mas em menor proporção, demonstrando um efeito dose resposta.

Figura 14: sobrevivência dos adultos de *T. castaneum* tratados com diferentes doses do extrato de *C. stipularia* expressos pela curva de Kaplan-Meier



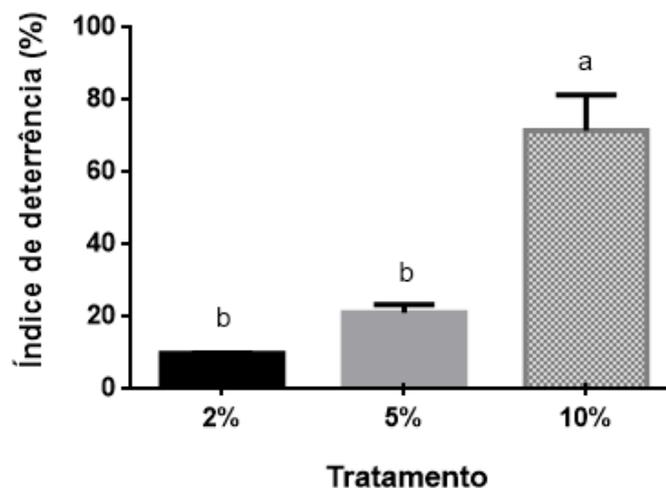
Fonte: autor, 2019.

Este é o primeiro trabalho que avalia a atividade inseticida através de metodologia de ingestão de extrato em dieta artificial com o inseto *T. castaneum*. Comparando-se com insetos da mesma ordem, Napoleão et al. (2013) utilizou a mesma metodologia ao testar o extrato e a lectina de *Myracrodruon urundeuva* contra *Sitophilus zeamais*. No extrato de folhas *M. urundeuva* a concentração de 10 mg/g promoveu uma taxa de mortalidade de 14,3% em 7 dias, sendo mais ativa do que um cinamaldeído da casca de *Cinnamomum aromaticum* L. cuja a concentração de 13,6 mg/g promoveu 12% de mortalidade em adultos de *S. zeamais* (HUANG; HO, 1998). Triterpenos e derivados de *Junellia aspera* (Verbenaceae) promoveram ligeira mortalidade (1,8 e 9,5%) em adultos de *Sitophilus oryzae* (Linnaeus, 1763) (Coleoptera: Dryophthoridae), após 5 dias, quando incorporados em discos de farinha de trigo a 400 mg/disco (correspondendo a aproximadamente 5,2 mg/g); entretanto, após 10 dias, as taxas de mortalidade variaram de 47,1% a 100% (PUNGITORE et al., 2005).

Para compreender os mecanismos que levaram à mortalidade de *T. castaneum* frente ao extrato, foram avaliados a deterrência alimentar e os parâmetros nutricionais. O extrato de *C. stipularia* também exerceu atividade de deterrência alimentar (figura 15), apresentando índices de deterrência de aproximadamente 10% e 25% para as doses 2% e 5% e um efeito mais pronunciado na dose 10% (índice de deterrência de 70%, aproximadamente). No entanto, embora a deterrência alimentar moderada do extrato corrobore com a mortalidade (figura 14), a deterrência do extrato

de 10% por si só pode não justificar a mortalidade dos insetos, como o descrito por Napoleão et al, 2013, onde todos as doses testadas apresentaram deterrência moderada e o autor considerou que a morte de insetos não foi apenas uma consequência de condições moderadas de fome, mas também está ligada à ingestão do(s) componente(s) tóxico(s) presente no extrato que ocorreu, mesmo que de forma mais reduzida. Para avaliar esses outros possíveis fatores, parâmetros nutricionais de insetos tratados com extrato foram testados.

Figura 15: deterrência alimentar dos insetos de *T. castaneum* tratados com diferentes doses do extrato de *C. stipularia*.

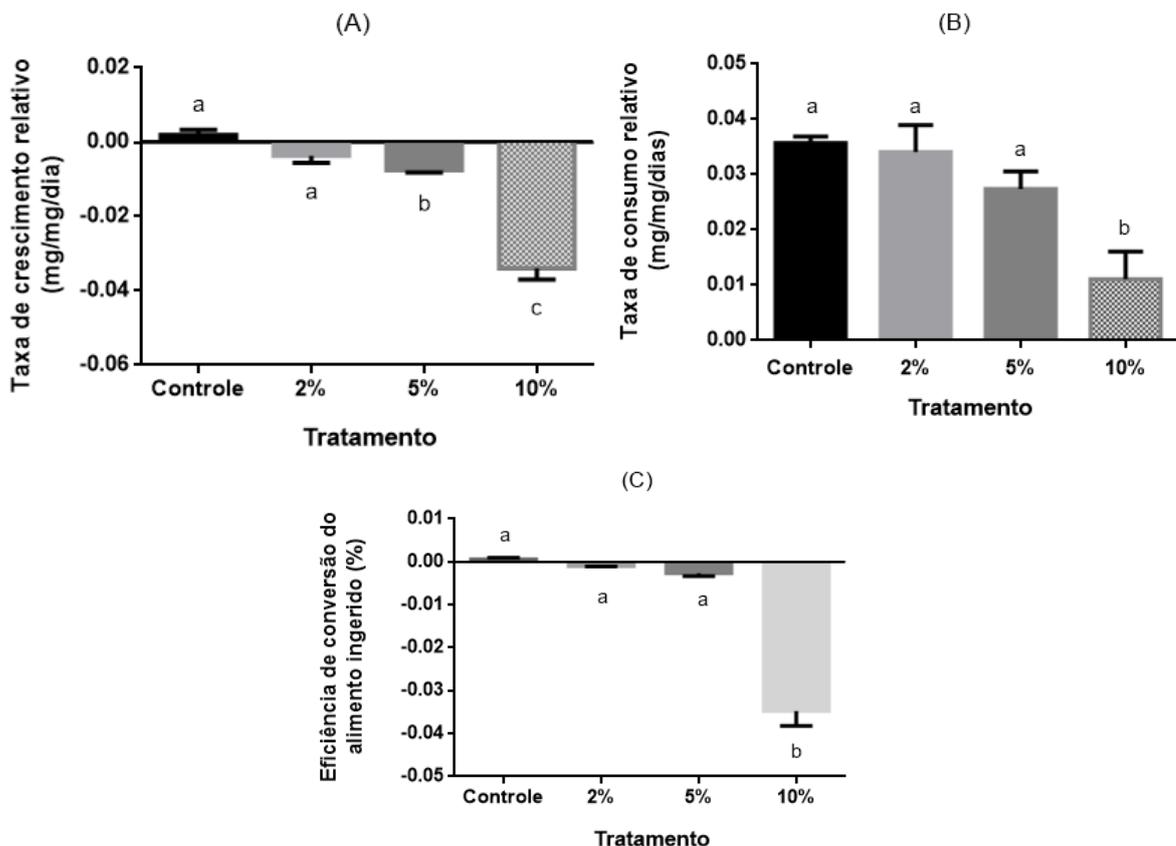


Fonte: autor, 2019. Cada barra corresponde à média  $\pm$  DP de quatro repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos pelo teste de Tukey.

Os efeitos deletérios do extrato em *T. castaneum* também foram refletidos nos parâmetros nutricionais (figura 16). Um aumento na concentração do extrato na dieta foi acompanhada por uma significativa ( $P < 0,05$ ) diminuição na taxa de consumo relativo (figura 16B) principalmente na maior dose. A diminuição do consumo no extrato ocorre provavelmente devido à atividade de deterrência alimentar moderada observada anteriormente. A taxa de crescimento relativo no tratamento com o extrato a 10% foi significativamente ( $P < 0,05$ ) menor do que no tratamento controle (figura 16A) os valores negativos detectados nos tratamentos revelam que os insetos não só tiveram menor ganho de peso, mas também perderam biomassa. Uma possível explicação para esses resultados são que altos níveis de extrato das sementes de *C. stipularia* prejudicam os processos de digestão e absorção de nutrientes, induzindo os insetos a metabolizarem suas reservas corporais para sobreviverem, levando à perda

de peso. Esse dado pode ser confirmado pela porcentagem de conversão do alimento ingerido (figura 16C), essa taxa leva em conta a quantidade de dieta ingerida e o ganho de peso do inseto. Assim, a dose de 10% foi a que os insetos menos conseguiram transformar o alimento ingerido em biomassa. Esse resultado revelou que os insetos mesmo tendo ingerido o alimento, ainda que em menor quantidade, não conseguiram incorporar a dieta e que a quantidade de alimento ingerido não foi suficiente para compensar os efeitos deletérios do extrato, resultando em perda de biomassa.

Figura 16: parâmetros nutricionais de adultos de *T. castaneum* mantidos em dietas artificiais constituídas por discos de farinha de trigo preparados com Tris-HCl 50 mM (controles) ou extratos das sementes de *C. stipularia*. A taxa de crescimento relativo (A) indica a quantidade de biomassa em mg obtida todos os dias por mg de peso corporal inicial. A taxa de consumo relativo (B) indica a quantidade de dieta consumida em mg por mg de peso corporal de insetos por dia. A eficiência na conversão de alimentos ingeridos (C) (%) indica a quantidade de alimento ingerido pelos insetos como biomassa.

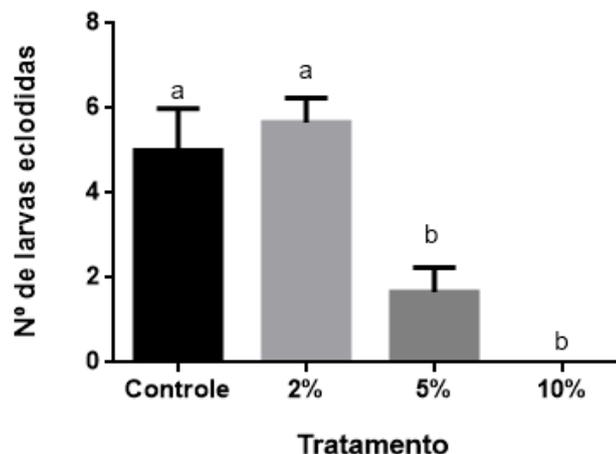


Fonte: autor, 2019. Cada barra corresponde à média  $\pm$  DP de quatro repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos pelo teste de Tukey.

A incorporação de extratos em dietas de diferentes insetos pode levar a um desequilíbrio no seu crescimento. Napoleão, et al (2013), também demonstrou que o extrato de folhas de *M. urundeuva* promoveu a perda de biomassa, como refletido nos valores negativos para as taxas de ganho relativo de biomassa e eficiências em converter alimentos ingeridos, contra *S. zeamais*. Camaroti, et al (2018), avaliou os efeitos da ingestão de dietas artificiais contendo um extrato salino das folhas de *Schinus terebinthifolius* sobre a sobrevivência e parâmetros de adultos de *S. zeamais*. A Ingestão do extrato (100, 200 e 250 mg de extrato por g de farinha) prejudicou a sobrevivência dos adultos de *S. zeamais*, com taxas de mortalidade variando entre 94% e 97% após 12 dias de incubação.

A alteração de parâmetros nutricionais pode, a longo prazo, acabar interferindo na capacidade reprodutiva de insetos. Isso pode ser visto para o *T. castaneum* ao ingerir dieta contendo o extrato de *C. stipularia*. A quantidade de larvas eclodidas por tratamento, dos insetos alimentados pela dieta contendo as diferentes doses do extrato de *C. stipularia* também foi observada, chegando a nenhuma larva eclodida na maior dose, diferindo estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do controle (Figura 17).

Figura 17: Número de larvas eclodidas através da reprodução de insetos de *T. castaneum* tratados com o controle (Tris-HCl 50 mM) e com diferentes doses de extrato de *C. stipularia*.



Autor, 2019. Cada barra corresponde à média  $\pm$  DP de quatro repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos pelo teste de Tukey.

Extratos de plantas podem afetar na fecundidade de insetos, fertilidade, emergência, bem como no desenvolvimento larval (SHAALAN et al., 2005). Acheuk et al (2011), testou (através da ingestão em dieta artificial) o extrato metanólico de

*Haplophyllum tuberculatum* (Forsk.) e o composto sintético teflubenzuron (TFB), em uma espécie de inseto praga *Locusta migratoria* (Linnaeus, 1758) (Orthoptera: Oedipodinae). Para várias das variáveis medidas, o extrato da planta e TFB teve efeitos similares em fêmeas de *L. migratoria* tratadas na emergência ambos os tratamentos causaram um prolongamento significativo do período de pré-oviposição e uma redução significativa na fecundidade. Semelhante reduções na fecundidade foram relatadas para outros extratos vegetais reguladores de crescimento em grilos e outros insetos (ABBASSI et al., 2003; AMRANI et al., 2004; ABDELLAOUI et al., 2009).

Lim e Lee (1882) sugeriram que uma redução na fecundidade da *Oxya japonica* (Thunberg, 1815) (Orthoptera: Acrididae), após o tratamento com diflubenzuron (DFB), foi um efeito indireto resultante do impacto inibitório do composto na ingestão de alimentos. Ao longo deste linha, uma ruptura da matriz peritrófica (MP) que reveste o intestino médio epitélial, como resultado da inibição da síntese de quitina induzida por TFB (esse composto foi descrito como um inibidor da quitinase), poderia ser responsável, pelo menos em parte, pelos efeitos observados. De fato, um enfraquecimento da MP, que é composto de quitina e proteínas (HAGEDUS et al., 2009), afetaria negativamente o intestino médio e propriedades de absorção. O mesmo pode ter ocorrido com o extrato de *C. stipularia*, já que o extrato possui além dos metabólitos secundários, a lectina que tem sido descrita por alguns autores como responsável por se ligar e até mesmo romper a MP que reveste o intestino dos insetos. Um exame histológico do intestino de insetos tratados com o extrato de *C. stipularia* seriam necessários para confirmar esta hipótese.

Metabólitos secundários, comumente presentes em extratos vegetais, também podem ter efeito antinutricional. O extrato metanólico da planta testado por Acheuk et al. (2011), mostrou um impacto indireto sobre a reprodução, que segundo o autor, pode ser devido a um efeito antinutricional associado a moléculas presentes no extrato. Por exemplo, compostos fenólicos como os lignanos previamente identificados em *H. tuberculatum* (KHALID; WATERMAN, 1981) têm propriedades antinutricionais resultantes da sua capacidade de inibir proteases digestivas e hidrolases, bem como polifenol oxidases, reduzindo assim a digestibilidade dos nutrientes (CÉSPEDES et al., 2004). Esses resultados corroboram com os de Napoleão et al. (2013) quando testou extrato e a lectina de *Myracrodruon urundeuva* contra *Sitophilus zeamais*, e os resultados dos parâmetros nutricionais, obtidos neste

trabalho em que índices de consumo relativo, crescimento relativo e taxa de conversão do alimento, indicam que o extrato possui um potencial antinutricional. O estudo fitoquímico do extrato revelou compostos, como as saponinas, que podem agir isolados e/ou em sinergia, causando as propriedades antinutricionais apresentadas no extrato de *C. stipularia*.

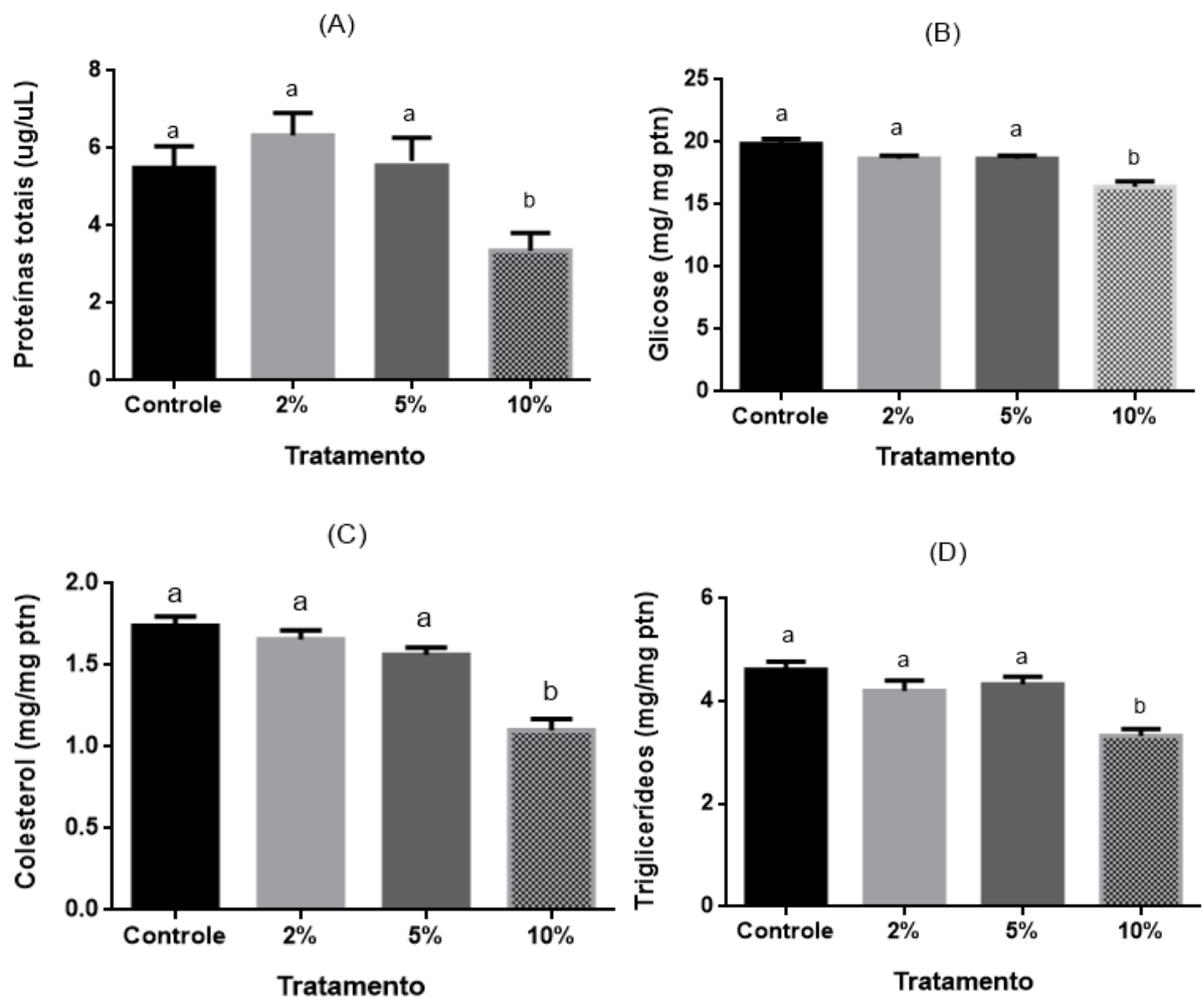
Efeitos mais diretos sobre reproduções de insetos foram relatados para inibidores da síntese de quitina. Por exemplo, lufenuron, outro BPU, exerceu um impacto sobre a vitelogênese em *A. aegypti* (MOREIRA et al., 2007) e *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) (Hemiptera: Reduviidae) (MANSUR et al., 2010). Nestas espécies, a quitina é um componente importante de ovos, e o tratamento com lufenuron bloqueou a incorporação de N-acetilglucosamina na quitina do ovo, resultando em uma redução do tamanho e uma diminuição no número de ovos. No estudo de Acheuk et al (2011), o TFB exibiu atividade ovicida completa (ou seja, nenhum os ovos eclodiram). Foi proposto que uma inibição da quitina foi responsável pelas propriedades ovicidas da DFB (GROSSCURT, 1978; MEDINA et al., 2002). Deficiência de quitina enfraquece o exoesqueleto e fixação muscular no embrião, tornando-o incapaz de resistir a forte pressão necessária para incubação bem sucedida, reduzindo assim a eclosão em ovos tratados ou ovos colocados por fêmeas tratadas (LIM; LEE, 1882).

Não foi possível contabilizar, neste experimento, quantos ovos foram postos, dessa forma não é possível dizer se o extrato interferiu na fecundação, fertilidade ou se foi diretamente na passagem da fase de ovo, para a larva, dessa forma outros experimentos devem ser conduzidos a fim de melhor investigar em que momento do ciclo de desenvolvimento do inseto o tratamento influenciou. No entanto, podemos afirmar que o extrato interferiu na reprodução de *T. castaneum*. Considerando que as fêmeas de *T. castaneum* podem colocar de 400 a 500 ovos (LORONI et al, 2015), o bloqueio na reprodução é uma forma bastante importante no controle populacional desse inseto-praga.

A fim de conhecer os possíveis efeitos bioquímicos da ingestão do extrato de *C. stipularia* nos insetos de *T. castaneum*, foram avaliados os níveis de proteínas totais, glicose, colesterol e triglicerídeos dos insetos mortos após o término do bioensaio, como descrito no item 4.12.1.3. A figura 18, mostra que apenas a dose de 10% foi capaz de provocar uma mudança nas taxas, diminuindo estatisticamente (p

<0,05) em relação ao controle a quantidade de proteínas totais, colesterol, triglicerídeos e glicose.

Figura 18: Perfil bioquímico do corpo macerado adultos de *T. castaneum* mantidos em dietas artificiais constituídas por discos de farinha de trigo preparados com Tris-HCl 50 mM (controles) ou extratos das sementes de *C. stipularia*. Nível de proteínas totais (A) em mg/mL, glicose (B) em mg de glicose/ mg de proteína, colesterol (C) em mg de colesterol/ mg de proteína e triglicerídeos (D) em mg de triglicerídeos/ mg de proteína.



Fonte: Autor, 2019. Cada barra corresponde à média  $\pm$  DP de três repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos pelo teste de Tukey.

Nos insetos, o corpo gorduroso é um órgão central para o metabolismo. Sintetiza diversas proteínas e atua também como local de armazenamento de carboidratos, proteínas e lipídeos (ARRESE; SOULAGES, 2010).

Glicogênio e triglicerídeos são constituem reservas energéticas em células animais. A glicose é armazenada em forma polimérica, glicogênio. Ácidos graxos

armazenados como triglicerídeos podem ser usados para produção de energia através de  $\beta$ -oxidação. Reservas de gordura são mais empregadas pelos insetos para atender a demanda de energia, para fornecer energia para o embrião em desenvolvimento, e para alimentá-los durante períodos prolongados de vôo. Armazenamento de ácidos graxos e glicose é essencial em insetos para outras funções também. Ácidos graxos servem como precursores na síntese de eicosanóides e feromônios. Da mesma forma, a glicose é usada para a síntese de quitina, um dos principais componentes da cutícula, e para a síntese de álcoois de açúcar, que são necessários para a adaptação a frio ou seca (ARRESE; SOULAGES, 2010).

Na mariposa *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae), durante o crescimento da lagarta, o corpo gorduroso estoca enormes quantidades de lipídeos, que serão utilizados posteriormente pelo inseto adulto como substrato para o vôo e durante a ovogênese (ZIEGLER, 1991). No barbeiro *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae), após a alimentação do inseto adulto com sangue, pode-se observar um acúmulo de lipídeos no corpo gorduroso. Vários dias depois, quando o intestino já se encontra quase vazio, e a digestão próxima do fim, essas reservas começam a ser utilizadas e a quantidade de lipídeos diminui gradativamente (PONTES et al., 2008).

O mesmo pode ter ocorrido com os insetos tratados com a maior dose testada, já que os insetos consumiram menos alimento (deterrença alimentar moderada) a reserva de lipídeos e glicogênio pode ter diminuído gradativamente, prejudicando também a síntese de proteínas e hormônios esteroides, produzidos a partir do colesterol. Como os insetos não sintetizam colesterol, sendo eles obtidas da dieta ou a partir de microrganismos simbiotes, a assimilação reduzida observada nos experimentos de parâmetros nutricionais provavelmente é a causa da redução nos níveis de colesterol detectados.

### **5.5 Fracionamento Salino do Extrato**

Os extratos vegetais e frações pré-purificadas com atividade inseticida representam uma alternativa importante de controle de insetos-praga, principalmente em pequenas áreas de cultivo, visto a simplicidade e baixo custo de produção que essas preparações representam comparadas com compostos isolados.

Com o objetivo de obter um material enriquecido com lectina, foi realizado o fracionamento proteico. Feitos todos os ciclos do fracionamento salino (0-20%, 20-

40%, 40-60%, 60-80%), a fração que apresentou maior atividade hemaglutinante específica – AHE foi a fração precipitado F0-20%, expressando atividade igual a 660,65, maior que o extrato bruto, demonstrando a efetividade do método em concentrar lectina em uma fração pré-purificada e com menores teores de contaminantes (tabela 8). Existem outros métodos de precipitação de proteínas, porém optou-se por realizar o salino, porque o uso de solventes orgânicos pode apresentar desvantagens, como a tendência a causar danos estruturais à proteína e muitas vezes afetar a atividade da mesma, fazendo com que essa perca totalmente sua atividade ou venha reduzi-la drasticamente (COSTA et al., 2016).

Tabela 8: fracionamento salino. Concentração e AHE das frações oriundas do fracionamento salino com sulfato de amônio -  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

<b>Amostra</b>	<b>Proteína (mg/mL)</b>	<b>AH</b>	<b>AHE</b>
Extrato	6,30	2048	325,08
F1- F0-20% (precipitado)	3,10	2048	660,65
F2- F20-40% (precipitado)	3,03	-	0
F3- F40-60% (precipitado)	0,11	-	0
F4- F60-80% (sobrenadante)	0,10	-	0

Fonte: autor, 2019.

A precipitação salina além de um método de concentração de proteínas é também uma forma de retirar outros contaminantes (como os metabólicos secundários), o que foi confirmado pelo teste fitoquímico, e pode ser visualizado no gel de eletroforeses (SDS-PAGE). Na figura 19, pode ser visto na primeira canaleta o extrato com o forte arraste justificado pela presença não só de proteínas, mas de uma diversidade de metabolitos presentes no extrato, enquanto que na canaleta 2 onde está presente a fração 20% de *C. stipularia*, percebemos o clareamento do arraste e a presença ainda das bandas características de proteínas, nos revelando que os metabólicos secundários responsáveis pelo arraste escuro do extrato foram em grande parte ou totalmente eliminados pelo processo de precipitação salina.

Figura 19: eletroforese com gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10 % - 1: Extrato de *C. stipularia*, 2: fração 20% de *C. stipularia*.

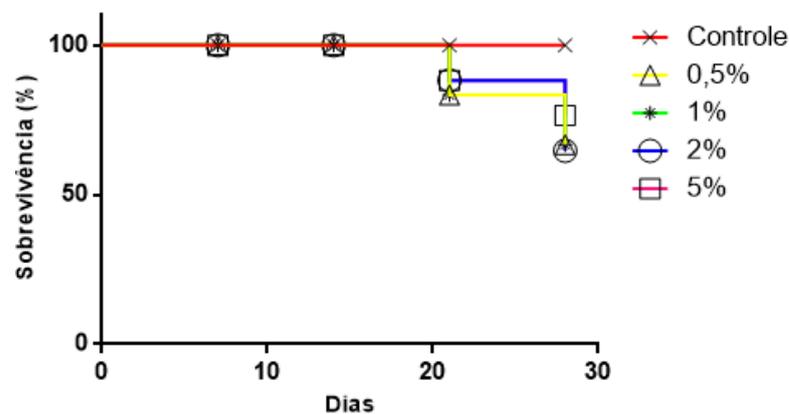


Fonte: autor, 2019.

### 5.6 Resultados dos Bioensaios com a Fração 20% das sementes de *C. stipularia*

Diferente do que ocorreu com o extrato, a ingestão da fração 0-20% de *C. stipularia* pelos insetos de *T. castaneum*, não resultou na mortalidade de 100% dos insetos ao passar os 28 dias de experimento, quando comparado com o controle, como pode ser visto na figura 20. No entanto, as doses de 0,5%, 1% e 2% causaram a mortalidade de aproximadamente 40% dos insetos. A dose de 5% também causou a morte dos insetos, em menor proporção.

Figura 20: sobrevivência dos adultos de *T. castaneum* tratados com diferentes doses da fração 20% de *C. stipularia* e tris-HCl 50 mM como tratamento controle



Fonte: autor, 2019.

Não há relatos na literatura de testes inseticidas de fração proteicas pré-purificadas. O que há de publicações são testes com extrato bruto, compostos sintéticos e proteínas isoladas (NAPOLEÃO et al., 2012; ACHEUK et al 2011; NAPOLEÃO et al., 2014).

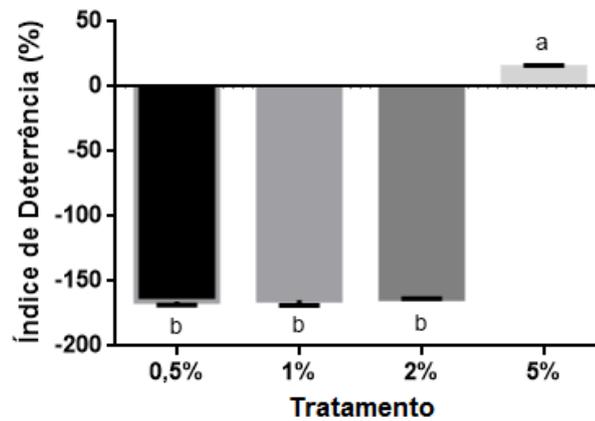
O que pode ser visto na literatura, é que é muito comum que lectinas isoladas de planta não causem a mortalidade dos insetos em até 15 dias de experimento (NAPOLEÃO et al., 2012; NAPOLEÃO et al., 2014; SOUZA et al., 2018), dado que pode ser comparado com a fração enriquecida de lectina, onde, neste trabalho, os insetos só começam a morrer após 20 dias. Supomos então, que possivelmente um efeito sinérgico entre a lectina e os metabólicos secundários eliminados no fracionamento salino seria o responsável pela mortalidade apresentada pelo extrato.

Assim como no extrato, também foram calculados a porcentagem de deterrência alimentar, os parâmetros nutricionais e o perfil bioquímico da fração a fim de investigar os possíveis efeitos da ingestão da fração proteica testada.

De fato, o cálculo de deterrência alimentar não revelou efeito deterrente nas doses de 0,5, 1, e 2%. Apenas a dose de 5% apresentou-se fracamente deterrente (Figura 21). A dose de 5%, foi a que também menos provocou a mortalidade nos insetos de *T. castaneum* como demonstrado anteriormente, sugerindo que a mortalidade observada nas doses 0,5, 1 e 2% foi causada por algum componente ingerido pelos insetos.

Souza et al., 2018, testou os efeitos da lectina da planta *Opuntia ficus-indica* na alimentação, sobrevivência e enzimas intestinais do gorgulho do milho, *Sitophilus zeamais* onde nenhuma das doses testadas apresentou-se deterrente mediante os insetos, a deterrência alimentar está muito fortemente associada ao gosto e ao aroma, como na fração testada neste trabalho esses metabólitos foram eliminados na precipitação salina, a deterrência alimentar neste caso estaria associada a presença de proteínas como a lectina, que segundo Napoleão et al, 2014, pode ser deterrente.

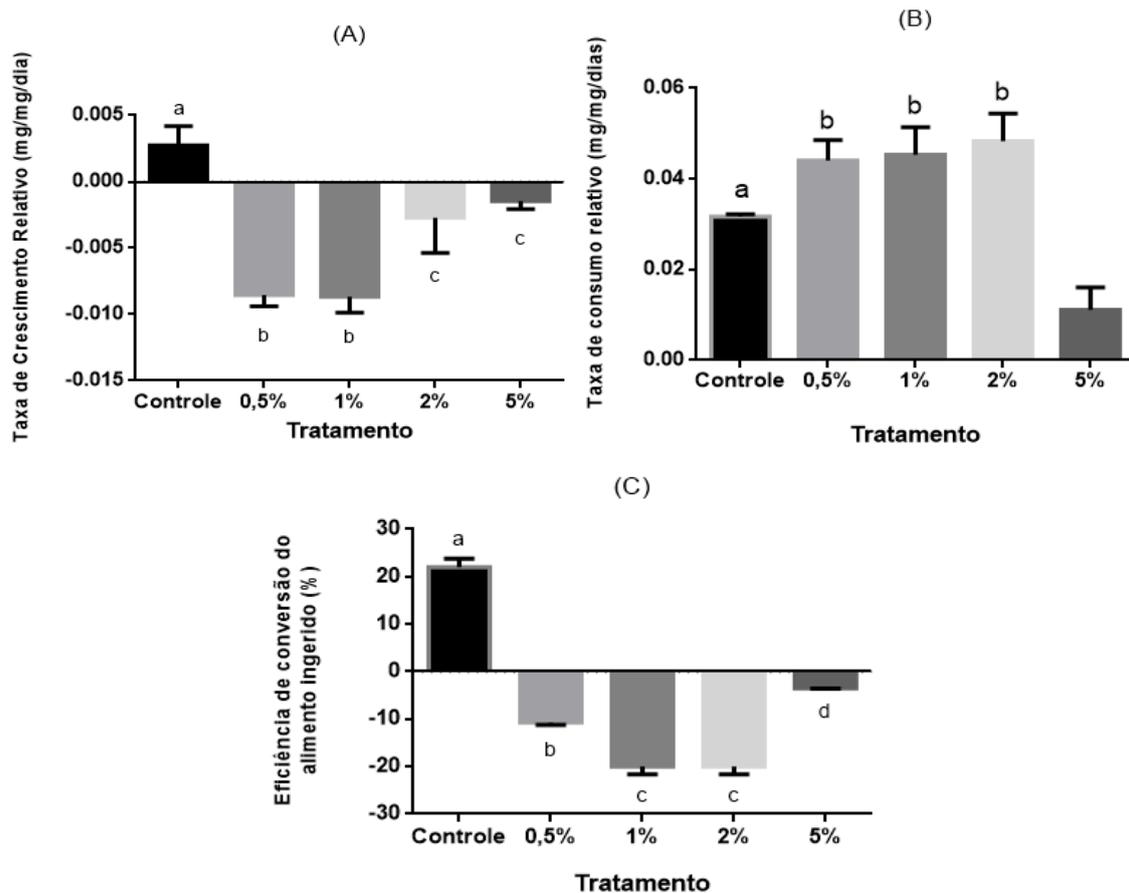
Figura 21: deterrência alimentar dos insetos de *T. castaneum* tratados com diferentes doses do extrato de *C. stipularia*.



Fonte: autor, 2019. Cada barra corresponde à média  $\pm$  DP de quatro repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos pelo teste de Tukey.

Os resultados dos parâmetros nutricionais mostrados na figura 22, corroboram com os resultados apresentados até aqui, já que a taxa de consumo relativo mostrado na figura 22 B demonstra o aumento do consumo dos insetos que ingeriram as doses de 0,5%, 1% e 2% enquanto que a dose de 5% foi pouco ingerida pelos insetos, em relação ao controle. A ingestão da fração resultou na diminuição do peso corporal, como mostrado na figura 22 A. Os dados sobre a eficiência da conversão do alimento ingerido estão de acordo com a perda de biomassa dos insetos, pois os valores de conversão alimentar também foram negativos para os tratamentos (Figura 22 C).

Figura 22: parâmetros nutricionais de adultos de *T. castaneum* mantidos em dietas artificiais constituídas por discos de farinha de trigo preparados com Tris-HCl 50 mM (controles) ou fração 20% das sementes de *C. stipularia*. A taxa de crescimento relativo (A) indica a quantidade de biomassa em mg obtida todos os dias por mg de peso corporal inicial. A taxa de consumo relativo (B) indica a quantidade de dieta consumida em mg por mg de peso corporal de insetos por dia. A eficiência na conversão de alimentos ingeridos (B) (%) indica a quantidade de alimento ingerido pelos insetos como biomassa.



Fonte: autor, 2019. Cada barra corresponde à média  $\pm$  DP de quatro repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos pelo teste de Tukey.

Napoleão et al, 2013, testou, além do extrato, a lectina das folhas de *Myracrodruon urundeuva* (MuLL) contra *S. zeamais*. MuLL promoveu a perda de biomassa, como refletido nos valores negativos para as taxas de ganho relativo de biomassa e eficiência na conversão de alimentos ingeridos e os autores inferiram que os efeitos deletérios da lectina sobre *S. zeamais* poderia estar ligado à inibição enzimática e a consequente supressão dos processos digestivos, já que a lectina afetou a atividade de enzimas do intestino do inseto *in vitro*.

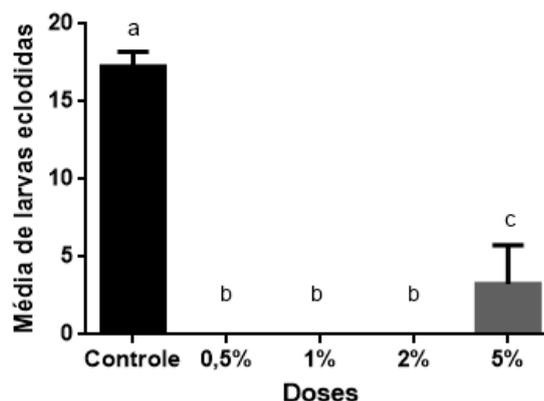
Outra lectina testada que apresentou efeitos semelhantes, foi a lectina extraída das folhas de *Schinus terebinthifolius* (StELL). A lectina não mostrou efeito

deterrente, mas a biomassa e a eficiência na conversão do alimento ingerido diminuiu de uma maneira dose dependente, analogamente ao que ocorreu nos testes com a fração de *C. stipularia* contra *T. castaneum*, neste trabalho. SteLL, também inibiu a atividade de proteases intestinais e estimulou a atividade da amilase (CAMAROTI et al., 2018).

Um dos principais mecanismos de ação de metabólitos secundários e lectinas, relatados na literatura, é o efeito inibidor ou estimulador de enzimas digestivas (CAMAROTI et al., 2018; NAPOLEÃO et al, 2013; SOUZA et al., 2018). Assim, sugere-se a investigação desse mecanismo de ação em estudos futuros, com extrato, fração e lectina de *C. stipularia* sobre *T. castaneum*, para melhor entender como agem essas formulações neste inseto.

A quantidade de larvas eclodidas por tratamento, dos insetos alimentados pela dieta contendo as diferentes doses da fração 20% de *C. stipularia* também foi observada, chegando a nenhuma larva eclodida nas doses intermediárias (0,5%, 1%, 2%), diferindo estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do controle (Figura 23)

Figura 23: Número de larvas eclodidas através da reprodução de insetos de *T. castaneum* tratados com o controle (Tris-HCl 50 mM) e com diferentes doses da fração 20% das sementes de *C. stipularia*.



Fonte: autor, 2019. Cada barra corresponde à média  $\pm$  DP de quatro repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos pelo teste de Tukey.

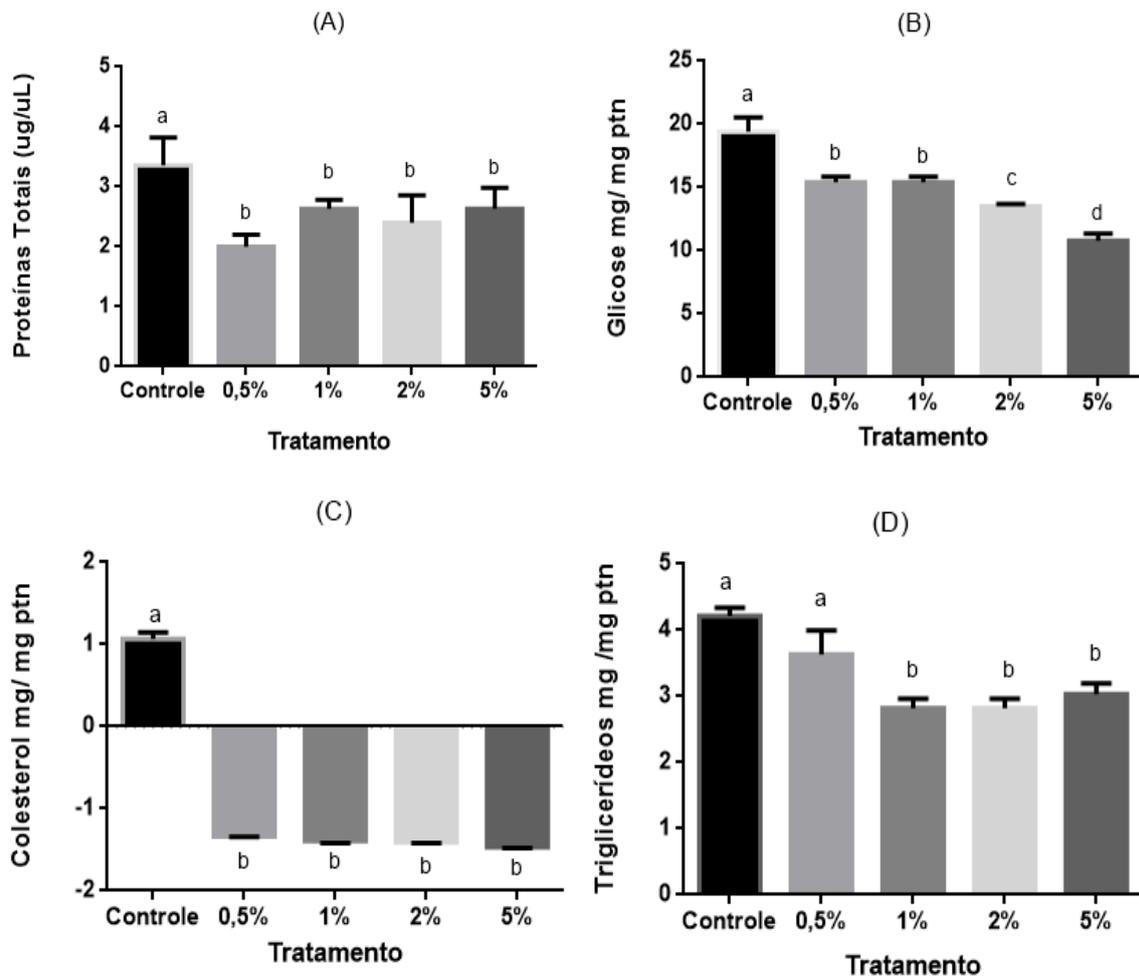
Não pode-se afirmar neste trabalho que a ingestão da fração proteica tenha causado a esterilidade dos insetos. Como já foi dito, os insetos estocam enormes quantidades de lipídeos, que serão utilizados, depois, pelo inseto adulto, como substrato para o vôo e durante a ovogênese (ZIEGLER, 1991).

Existem então algumas hipóteses, a saber: (1) como os insetos tiveram seus parâmetros nutricionais afetados pela alimentação com a fração (crescimento relativo e conversão do alimento ingerido), como pôde ser visto anteriormente, suas reservas de lipídeos, hipoteticamente, foram comprometidas, fato posteriormente confirmado ao realizar a dosagem de triglicérides desses insetos (figura 24 D). Dessa forma, as fêmeas de *T. castaneum* deixariam de pôr os ovos devido a falta ou a baixa quantidade das reservas de lipídeos, deixando de ovipositar, para poupar energia. (2) Outra hipótese, seria a atividade ovicida que tem sido descrita para lectinas, como a lectina da *Moringa oleifera* solúvel em água (WSMoL) que foi também larvicida contra o *A. aegypti*. Este trabalho relata os efeitos do WSMoL na oviposição e eclosão de ovos de *A. aegypti*. WSMoL ainda foi capaz de inibir a eclosão de ovos armazenados e análises mostraram que a lectina levou à morte dos embriões dentro dos ovos. (SANTOS, et al., 2012). A hipótese 3 seria de que como as taxas de triglicérides foram alteradas, esse fato poderia afetar a comunicação química desses insetos, já que os lipídeos, são as biomoléculas percussoras de feromônios.

Assim, novos ensaios poderão ser realizados a fim de confirmar as hipóteses, tanto com o extrato de *C. stipularia*, quanto com a fração 20%, para melhor inferir, se essas formulações interferiram na fecundação, fertilidade ou se foi diretamente na passagem da fase de ovo, para a larva.

Semelhantemente ao que foi feito com o extrato, a fim de conhecer os possíveis efeitos bioquímicos da ingestão da fração 20% de *C. stipularia* nos insetos de *T. castaneum*, foram avaliados os níveis de proteínas totais, glicose, colesterol e triglicérides dos insetos após o término do bioensaio, como descrito no item 4.12.1.3. Percebemos através da figura 24, redução significativa em todas as taxas avaliadas ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle, causando uma desestabilização praticamente total no metabolismo desses insetos na presença da preparação enriquecida de lectina de *C. stipularia*.

Figura 24: Perfil bioquímico do corpo macerado adultos de *T. castaneum* mantidos em dietas artificiais constituídas por discos de farinha de trigo preparados com Tris-HCl 50 mM (controles) ou fração 20% das sementes de *C. stipularia*. Nível de proteínas totais (A) em mg/mL, glicose (B) em mg de glicose/ mg de proteína, colesterol (C) em mg de colesterol/ mg de proteína e triglicerídeos (D) em mg de triglicerídeos/ mg de proteína.



Fonte: autor, 2019. Cada barra corresponde à média  $\pm$  DP de três repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos pelo teste de Tukey.

Como os testes deste trabalho foram feitos com todo o inseto, sugere-se que em trabalhos posteriores sejam avaliados os tecidos separados (intestino, corpo gorduroso) para melhor entender como esses tratamentos influenciam no metabolismo de *T. castaneum*.

## 6. CONCLUSÕES

No presente trabalho, o extrato aquoso e a fração proteica das sementes de *Crotalaria stipularia* foram avaliadas quanto ao seu potencial inseticida contra adultos de *Tribolium castaneum*.

A análise fitoquímica mostrou que no extrato foram encontrados flavonas, flavonóis, xantonas e saponinas. Na fração, não foi encontrado nenhum componente característico do metabolismo secundário das plantas, mas elevado conteúdo proteico.

Os resultados com os bioensaios mostram que o extrato apresentou maior atividade inseticida contra *T. castaneum* mantido na dose de 10%. Já a fração proteica 20% advinda do fracionamento salino, causou a mortalidade dos insetos em menor proporção que o extrato, revelando que a mortalidade está também associada aos metabólitos secundários presentes no extrato e ausentes na fração.

O extrato apresentou uma moderada atividade deterrente, diferentemente, a fração não apresentou atividade deterrente, porém ambos afetaram nos parâmetros nutricionais (taxa relativa de ganho de biomassa, taxa de consumo relativo e eficiência de conversão do alimento ingerido) dos insetos tratados, principalmente nas maiores doses testadas, equivalentemente, as taxas de proteínas, glicose, colesterol e triglicérides também foram alteradas, revelando que os tratamentos (tanto, extrato quanto fração) interferiram no metabolismo dos insetos.

Ambas as preparações avaliadas (extrato, fração), mostraram efeito sobre a capacidade reprodutiva (redução na eclosão de ovos), reduzido a zero o número de novos insetos gerados em alguns tratamentos, constituindo assim biomateriais de elevado potencial como método alternativo para o controle de insetos-praga. Este é o primeiro relato de investigação do potencial inseticida de *C. stipularia* contra *T. castaneum* e um dos primeiros trabalhos a abordar o uso de frações proteicas pré-purificadas como agente inseticida.

## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Purificar, caracterizar e avaliar a atividade inseticida da lectina pura de *C. stipularia*;
- Realizar todo o trabalho (teste com o extrato, fração e lectina pura) diante larvas de *T. castaneum*;
- Avaliar o perfil bioquímico dos diferentes tecidos do corpo de *T. castaneum*;
- Realizar testes inseticidas com bactérias do intestino de *T. castaneum*;
- Testar outros possíveis mecanismos de ação, como a ação da lectina em enzimas digestivas do inseto e a atividade ovicida.

## REFERÊNCIAS

- ABBASSI, K., ATAY-KADIRI, Z., GHAOUT, S. Biological effects of alkaloids extracted from three plants of Moroccan areas on the desert locust. **Physiological Entomology** 28, 232–236. 2003.
- ABDELLAOUI, K., BEN HALIMA-KAMEL, M., BEN HAMOUDA, M.H. Physiological effects of gibberellic acid on reproductive potential of *Locusta migratoria*. **Tunisian Journal of Plant Protection** 4, 67–75. 2009.
- ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA GRÃOS, v. 7 Safra 2017/18 - Sétimo levantamento, Brasília, p. 1-139 abril 2018.
- ACHEUK, F.; CUSSON, M.; DOUMANDJI-MITICHE, B. Effects of a methanolic extract of the plant *Haplophyllum tuberculatum* and of teflubenzuron on female reproduction in the migratory locust, *Locusta migratoria* (Orthoptera: Oedipodinae). **Journal of Insect Physiology** 58. 335–341. 2012.
- ADDOR, R.W. Insecticides. In: GODFERY, C.R.A. (ed.). **Agrochemicals from natural products**. New York: Marcel Dekker Inc., p. 1-62, 1994.
- AGRA-NETO, A. C.; NAPOLEÃO, T. H. ; PONTUAL, E. V. ; SANTOS, N. D. L. ; LUZ, L. A. ; OLIVEIRA, C. M. F. ; MELO-SANTOS, M. A. V. ; COELHO, L. C. B. B. ; NAVARRO, D. M. A. F. ; PAIVA, P. M. G. . Effect of *Moringa oleifera* lectins on survival and enzyme activities of *Aedes aegypti* larvae susceptible and resistant to organophosphate. **Parasitology Research** (1987. Print), v. 113, p. 175-184, 2014.
- AHMED, B.; AL-HOWIRINY, T.A. & MOSSA, J.S. Crotalic and emarginellic acids: Two triterpenes from *Crotalaria emarginella* and anti-inflammatory and anti-hepatotoxic activity of crotalic acid. **Phytochemistry**, 67(10): 956-964. 2006.
- AMRANI, L., ZERGUINE, K., FARINE, J.P., SMAGGHE, G., SOLTANI-MAZOUNI, N. Imidazole derivative KK-42 reduces ecdysteroid titers and interferes with reproductive processes in adult females of *Tenebrio molitor*. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 80, 163–172. 2004.
- ARIMURA, G.I.; MATSUI K.; TAKABAYASHI J. Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: proximate factors and their ultimate functions. **Plant Cell Physiol.** 2009.
- ARRESE, E.L., SOULAGES, J.L. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. **Annu. Rev. Entomol.** 55, 207-225. 2010.

ATHIÉ, I.; PAULA, D. C. **Insetos de grãos armazenados: aspectos biológicos e identificação**. 2ª ed. São Paulo, 2002.

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

BARILE, Elisa et al. Saponins from *Allium minutiflorum* with antifungal activity. **Phytochemistry**, v. 68, n. 5, p. 596-603, 2007.

BARNEY, J. et al. Quality of stored corn (maize) as influenced by *Sitophilus zeamais* Motsch. and several management practices. **Journal of Stored Products Research**, v.27, n.4, p.225-237, 1991.

BORGES, J.C.M.; HADDI, K. OLIVEIRA, E.E.; ANDRADE, V.L.N.; MELO, T.S.; DIDONET, J.; CARVALHO, J.C.T.; CANGUSSU, A.S.; SOARES, I.M; ASCENCIO, S.D.; RAPOSO, R.W.S.A. Mosquitocidal and repellent potential of formulations containing wood residue extracts of a Neotropical plant, *Tabebuia heptaphylla*. **Industrial Crops & Products** 129. 424–433. 2019.

BORROR, D.J. **Borrór and DeLong's: Introduction to the study of insects**. 7ª ed. Australia: Thomson, Brooks/Cole, 2005.

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

BROWN, S.; SHIPPY, T. D.; MILLER, S.; BOLOGNESI, R.; BEEMAN, R. W.; LORENZEN, M. D.; BUCHER, G.; WIMMER, R. A.; KLINGLER, M. The Red Flour Beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera): A Model for Studies of Development and Pest Biology. **Cold Spring Harb Protoc**. 2009.

BURKART, A. Las leguminosas argentinas: silvestres y cultivadas. 2. ed. Buenos Aires: **Acme Agency**. 579 p. 1952.

BUZZI, Z. J. **Entomologia didática**. 4. ed. Curitiba: Editora UFPR, 2005.  
CACCIA, S. et al. Mechanism of entomotoxicity of the plant lectin from *Hippeastrum hybrid* (Amaryllis) in *Spodoptera littoralis* larvae. **Journal of insect physiology**, v. 58, n. 9, p. 1177-1183, 2012.

CALDAS, E.D.; SOUZA, L.C.K.R. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. **Revista de Saúde Pública**, v.34, n.5, p.529-537, 2000.

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

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

CAMAROTI, J. R. S. L.; ALMEIDA, W. A.; BELMONTE, B. R.; OLIVEIRA, A. P. S.; LIMA, T. A. L.; FERREIRA, M. R. A.; PAIVA, P. M. G.; SOARES, L. A. L.; PONTUAL, E. V.; NAPOLEÃO, T. H.; *Sitophilus zeamais* adults have survival and nutrition affected by *Schinus terebinthifolius* leaf extract and its lectin (SteLL). **Industrial Crops and Products**, v. 116. p. 81–89. 2018.

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

CARVALHO, A. DE S. et al. Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.75, p. 402–408, 2015.

CASARI, S. A.; IDE, S. Coleoptera Linnaeus, 1758. In: RAFAEL, J. A.; MELO, G. A. R.; CARVALHO, C. J. B. de; CASARI, S. A.; CONSTANTINO, R. (Ed.). **Insetos do Brasil: diversidade e taxonomia**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2012. p. 453-536.

CASTANHEIRA, L. et al. Insights into anti-parasitism induced by a C-type lectin from *Bothrops pauloensis* venom on *Toxoplasma gondii*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 568–574, 2015.

CAVALCANTE, G.M.; MOREIRA, A.F.C.; VASCONCELOS, S.D. Potencialidade inseticida de extratos aquosos de essências florestais sobre mosca-branca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 9-14, 2006.

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

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

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

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

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

COSTA, C.; IDE, S. Coleoptera. In: COSTA, C.; IDE, S.; SIMONKA, C. E. (Ed.). **Insetos imaturos: metamorfose e identificação**. Ribeirão Preto; Holos, 2006. p. 107-146.

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

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

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

DEQUECH, S. T. B. et al. Efeito de extratos de plantas com atividade inseticida no controle de *Microtheca ochroloma* Stal (Col.: Chrysomelidae), em laboratório. **Biotemas**, v. 21, n. 1, p. 41-46, 2008.

DUDAREVA, N.; NEGRE, F.; NAGEGOWDA, D. A.; ORLOVA I. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. **Crit Rev Plant Sci**. 2006.

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

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

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

- FERNANDES, W.D.; FERRAZ, J.M.G.; FERRACINI, V.L.; HABIB, M.E.M. Deterrência alimentar e toxidez de extratos vegetais em adultos de *Anthonomus grandis* Boh. (Coleoptera: Curculionidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.25, p.553-556, 1996.
- FERNANDES, A. V.; RAMOS, M. V.; GONÇALVES, J. F.C.; MARANHÃO, P. A. C.; CHEVREUIL, L. R.; SOUZA, L. A. G. **Seeds of Amazonian Fabaceae as a source of new lectins**. *Braz. J. Plant Physiol.*, 23(3): 237-244, 2011.
- FERREIRA, M. M. M.; OLIVEIRA, A. H. C.; SANTOS, N. S. Flavonas e flavonóis: novas descobertas sobre sua estrutura química e função biológica. **Revista Agro@ambiente On-line**, v. 2, n. 2, p. 57-60 jul-dez, 2008
- FERREIRA, P. M. P.; CARVALHO, A. F. U.; FARIAS, D. F.; CARIOLANO, N. G.; MELO, V. M. M.; QUEIROZ, M. G. R.; MARTINS, A. M. C.; MACHADO-NETO, J. G. Larvicidal activity of the water extract of *Moringa oleifera* seeds against *Aedes aegypti* and its toxicity upon laboratory animals". **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 81, n. 2, p. 207-216, 2009.
- FITCHES, E. et al. In vitro and in vivo binding of snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA) and jackbean (*Canavalia ensiformis*; Con A) lectins within tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae; mechanisms of insecticidal action. **Journal of Insect Physiology**, v. 47, n. 7, p. 777-787, 2001.
- FITCHES, E. et al. An evaluation of garlic lectin as an alternative carrier domain for insecticidal fusion proteins. **Insect Science**, v. 15, p. 483-495, 2008.
- FITCHES, E.; GATEHOUSE, J.A. A comparison of the short and long term effects of insecticidal lectins on the activities of soluble and brush border enzymes of tomato moth larvae (*Lacanobia oleracea*). **Journal of Insect Physiology**, v. 44, p. 1213-1224, 1998.
- FLETCHER, B.S. Life history strategies of tephritid fruit flies. In: ROBINSON, A.S., Hooper G, editor. *Fruit flies, their biology, natural enemies and control*. 3B. Amsterdam: Elsevier **Science Publishers**; p. 195-208. 1989.
- FLORES, A. V.; RIBEIRO, J. N.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, E. L. R. **Organoclorados: Um problema de saúde pública**. *Ambiente & Sociedade*, v. 3, p. 111-124, 2004.
- FRANCO-FRAGUAS, L.; PLÁ, A.; FERREIRA, F.; MASSALDI, H.; SUÁREZ, N.; VIERA, F. B. Preparative purification of soybean agglutinin by affinity chromatography and its immobilization for polysaccharide isolation. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 790, n. 1, p. 365-72, 2003.
- FRASSINETTI, S. et al. Antimutagenic and Antioxidant Activity of a Selected Lectin-free Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Two Cell-based Models. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 70(1), p. 35–41, 2015.

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

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

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

GHOSAL, S.; CHAUDHURI, R. K. Chemical constituents of Gentianaceae. Antitubercular activity of xanthones of *Canscora decussata* Schult. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.64, p.888-889, 1975.

GHOSAL, S.; BISWAS, K.; CHAUDHURI, R. K. Anti Mycobacterium tuberculosis activity of naturally occurring xanthones and synthetic analogs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.67, p.1978, 1978.

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

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

GROSSCURT, A.C. Diflubenzuron: some aspects of its ovicidal and larvicidal mode of action and evaluation of its practical possibilities. **Pesticide Science** 9, 373–386. 1978.

HAGEDUS, D., ERLANDSON, M., GILLOTT, C., TOPRAK, U. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture and function. **Annual Review of Entomology** 54, 285–302. 2009.

HARE, J. D. Ecological role of volatiles produced by plants in response to damage by herbivorous insects. **Annu Rev Entomol**. 2011.

HANLEY, M.E.; LAMONT, B. B.; FAIRBANKS, M. M.; RAFFERTY, C. M. Plant structural traits and their role in antiherbivore defense. Perspec. **Plant Ecol Evol Syst**. 2007.

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

HERNANDEZ, C.R.; VENDRAMIM, J.D. Uso de índices nutricionales para el efecto insectistatico de extratos de Meliáceas sobre Spodopterafrugiperda. **Manejo integrado de plagas**, n.48, p.79-88, 1998.

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

HOWE, G.A., JANDER, G. Plant immunity to insect herbivores. **Annu Rev Plant Biol.** 2008.

HOLTZ, A. M.; OLIVEIRA, H. G.; PALLINI, A.; VENZON, M.; ZANUNCIO, J. C.; OLIVEIRA, C. L.; MARINHO, J. S.; ROSADO, M. C. Desempenho de *Thyrintea arnobia* Stoll (Lepidoptera: Geometridae) em Eucalipto e Goiaba: o hospedeiro nativo não é um bom hospedeiro?. **Neotropical Entomology**, v. 32, p. 427-431, 2003.

HUANG, Y., HO, S.H. Toxicity and antifeedant activities of cinnamaldehyde against the grains storage insects, *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. **Journal of Stored Products Research** 34, 11-17.1998

ISMAN M.B.; KOUL O.; LUCZYNSKI A.; KAMINSKI J. Insecticidal and antifeedant bioactivities of neem oils and their relationship to azadirachtin content. **J Agric Food Chem** 38:1406–1411. 1990.

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

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

JADON, R.; DIXIT, S. **Phytochemical extraction and antimicrobial activity of some medicinal plants on different microbial strains**. Journal of Medicinal Plants Studies. Vol. 2. n. 3. 2014.

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

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

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

KHALID, S.A., WATERMAN, P.G. Alkaloid, lignan and flavonoid constituents of *Haplophyllum tuberculatum* from Sudan. **Journal of Medicinal Plant Research** 43,148–152. 1981.

LANCHER, W. *Ecofisiologia vegetal*. São Carlos: Rima, 2000. p. 519.

LAWRENCE, J. F.; BRITTON, E. B. Coleoptera (beetles). In: C.S.I.R.O. Division of Entomology. **The insects of Australia**: a textbook for students and research workers. 2. ed. Carlton: Melbourne University Press, 1991. p. 543-683.

- LEITE, Y. F. M. M.; SILVA, L. M. C. M.; AMORIM, R. C. N.; FREIRE, E.A.; MELO, J. D. M.; GRANGEIRO, T. B.; BENEVIDES, N. M. B. **Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae)**. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1724, p. 137-145, 2005.
- LEITE, J. F. M. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a lectin-like substance from *Clitoria fairchildiana* R. Howard seeds. **Molecules**, v. 17(3), p. 3277–3290, 2012.
- LEWIS, G.P.; SCHRIRE, B.; MACHINDER, B. & LOCK, M. Legumes of the world. **Kew: Royal Botanic Gardens**. 577 p. 2005.
- LI, H. M. et al. Transcriptional signatures in response to wheat germ agglutinin and starvation in *Drosophila melanogaster* larval midgut. **Insect molecular biology**, v. 18, n. 1, p. 21-31, 2009.
- LIM, S.J., LEE, S.S. Toxicity of diflubenzuron to the grasshopper *Oxya japonica*: effects on reproduction. **Entomologica Experimentalis et Applicata** 31, 154–158. 1882.
- LIMA, E. P.; LOPES, S. M. B.; AMORIM, M. I. M.; ARAÚJO, L. H. S.; NEVES, R. T.; MAIA, E. R. Exposição a pesticidas e repercussão na saúde de agentes sanitários no Estado do Ceará, Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 14, p. 2221-2230, 2009.
- LIMPENS, E.; BISSELING, T. Signaling in symbiosis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 343-350, 2003.
- LORINI, I.; LINCON, H. M.; VILDES, M. S. **Armazenamento de grãos**. IBG, Campinas SP, 2002.
- LORINI, I.; KRZYZANOWSKI, F. C.; FRANÇA-NETO, J. B.; HENNING, A. A.; HENNING, F. A. **Manejo Integrado de Pragas de Grãos e Sementes Armazenadas**. Embrapa. Brasília, DF. 2015.
- LUZ, J.M.Q.; SHINZATO, A.V.; SILVA, M.A.D. Comparação dos sistemas de produção de tomate convencional e orgânico em cultivo protegido. **Biociência Journal**, v.23, n.2, p.7-15, 2007.
- MACEDO, M L R et al. Mechanisms of the insecticidal action of TEL (*Talisia esculenta* lectin) against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America**, v. 56, n. 2, p. 84-96, 2004.

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

MANSUR, J.F., FIGUEIRA-MANSUR, J., SANDOS, A.S., SANDOS-JUNIOR, H., RAMOS, I.B., NEVES DE MEDEIROS, M., MACHADO, E.A., KAISER, C.R., MUTHUKRISHNAN, S., MASUDA, H., VASCONCELLOS, A.M.H., MELO, A.C.A., MOREIRA, M.F. The effect of lufenuron, a chitin synthesis inhibitor, on oogenesis of Rhodnius prolixus. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 98, 59–67. 2010.

MAPA DO BRASIL PRETO E BRANCO, 2012. Disponível em:  
<https://minutolidado.com.br/mapas/mapa-do-brasil-para-colorir/attachment/mapa-do-brasil-preto-e-branco/>

Mapa Mundi- mapa mundo, 2012. Disponível em:  
<http://minutolidado.com.br/mapas/mapa-mundi/#>

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

MEDEIROS, A.R.M. Alelopatia: importância e suas aplicações. **Hortisul**. v.1, n.3, p.27-32. 1990.

MELLO, M. O.; SILVA-FIHO, M. C. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanism. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 14, p. 71-81, 2002.

MENEZES, E.L.A. **Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modos de ação e uso agrícola**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2005.

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

MORAGAS, W.M.; SCHNEIDER, M.O. Biocidas: suas propriedades e seu histórico no Brasil. **Caminhos de Geografia** 3(10)26-40, 2003.

MOREIRA, M.F., DOS SANTOS, A.S., MAROTTA, H.R., MANSUR, J.F., RAMOS, I.B., MACHADO, E.A., SOUZA, G.H.M.F., EBERLIN, M.N., KAISER, C.R., KRAMER, K.J., MUTHUKRISHNAN, S., VASCONCELLOS, A.M.H. A chitin-like component in Aedes aegypti eggshells, eggs and ovaries. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 37, 1249–1261. 2007.

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

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

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

MURDOCK, L. L.; HUESING, J. E.; NIELSEN, S. S.; PRATT, R.C.; SHADE, R. E. Biological effects of plant lectins on the Cowpea weevil. **Phytochemistry**, v. 29, p. 85- 89, 1990.

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

NAPOLEÃO, T. H.; PONTUAL, E. V.; LIMA, T. A.; SANTOS, N. D. L.; SÁ, R. A.; COELHO, L. C. B. B.; NAVARRO, D. M. A. E.; PAIVA, P. M. G. Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. **Parasitology Research**, v. 110, p. 609-616, 2012.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

PEUMANS, W. J., VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, p. 347-352, 1995.

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

PONTES, E.G., LEITE, P., MAJEROWICZ, D., ATELLA, G.C., GONDIM, K.C. Dynamics of lipid accumulation by the fat body of *Rhodnius prolixus*: the involvement of lipophorin binding sites. **J. Insect Physiol.** 54, 790-797. 2008.

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

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

PROCÓPIO, T. F. ; FERNANDES, K. M. ; PONTUAL, E. V. ; XIMENES, R. M. ; OLIVEIRA, A. R. C. ; SOUZA, C. S. ; MELO, A. M. M. A. ; NAVARRO, D. M. A. F. ; PAIVA, P. M. G. ; MARTINS, G. F. ; NAPOLEÃO, T. H. . *Schinus terebinthifolius* leaf

extract causes midgut damage, interfering with survival and development of *Aedes aegypti* larvae. **Plus One**, v. 10, p. e0126612, 2015.

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

PUNGITORE, C.R., GARCÍA, M., GIANELLO, J.C., SOSA, M.E., TONN, C.E. Insecticidal and antifeedant effects of *Junellia aspera* (Verbenaceae) triterpenes and derivatives on *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research** 41, 433-443. 2005.

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

ROEL, A.R.; VENDRAMIM, J.D.; FRIGHETTO, R.T.S. E F RIGHETTO, N. Atividade tóxica de extratos orgânicos de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.29, p.799-808, 2000.

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

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

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

SALVADORI, J.R.; LAU, D.; PEREIRA, P.R.V.S.; **Cultivo de trigo**. Embrapa trigo, Sistema de Produção, 4, 2009.

SAMSON, R.A. et al. Methods for the detection and isolation of food-borne fungi. *In*: R.A. Samson, E.S. Hoekstra, J.C. Frisvad and O. Filtenborg. **Introduction to food-borne fungi**. Baarn, CBS. p. 235-242, 1996.

SANCHES, S.M. Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. **Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v.13, p. 53-58, 2003.

SANTIAGO·G M. P.; VIANA, F. A. PESSOA·O. D. L.; SANTOS, R. P.; POULIQUEN·Y.B.M.; ARRIAGA, A.M.C.; ANDRADE-NETO, M.; BRAZ-FILHO, R. Avaliação da atividade larvicida de saponinas triterpênicas isoladas de *Pentaclethra*

*macroloba*(Willd.) Kuntze (Fabaceae) e *Cordia piauhiensis*Fresen (Boraginaceae) sobre *Aedes aegypti*. **Rev. bras. farmacogn.** vol.15 n.3 João Pessoa. 2005

SANTOS, B. S.; FARIAS, P. M. A.; MENEZES, F. D.; FERREIRA, R. C.; ALVES JÚNIOR, S.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; BELTRÃO, E. I. C. Lectin functionalized quantum dots for recognition of mammary tumors. **Proceedings of SPIE**, San Diego, v. 6096, n. 4, p. 1J-8J, 2006.

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

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

SHAALAN, E.A.S., CANYON, D., YOUNES, M.W.F., ABDEL-WAHAB, H., MANSOUR, A.H. A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. **Environment International** 31, 1149–1166. 2005.

SILVA, T.O. da; MENEZES, R.S.C.; TIESSEN, H.; SAMPAIO, E.V. de S.B.; SALCEDO, I.H. & SILVEIRA, L.M. da. Adubação orgânica da batata com esterco e, ou, *Crotalaria juncea*. I – Produtividade vegetal e estoque de nutrientes no solo em longo prazo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 31(1): 39-49. 2007.

SILVA, M. C.; CORRÊA, A.D.; SANTOS, C.D.; MARCOS, F. C. A.; ABREU C.M. P. **Extração da lectina da folha de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e o efeito de cátions divalentes na atividade hemaglutinante.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, p. 103-107, 2010.

SILVA, F. DE O. et al. Antiproliferative effect of *Canavalia brasiliensis* lectin on B16F10 cells. **Research in Veterinary Science**, v. 96(2), p. 276–282, 2014.  
SLIPINSKI, S.A.; LESCHEN, R.A.B.; LAWRENCE, J.F. Order Coleoptera Linnaeus, 1758. **Zootaxa**, v. 3148, p. 203–208, 2011.

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

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

SPRAWKA, I et al. Effect of the lectin PHA on the feeding behavior of the grain aphid. **Journal of pest science**, v. 83, n. 2, p. 149-155, 2010.

TANG, C. S.; YANG, R. Z. Plants used for pest control in China: a literature review. **Economic Botany**, United States, v.42. n.3, p.376-406, 1988.

TORRES, A.; JÚNIOR, A.L.B.; MEDEIROS, C.A.M.; BARROS, R. Efeito de extratos aquosos de *Azadirachta indica*, *Melia azedarach* e *Aspidosperma pyrifolium* no desenvolvimento e oviposição de *Plutella xylostella*. **Bragantia**, v.65, n.3, p.447-457, 2006.

USHA, R. P.; JYOTHSNA, Y. Biochemical and enzymatic changes in rice as a mechanism of defense. **Acta Physiol Plant**. 2010.

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

VALUEVA, T. A.; MOSLOV, V. V. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. **Biochemistry**, v. 69, p. 1305-1309, 2004.

VASCONCELOS, G.J.N.; GODIN JUNIOR, M.G.C.; BARROS, R. Extratos aquosos de *Leucaena leucocephala* e *Sterculia foetida* no controle de *Bemisia tabaci* biótipo B (Hemíptera: Aleyrodidae). **Ciência Rural**, v.36, n.5, p.1353-1359, 2006.

VENDRAMIM, J.D. Uso de plantas inseticidas no controle de pragas. In: CICLO DE PALESTRAS SOBRE AGRICULTURA ORGÂNICA, 2, 1997, São Paulo, SP. **Anais. São Paulo: Fundação Cargill**, 1997. p.64-69.

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, n.3, p. 390-400, 2003.

WAR, A. R.; PAULRAJ, M.G.; WAR, M.Y. Ignacimuthu S. Herbivore- and elicitor-induced resistance in groundnut to Asian armyworm, *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Plant Signal Behav**. 2011.

WAR, A. R.; PAULRAJ, M. G.; AHMAD, T., BUHROO, A. A.; HUSSAIN, B.; IGNACIMUTHU, S.; SHARMA, H. C. Mechanisms of Plant Defense against Insect Herbivores. **Plant Signaling & Behavior**. 2012.

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

XIE Y. S.; FIELDS P. G.; ISMAN M. B. Repellency and toxicity of azadirachtin and neem to three store-product beetles. **Journal of Economic Entomology** (in press), 1996.

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

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

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

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