

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL INSETICIDA DE EXTRATOS E LECTINAS  
DE CASCA E CERNE DE *Myracrodruon urundeuva* CONTRA O GORGULHO DO  
MILHO (*Sitophilus zeamais*)**

**BERNARDO DO REGO BELMONTE**

ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup> DRA. PATRÍCIA MARIA GUEDES PAIVA

COORIENTADOR: PROF. DR. THIAGO HENRIQUE NAPOLEÃO

RECIFE  
2015

BERNARDO DO REGO BELMONTE

DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL INSETICIDA DE EXTRATOS E LECTINAS DE  
CASCA E CERNE DE *Myracrodruon urundeuva* CONTRA O GORGULHO DO MILHO  
(*Sitophilus zeamais*)

Dissertação apresentada para o cumprimento parcial das exigências para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva.

Coorientador: Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão

RECIFE  
2015

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Belmonte, Bernardo do Rego

Determinação do potencial inseticida de extratos e lectinas de casca de cerne de *Myracrodon urundeuva* contra o gorgulho do milho (*Stophilus zeamais*) / Bernardo do Rego Belmonte. – Recife: O Autor, 2015.

74 f.: il.

Orientadores: Patrícia Maria Guedes Paiva, Thiago Henrique Napoleão  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, 2015.

*Inclui referências*

1. Pragas – Controle 2. Lectinas I. Paiva, Patrícia Maria Guedes (orient.) II. Napoleão, Thiago Henrique (coorient.) III. Título.

632.9

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-251

BERNARDO DO REGO BELMONTE

DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL INSETICIDA DE EXTRATOS E LECTINAS DE  
CASCA E CERNE DE *Myracrodruon urundeuva* CONTRA O GORGULHO DO MILHO  
(*Sitophilus zeamais*)

Dissertação apresentada para o  
cumprimento parcial das exigências para a  
obtenção do título de Mestre em  
Bioquímica e Fisiologia pela Universidade  
Federal de Pernambuco

Aprovado por:

---

Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva (Orientadora)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Profa. Dra. Lidiane Pereira de Albuquerque  
Universidade Federal do Piauí

---

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Dra. Tatiana Soares  
Universidade Federal de Pernambuco

Data: 30 / 07 / 2015

*Aos meus pais, Luciana e Carlos Alberto e  
aos meus irmãos, Amanda e Hugo Leonardo.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha existência, e por fornecer todas as ferramentas para realização dessa dissertação como a presença de minha família e amigos.

Agradeço aos meus pais, Luciana e Carlos Alberto pelo carinho, amor o cuidado e por me darem forças ao longo dessa jornada pra continuar sempre em frente vencendo os obstáculos. Aos meus irmãos, Hugo e Amanda pela companhia, auxílio e carinho, dando forças ao longo do caminho. Ao meu sobrinho Miguel que nos alegra com sua doçura, carinho, traquinagem e amor. Ao meu outro sobrinho que ainda está por vir, João Gabriel, que será outro motivo de felicidade pra minha família nos unindo e propiciando muito amor. Aos meus tios e tias que me forneceram uma grande ajuda pra continuar caminhando. Sempre me aconselhando, elogiando, revigorando o gosto pela vida além de toda consideração e amor depositado. Agradeço aos meus primos pelo companheirismo e bons momentos concedidos.

Agradeço aos meus amigos de vida que seguiram comigo por essa jornada de dois anos, demonstrando grande companheirismo e propiciando muita felicidade e diversão. Como João Henrique, Anderson, José André, Thiago, Rodrigo, Bellinha, Daniel, Lua, Léa, Rafa, Liginha, Diogo e tantos outros. Aos meus amigos do conservatório que com seus talentos e musicalidade embelezou minha jornada. Aos meus amigos do colégio Damas, colégio NAP e curso BJ que por mais distante que estejamos mantemos bons e fortes laços. Aos meus amigos do grupo de Casa Forte, que me incentivam na espiritualidade, no carinho e no amor. Aos meus amigos de curso da UFPE que apesar de toda correria de vida e luta pra vencer na vida mantemos bons laços de amizade. Aos meus amigos do grupo voz do Capibaribe e do teatro mamulengo que sua energia, vitalidade, musicalidade me ajudaram e muito a realização dessa minha jornada.

Queria agradecer a amigos particulares que foram tão necessários para essa minha jornada. A Eva por sua luz, amor e grande amizade. A Carol por sua fiel amizade. Pela fiel amizade e enorme meiguice de Larissa. A Júlia que embora distante, mantemos nossa amizade, amor, carinho e companheirismo sempre em ascensão. A minha amiga Fernanda que mesmo longe no dia a dia mantemos um enorme carinho e consideração. Ao meu grande amigo Will um cara sensacional que transborda alegria, Inteligência e companheirismo. A minha amiga Isabela por sua alegria, cuidado, grande amizade e seu cabelo de molinha. A Katarinna, embora distantes, temos uma grande estima um pelo outro... sendo grandes amigos boas palavras pra nos descrever. A Karla, embora distantes devido ao mestrado, temos uma afinidade e carinho um pelo outro que supera essas adversidades. A Erica por sua simpatia, meiguice e amizade. Queria agradecer a Geórgia que embora conheça há pouco tempo, já conseguiu tornar minha vida melhor. Irradiando alegria, beleza, simpatia além de força pra não fraquejar no fim dessa jornada. E por fim, porque ela me cativou.

Queria agradecer a todo o apoio concedido pelo Laboratório de Bioquímica de Proteínas com a presença de tantos amigos que me ajudaram durante esses dois anos. Como Lívia, Leonardo, Thâmarah, Thamara, Nataly, Emmanuel, Lidiane, Ana paty, Francis, Tati, David, Poly, Raiana, Carlos entre tantos outros. Aos técnicos e a todos os outros colegas de outros laboratórios que me auxiliaram na jornada de experimentos. Queria agradecer em particular a Professora e orientadora Patrícia pela assistência, paciência e simpatia. Ao meu grande e nobre amigo Thiago que além de sua enorme paciência, me ajudou a iniciar, permanecer e finalizar essa etapa.

Agradeço a FACEPE pela concessão da bolsa acadêmica. Que me financia desde minhas iniciações científicas.

*“O que mais me surpreende na humanidade, são os "homens". Porque perdem a saúde para juntar dinheiro. Depois perdem dinheiro para recuperar a saúde. E por pensarem ansiosamente no futuro, esquecem do presente de tal forma que acabam por não viver nem o presente nem o futuro. E vivem como se nunca fossem morrer... ... E morrem como se nunca tivessem vivido.”*

*(Dalai Lama)*

## RESUMO

Lectinas são proteínas que apresentam atividade inseticida, sendo capazes de interferir na alimentação, desenvolvimento, reprodução e sobrevivência de insetos. *Sitophilus zeamais*, conhecido como gorgulho-do-milho, destaca-se como uma das principais pragas de grãos armazenados no Brasil e causa danos aos grãos de milho, trigo, sorgo e arroz. *Myracrodruon urundeuva* (aroeira-do-sertão) é uma árvore, madeira de lei, amplamente distribuída no Brasil. O presente trabalho avaliou os efeitos deletérios de extratos e lectinas isoladas da entrecasca (MuBL) e do cerne (MuHL) de *M. urundeuva* sobre o gorgulho-do-milho. Para determinação da atividade inseticida, a amostra foi incorporada a discos de farinha de trigo que serviram como dieta para os insetos durante 7 dias. As faixas de concentração testadas foram: 4 a 20 mg do extrato da entrecasca por g de farinha de trigo, 14 a 70 mg/g (extrato do cerne), 0,6 a 3,0 mg/g (MuBL) e 1,4 a 7,0 mg/g (MuHL). Após o término do bioensaio, foi avaliada a taxa de mortalidade e os seguintes parâmetros nutricionais: índice de deterrência alimentar (IDA), taxa de consumo relativo (TCR), taxa de ganho relativo de biomassa (TGB) e eficiência na conversão do alimento ingerido (ECAI). Em seguida, foram realizados ensaios com o extrato da entrecasca, extrato do cerne, MuBL e MuHL em concentrações de 20 mg/g, 70 mg/g, 3 mg/g e 7 mg/g, respectivamente, e após 7 dias, extratos de intestino dos insetos foram obtidos e avaliados quanto às atividades de protease, celulasas (endoglucanase, exoglucanase,  $\beta$ -glicosidase), fosfatases (ácida e alcalina) e  $\alpha$ -amilase. As dietas contendo os extratos de entrecasca e do cerne não induziram mortalidade dos insetos em um período de 7 dias de experimento, bem como não exerceram efeito deterrente sobre os insetos. Contudo, ambos os extratos interferiram nos parâmetros nutricionais dos insetos. Em todos os tratamentos com os extratos houve redução da biomassa corporal, uma vez que os valores de TGB foram negativos. Os valores de ECAI também foram negativos, variando de -3% a -70%. Com relação à TCR, os valores não foram significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) que no controle, corroborando com a ausência de efeito deterrente. A comparação entre as concentrações testadas e os valores obtidos para os parâmetros nutricionais revela que o extrato da casca foi mais efetivo que o extrato do cerne. MuBL não induziu mortalidade em 7 dias, mas afetou a incorporação da dieta pelos insetos, como evidenciado pelos valores negativos de TGB e ECAI. Os valores de TCR foram maiores que no grupo controle, indicando a ausência de efeito deterrente. MuHL apresentou efeito deterrente variando de 44,82% (fraca) a 89,65% (forte) de acordo com a concentração e afetou fortemente a nutrição dos insetos, com valores de ECAI chegando a -360%. Uma vez que todas as amostras testadas apresentaram efeitos antinutricionais, as atividades de enzimas digestivas em insetos do grupo controle e que ingeriram os extratos e as lectinas foram avaliadas. A ingestão do extrato da entrecasca não resultou em alteração significativa ( $p > 0,05$ ) das atividades de protease, fosfatase ácida, fosfatase alcalina e  $\beta$ -glicosidase. Já as atividades de endoglucanase, exoglucanase e  $\alpha$ -amilase foram maiores em relação ao controle. Os insetos que ingeriram o extrato do cerne apresentaram atividades de protease, endoglucanase, exoglucanase e  $\alpha$ -amilase menores em comparação ao controle enquanto a atividade de fosfatase ácida foi maior. No tratamento com MuBL, as atividades de fosfatase ácida e  $\alpha$ -amilase foram menores em relação ao controle. Por outro lado, as atividades de protease, endoglucanase e exoglucanase foram maiores. No tratamento com MuHL, as atividades de fosfatase alcalina, fosfatase ácida e exoglucanase foram menores em relação ao controle. Em conclusão, extratos e lectinas de entrecasca e cerne de *M. urundeuva* exerceram efeitos antinutricionais sobre adultos de *S. zeamais*, apresentando potencial para uso no controle dos danos causados por esse inseto-praga.

**Palavras-chave:** *Sitophilus zeamais*. Aroeira-do-sertão. Lectina. Efeito antinutricional. Enzimas digestivas.

## ABSTRACT

Lectins are proteins with insecticidal activity able to interfere with the feeding, development, reproduction and survival of insects. *Sitophilus zeamais*, known as maize weevil, stands out as one of the main stored grain pests in Brazil and causes damage to maize, wheat, sorghum and rice. *Myracrodruon urundeuva* (aroeira-do-sertão) is a hardwood tree broadly distributed in Brazil. The present work evaluated the deleterious effects of extracts and lectins isolated from the bark (MuBL) and heartwood (MuHL) of *M. urundeuva* against the maize weevil. For determination of insecticidal activity, the sample was incorporated into wheat flour disks that served as diet for the insects during 7 days. The concentration ranges tested were: 4–20 mg of bark extract per gram of wheat flour, 14–70 mg/g (heartwood extract), 0.6–3.0 mg/g (MuBL) and 1.4–7.0 mg/g (MuHL). After the end of bioassay, it was evaluated the mortality rate and the following nutritional parameters: feeding deterrence index (FDI), relative consumption rate (RCR), relative biomass gain rate (BGR) and efficiency in conversion of ingested food (ECIF). Next, it was performed assays with the bark extract, heartwood extract, MuBL and MuHL at concentrations of 20 mg/g, 70 mg/g, 3 mg/g and 7 mg/g, respectively, and after 7 days, extracts from insects gut were obtained and evaluated for the activities of protease, cellulases (endoglucanase, exoglucanase,  $\beta$ -glucosidase), phosphatases (acid and alkaline) and  $\alpha$ -amylase. The diets containing the bark and heartwood extracts did not induce mortality of the insects in a period of 7 days of assay as well as did not exert deterrent effect on the insects. However, both extracts interfered with the nutritional parameters of the insects. In all treatments with the extracts, there was a reduction of body biomass since the values of BGR were negative. The values of ECIF were also negative, ranging from -3% to -70%. Concerning RCR, the values were not significantly ( $p > 0.05$ ) from control, corroborating the absence of deterrent effect. The comparison between the tested concentrations and the values obtained for the nutritional parameters reveal that the bark extract was more effective than the heartwood extract. MuBL did not induce mortality in 7 days but affected the incorporation of the diet by the insects, as evidenced by the negative values of BGR and ECIF. The RCR values were higher than in control group indicating the absence of deterrent effect. MuHL showed deterrent effect ranging from 44.82% (weak) to 89.65% (strong) according to the concentration and affected strongly the insect nutrition, with ECIF values reaching -360%. Since all the tested samples showed antinutritional effects, the activities of digestive enzymes from insects of control group and that ingested the extracts and lectins were evaluated. The ingestion of bark extract did not result in significant alteration ( $p > 0.05$ ) of the activities of protease, acid and alkaline phosphatases and  $\beta$ -glucosidase. However, the activities of endoglucanase, exoglucanase and  $\alpha$ -amylase were higher concerning control. The insects that ingested the heartwood extract showed protease, endoglucanase, exoglucanase and  $\alpha$ -amylase activities lower than in control while the activity of acid phosphatase was higher. In treatment with MuBL, the acid phosphatase and  $\alpha$ -amylase activities were lower than in control. On the other hand, the activities of protease, endoglucanase and exoglucanase were higher. In the treatment with MuHL, the activities of alkaline and acid phosphatases and of exoglucanase were lower than in control. In conclusion, the extracts and lectins from bark and heartwood of *M. urundeuva* exerted antinutritional effects on *S. zeamais* adults, showing potential for use in control of the damages caused by this insect pest.

**Keywords:** *Sitophilus zeamais*. Aroeira-do-sertão. Lectin. Antinutritional effects. Digestive enzymes.

## LISTA DE FIGURAS

### FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

- Figura 1.** Morfologia geral dos Curculionidae. (A) vista dorsal; (B) vista ventral; (C) vista lateral. 22
- Figura 2.** *Sitophilus zeamais*. Inseto adulto com partes corporais evidenciadas. 23
- Figura 3.** *Sitophilus zeamais*. (A) Inseto macho com o rostró curto e grosso e a fêmea com o rostró longo e afilado. (B) Infestação por gorgulhos com grãos de milho totalmente deteriorados. São evidenciados os orifícios irregulares produzidos pelos insetos. 24
- Figura 4.** *Sitophilus zeamais*. (A) Fêmea ovipositando, com posterior desenvolvimento larval e formação da pupa. (B) Fotografia evidenciando a pupa em grão de arroz. 25
- Figura 5.** *Myracrodruon urundeuva*. (A) planta inteira; (B) árvore sem folhas. 29
- Figura 6.** *Myracrodruon urundeuva*. (A) Folha. (B) Inflorescência com frutos verdes e maduros. (C) Flores. (D) Frutos. 30
- Figura 7.** *Myracrodruon urundeuva*. (A) casca; (B) madeira. 31
- Figura 8.** Lectinas. (A) Desenho esquemático da ligação lectina-carboidrato. As linhas pontilhadas estão representando pontes de hidrogênio. (B) Representação esquemática da aglutinação celular promovida pelas lectinas. Lectina (  ) interagindo com seus ligantes da superfície celular (  ) onde os ligantes podem ser carboidratos ou não. 33

### ARTIGO

- Figure 1.** Nutritional parameters of *S. zeamais* adults reared on artificial diets consisting of wheat flour disks prepared with distilled water (controls) or *M. urundeuva* bark(A, B, C) or heartwood (D, E, F) extracts. The relative biomass gain rate indicates the amount of biomass in mg gained every day per mg of initial body weight. The relative consumption rate indicates the amount of food consumed in mg per mg of insect body weight per day. The efficiency in conversion of ingested food (%) indicates the amount of ingested food incorporated by insects as biomass. Each bar corresponds to the mean  $\pm$  SD of four replicates. Different letters indicate significant ( $p < 0.05$ ) differences between treatments. 60
- Figure 2.** Nutritional parameters of *S. zeamais* adults reared on artificial diets consisting of wheat flour disks prepared with distilled water (controls), MuBL (A, B, C) or MuHL (D, E, F) extracts. The relative biomass gain rate indicates the amount of biomass in mg gained every day per mg of initial body weight. The relative consumption rate indicates the amount of food consumed in mg per mg of insect body weight per day. The efficiency in conversion of ingested food (%) indicates the amount of ingested food incorporated by insects as biomass. Each bar corresponds to the mean  $\pm$  SD of four replicates. Different letters indicate significant ( $p < 0.05$ ) differences between treatments. 63

## LISTA DE TABELAS

### FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

<b>Tabela 1.</b> Parâmetros biológicos da espécie <i>Sitophilus zeamais</i> .	25
---	----

### ARTIGO

<b>Table 1.</b> Survival rates of <i>S. zeamais</i> adults reared for 7 days on diets containing <i>M. urundeuva</i> bark extract or heartwood extract.	59
---	----

<b>Table 2.</b> Survival rates of <i>S. zeamais</i> adults reared for 7 days on diets containing <i>M. urundeuva</i> bark (MuBL) or heartwood (MuHL) lectins.	62
---	----

<b>Table 3.</b> Digestive enzyme activities in gut extracts from <i>S. zeamais</i> adults reared on diets consisting on wheat flour disks containing extracts from <i>M. urundeuva</i> bark and heartwood.	66
--	----

<b>Table 4.</b> Digestive enzyme activities in gut extracts from <i>S. zeamais</i> adults reared on diets consisting on wheat flour disks containing lectins from <i>M. urundeuva</i> bark (MuBL) and heartwood (MuHL).	67
---	----

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	12
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	14
<b>2.1 Mecanismos de defesa das plantas</b>	14
<b>2.2 Insetos-praga</b>	15
<b>2.3 Controles populacional de insetos</b>	17
2.3.1 Controle químico	17
2.3.2 Métodos de controle de pragas	19
<b>2.4 Ordem Coleoptera</b>	19
2.4.1 Família Curculionidae	21
2.4.2 <i>Sitophilus zeamais</i> (Gorgulho-do-milho)	23
<b>2.5 Família Anacardiaceae</b>	27
2.5.1 <i>Myracrodruon urundeuva</i> (Aroeira-do-sertão)	28
<b>2.6 Lectinas</b>	32
2.6.1 Lectinas e suas fontes	32
2.6.2 Métodos de purificação	33
2.6.3 Funções e aplicações biológicas	34
2.6.4 Lectinas de <i>M. urundeuva</i>	35
<b>3. OBJETIVOS</b>	37
<b>3.1 Objetivo geral</b>	37
<b>3.2 Objetivos específicos</b>	37
<b>4. REFERÊNCIAS</b>	38
<b>5. ARTIGO</b>	47
<b>6. CONCLUSÃO</b>	74

## 1. INTRODUÇÃO

Na natureza, em todos os seus habitats naturais, as plantas estão submetidas a variados inimigos potenciais, como grandes variedades de vírus, bactérias, fungos, ácaros, insetos, além de vários mamíferos. Uma vez que não conseguem se deslocar para evitar os herbívoros e patógenos, as plantas possuem outras estratégias de proteção (TAIZ; ZEIGER, 2004).

As plantas lançam mão da produção de diversas moléculas biologicamente ativas, dentre elas as lectinas, que são proteínas que possuem a capacidade de se ligar a carboidratos e se diferenciam pela especificidade ao carboidrato ligante, estrutura molecular e atividades biológicas. Elas são encontradas em vários organismos e, em plantas, são isoladas a partir da folha, entrecasca, raízes, rizomas, bulbos, vagens, sementes, frutos e flores (PAIVA et al., 2010). Tem sido demonstrado que lectinas de plantas interferem na alimentação, desenvolvimento, reprodução e sobrevivência de insetos em diferentes estágios de vida (PAIVA et al., 2012). O potencial biotecnológico de lectinas inseticidas tem sido ampliado para controle de insetos através da engenharia genética (SADEGHI et al., 2006).

*Sitophilus zeamais* Motschulsky, conhecido como gorgulho-do-milho, pertence à Ordem Coleoptera e à Família Curculionidae. Destaca-se como uma das principais pragas de grãos armazenados no Brasil por possuir uma grande capacidade de infestação cruzada, capacidade de penetração nos grãos e elevado número de hospedeiros, tanto das larvas como dos adultos causando danos aos grãos de milho, trigo, sorgo e arroz (GALLO et al., 1988, 2002). O controle dessa e de outras pragas de insetos de grãos armazenados tem sido realizado a partir de produtos químicos. Contudo, o uso indiscriminado desses produtos gera preocupação sobre a qualidade dos alimentos e a toxicidade sobre o meio ambiente e organismos não alvo, incluindo o homem. Dessa forma, novas técnicas de controles de pragas vêm sendo investigadas, como a utilização de inseticidas de origem vegetal (TAVARES; VENDRAMIM, 2005).

*Myracrodruon urundeuva* (Fr. All.) Engl. pertence à família da Anacardiaceae e é amplamente distribuída no Brasil, sendo conhecida popularmente como aroeira-do-sertão, aroeira-verdadeira, urundeúva entre outros. Apresenta inúmeras utilizações na medicina popular principalmente como anti-inflamatório e cicatrizante (LORENZI, 2008a; LORENZI, 2008b). A partir das folhas, casca e cerne de *M. urundeuva* foram isoladas três lectinas: MuLL (*M. urundeuva* leaf lectins), MuBL (*M. urundeuva* bark lectin) e MuHL (*M. urundeuva* heartwood lectin). MuLL, MuBL e MuHL apresentaram atividade inseticida contra cupins da

espécie *Nasutitermes corniger* e larvas de *Aedes aegypti* (SÁ et al., 2008, 2009b; NAPOLEÃO et al., 2011, 2012).

O presente trabalho analisou se extratos da casca e cerne de *M. urundeuva*, bem como as lectinas MuBL e MuHL purificadas apresentariam efeitos deletérios sobre os adultos de *S. zeamais*. O estudo contribui para ampliar o conhecimento do potencial inseticida de lectinas vegetais, bem como pela avaliação de um possível inseticida natural no combate dessa praga.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Mecanismos de defesa das plantas

Em todos os seus habitats naturais, as plantas estão submetidas a variados inimigos potenciais, como grandes variedades de vírus, bactérias, fungos, ácaros, insetos, além de vários mamíferos. As plantas não conseguem evitar os herbívoros e patógenos deslocando-se como fazem, por exemplo, muitos animais, mas possuem outros mecanismos de proteção (TAIZ; ZEIGER, 2004). Os danos ocasionados pelos microrganismos fitopatogênicos e insetos-praga variam com o hábito e dimensão da população do agente injuriador, partes da planta afetada, época do ataque (com relação ao estado de desenvolvimento da planta) e do grau de resistência da planta atacada (KOGAN, 1994; BEGON; TOWNSEND; HARPER, 2007).

Muitas vezes as plantas buscam compensar os danos ocasionados pelos herbívoros com modificações anatômicas e fisiológicas. Contudo, uma compensação completa é incomum, ocorrendo sempre algum tipo de prejuízo. Os herbívoros ao longo do tempo impuseram pressões de seleções evolutivas sobre os vegetais, os quais, por sua vez, promoveram uma variabilidade de defesas químicas e físicas com o intuito de sobreviver aos ataques (BEGON; TOWNSEND; HARPER, 2007). As reações às injúrias podem ocorrer em minutos, horas ou ser necessário uma nova estação de crescimento. As defesas que são mantidas sempre em altos níveis são consideradas defesas constitutivas. As defesas que são estimuladas por alguma injúria às estruturas vegetais, são denominadas de defesas induzidas (RICKLEFS, 2003).

Algumas das principais estratégias para minimizar os danos causados pelos herbívoros são: relações ecológicas com outras espécies, como a protocooperação; modificações morfológicas e fisiológicas; estratégias de fuga em dimensões espacial e temporal; e produção de moléculas de defesa constitutivas e compostos secundários tóxicos, que podem também atuar como substâncias químicas que dificultam a digestão das estruturas vegetais ingeridas (KENNEDY; BARBOUR, 1992; PINTO-COELHO, 2000).

Algumas modificações morfo-anatômicas encontradas nas plantas como estratégias contra a herbivoria são espinhos, acúleos, caules rígidos, tricomas e folhas coriáceas mais espessas ou mais lisas. Estratégias de modificações fisiológicas são encontradas como a produção de folhas, frutos e sementes com baixos índices nutricionais. Como estratégias de

fuga no tempo e espaço, têm-se como exemplos as plantas anuais e plantas com baixa densidade de espécimes, respectivamente (PINTO-COELHO, 2000).

Como mecanismos de defesas químicas estão presentes tanto substâncias do metabolismo primário como do secundário. Como exemplos do metabolismo primário podem-se destacar as proteínas de defesa. Alguns exemplos de proteínas de defesa são as lectinas, os inibidores de proteases, as glicohidrolases, as quitinases, as canatoxinas, as proteínas inativadoras do ribossomo (RIPs), as arcelinas e proteínas de reserva (CARLINI; GLOSSI-DE-SÁ, 2002; MACEDO et al., 2003).

Já o metabolismo secundário possui um grande acervo de substâncias de defesa: pela via dos terpenóides, originam-se saponinas, glicosídeos, lactonas monoterpênicas e lactonas sesquiterpênicas. Pela via dos compostos fenólicos encontram-se os taninos condensados, elagitaninos, isoflavonóides e flavonóides tóxicos. Na via dos produtos nitrogenados observam-se cianogênicos, alcalóides e aminoácidos não protéicos. A presença e associações dessas e outras substâncias permitem efeitos repelente, deterrente, inibidor de crescimento e biocida, entre outros. É importante ressaltar que um custo energético elevado está envolvido para que as plantas produzam essas substâncias de defesa (KENNEDY; BARBOUR, 1992; HARBORNE, 1993; PINTO-COELHO, 2000; RICKLEFS, 2003; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2004; CAVALCANTE; MOREIRA; VASCONCELOS, 2006).

Como resultante da co-evolução entre plantas e herbívoros, além das adaptações que coíbem a herbivoria, existem as respostas envolvidas na contra-adaptação por parte dos herbívoros, como pode ser observado em insetos (PINTO-COELHO, 2000; DESPRÉS; DAVID; GALLET, 2007).

## **2.2. Insetos-praga**

Insetos-praga são insetos que ocasionam grandes avarias e prejuízos às propriedades humanas, a produtos e recursos agrícolas, aos ecossistemas e à saúde humana e animal. Do ponto de vista econômico, o inseto só é uma praga agrícola para uma cultura quando seus níveis populacionais e seus danos potenciais superam o gasto que seria necessário para evitá-los (SALVADORI; LAU; PEREIRA, 2009). Buzzi (2005) estimou que existissem cerca de 90.000 espécies de insetos-praga no mundo e em torno de 500 espécies no Brasil, cujas pragas provocam prejuízos nas principais culturas agrícolas do mundo numa escala em torno de 2 a 28% da sua produção; já no Brasil as perdas são maiores, girando em torno de 7 a 79. Cerca

de 10% dos cereais armazenados no mundo são perdidos devido à infestação por insetos, enquanto que no Brasil os prejuízos podem chegar a 20%.

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. As pragas primárias internas possuem mandíbulas desenvolvidas para romper a película protetora dos grãos, penetrarem no interior da mesma 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 através do transporte de propágulos fúngicos (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. Controle populacional de insetos

### 2.3.1. Controle 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 provocam inúmeros danos à sociedade humana. 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; ser viável economicamente (ADDOR, 1994; MARCONI, 1963 *apud* VIEGAS JÚNIOR, 2003; COBERTT, 1984 *apud* VIEGAS JÚNIOR, 2003).

Desde a década de 40 do século passado, produtos naturais inseticidas vêm sendo usados na agricultura. Já 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. Chegado ao fim a Segunda Guerra, o uso militar dos organo-sintéticos se tornou ocioso, onde se aproveitou 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 atuando 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; antijuvenóides; 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).

### 2.3.2. Métodos de controle de pragas

Vários métodos são utilizados para o controle de pragas agrícolas. Métodos legislativos com utilização, por exemplo, de serviços quarentenários; métodos mecânicos como corte, esmagamento e catação; métodos de controle por comportamento utilizando hormônios, feromônios e esterilização de insetos; 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 homogeneamente 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.

### 2.4. Ordem Coleoptera

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; SLIPINSKI et al., 2011).

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 rosto, 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 ambulatoriais (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 oblecta (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).

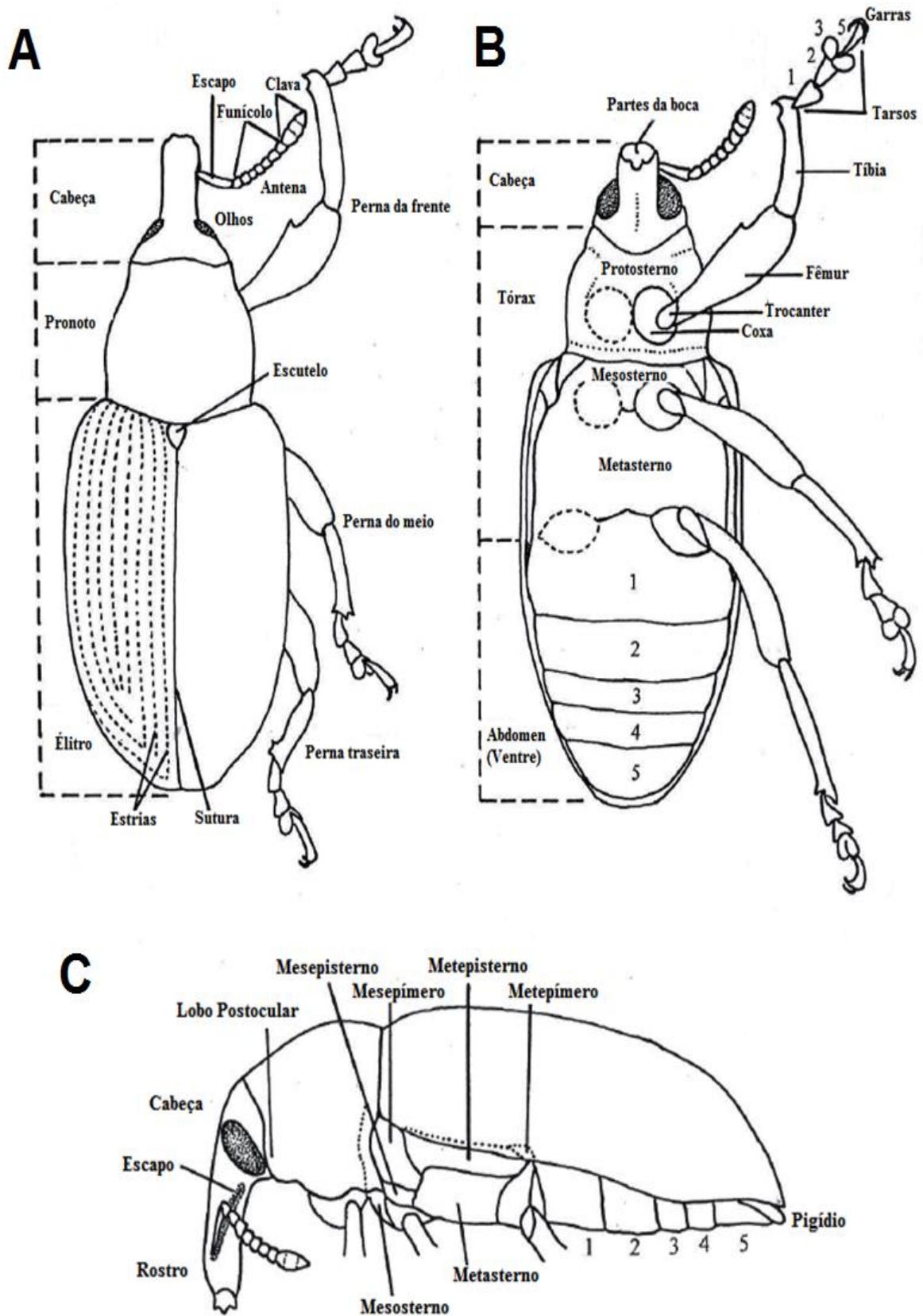
São encontrados em quase todos os tipos de habitats, aéreos, terrestres e semi-aquáticos. Alimentam-se de uma vasta gama de alimentos (fitófagos, predadores, micófagos, necrófagos, etc.) com exceção de sangue. Variados predadores e parasitas utilizam os coleópteros (ovos, larvas, adulto) como fonte de 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).

#### **2.4.1. Família Curculionidae**

A família Curculionidae pertence à Ordem Coleoptera. Os curculionídeos (Figura 1) representam a família mais numerosa do Reino Animal. As antenas são do tipo genículo-captadas ou genículo-clavadas, onde elas podem se articular no meio do rostro. O rostro é mais ou menos alongado, tendo a conformação reta ou curva e cilíndrica, voltada para baixo, possuindo também um sulco para a recepção do escapo antenal. A larva é do tipo ápoda curculioniforme. São fitófagos tanto nos estágios adultos quanto na fase larval. Comumente fazem postura endofítica (GALLO et al., 2002).

**Figura 1** - Morfologia geral dos Curculionidae. (A) vista dorsal; (B) vista ventral; (C) vista lateral.



Fonte: (A), (B), (C): adaptado de MARVALDI & LANTERI (2005).

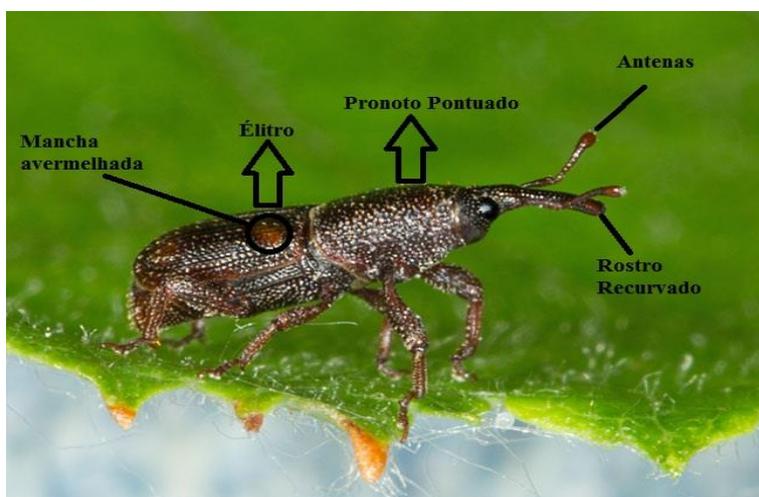
#### 2.4.2 *Sitophilus zeamais* (gorgulho do milho)

Os indivíduos da espécie *Sitophilus zeamais* pertencem à Família Curculionidae. Espécies do gênero *Sitophilus* são cosmopolitas de regiões tropicais que causam variados danos econômico-agrícolas, como o *Sitophilus oryzae* (arroz), *Sitophilus granaries* (trigo) e *Sitophilus zeamais* (milho) (FAZOLIN et al., 2010).

O inseto em seu estágio adulto atinge, em média, 3 mm de comprimento. Um dos fatores que permite a variação do comprimento corpóreo do inseto é sua dieta, podendo alcançar uma média de comprimento de 4,38 mm para dieta a base de milho e um comprimento de 3,17 mm em dieta a base de arroz descascado. Possui uma cabeça prolongada para frente, com a presença de um rostro recurvado, onde se encontram as peças bucais. O pronoto é intensamente pontuado e os élitros são veementes estriados. Sua coloração é castanho-escuro com a presença de quatro manchas avermelhadas nos élitros, que são visíveis após a emergência (Figura 2). Uma característica diferenciada entre machos e fêmeas pode ser notada observando os rostros. Os machos apresentam o rostro mais curto e grosso e as fêmeas o apresentam mais longo e afilado (Figura 3A) (GALLO et al., 2002)

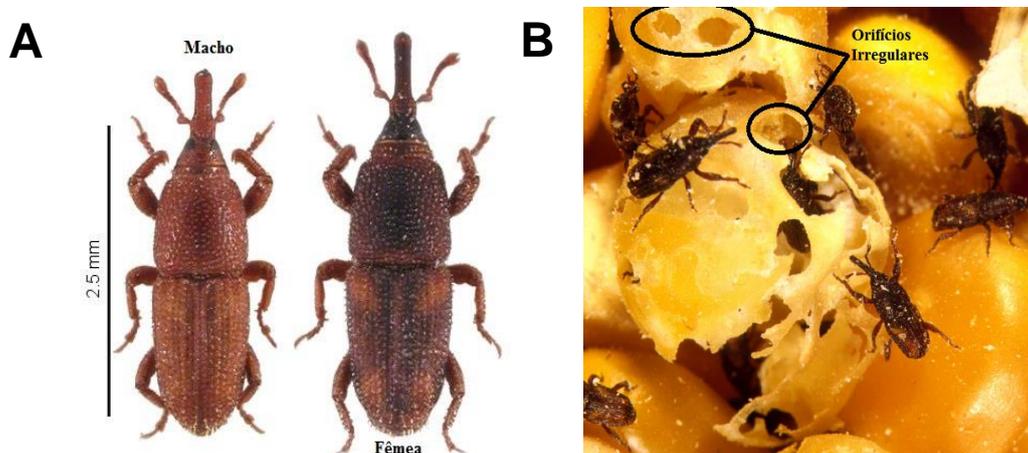
A larva tem coloração amarelo-clara apresentando uma cabeça mais escura e a pupa apresenta cor branca. As larvas passam por quatro estágios larvais antes de chegar à fase de pupa. Apenas uma larva se desenvolve em cada grão, mesmo que outros ovos tenham sido depositados (GALLO et al., 2002).

**Figura 2** - *Sitophilus zeamais*. Inseto adulto com partes corporais evidenciadas.



Fonte: adaptado de Fruška Gora (Susek), 2011.

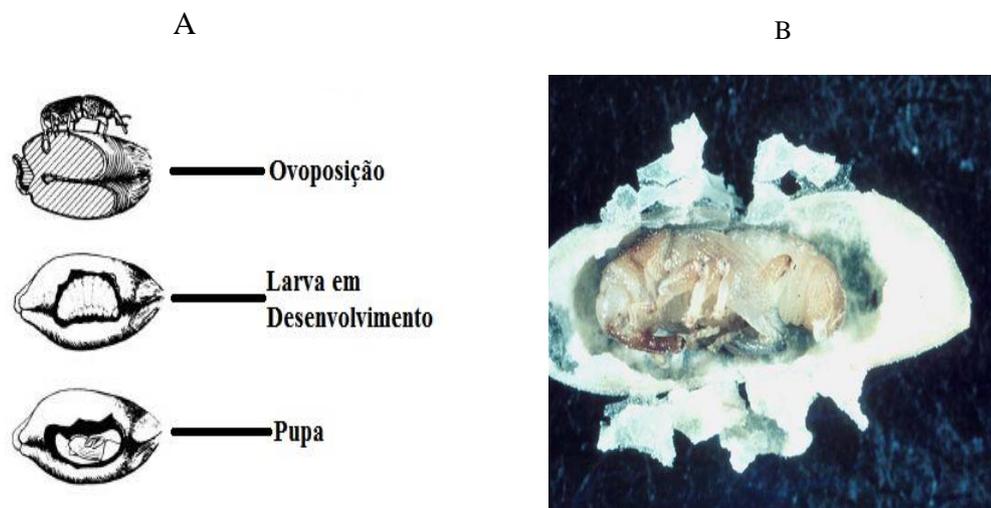
**Figura 3** - *Sitophilus zeamais*. (A) Inseto macho com o rostró curto e grosso e a fêmea com o rostró longo e afilado. (B) Infestação por gorgulhos com grãos de milho totalmente deteriorados. São evidenciados os orifícios irregulares produzidos pelos insetos.



Fontes: (A) © Jean-Claude Ringenbach. (B) [http://www.ica.ufmg.br/insetario/images/aulas/Pragas\\_de\\_produtos\\_armazenados.pdf](http://www.ica.ufmg.br/insetario/images/aulas/Pragas_de_produtos_armazenados.pdf)

Os adultos de *S. zeamais* apresentam comportamento de postura diferenciado. No milho em palha, colocam os ovos nas partes rígidas do grão que ficam à mostra; entram em grãos já atacados e colocam ovos nos grãos vizinhos, em componentes do embrião ou pelo menos próximo. Já nos grãos que foram debulhados, o inseto deposita preferencialmente nas extremidades do grão. Os orifícios presentes nos milhos apresentam bordos irregulares (Figura 3B), diferentemente de outras espécies que o fazem regularmente. Após a penetração do grão pelas fêmeas para oviposição elas selam o orifício com uma secreção produzida por glândulas associadas ao sistema ovipositor (Figura 4A). Os adultos se alimentam dos grãos, enquanto as formas imaturas os utilizam como fonte alimentar e de proteção e abrigo (Figura 4B). Após ter completado parte do seu ciclo biológico dentro do grão o adulto emerge e cresce, desenvolvendo maturidade sexual com posterior início do ciclo. A Tabela 1 apresenta alguns parâmetros biológicos do *S. zeamais* (MACELISKI; KORUNIC, 1973; GALLO et al., 2002; BOTTON et al., 2005; ANTUNES; DIONELLO, 2010).

**Figura 4** - *Sitophilus zeamais*. (A) Fêmea ovipositando, com posterior desenvolvimento larval e formação da pupa. (B) Fotografia evidenciando a pupa em grão de arroz.



Fonte: (A) <http://foodqualityandsafety.wfp.org/types-of-insect-pests> (B)

<http://www.ozanimals.com/Insect/Greater-Rice-Weevil/Sitophilus/zeamais.html>

**Tabela 1** - Parâmetros biológicos da espécie *Sitophilus zeamais*.

Parâmetros Biológicos	Dados
Período médio de pré oviposição	6 dias
Número médio de ovos por fêmeas	282,2
Período médio de oviposição	104 dias
Número médio de ovos por fêmea/dia	3
Longevidade média das fêmeas	140 dias
Longevidade média dos machos	142 dias
Período médio de ovo a emergência do adulto	34 dias
Incubação	3-6 dias
Viabilidade ovo-adulto	26,9%
Razão sexual	0,5
Número médio de gerações/ano	8

Fonte: Gallo et al. (1988, 2002)

O *S. zeamais* é uma praga do tipo primária interna, cuja mandíbula rompe as películas protetoras dos grãos. Devido à presença dos élitros e uma dimensão diminuta eles possuem a capacidade de circular nos pequenos espaços entre os grãos armazenados, tendo acesso a grãos em localizações profundas, fortemente comprimidos. Fazendo uma projeção de 26,9% de viabilidade de uma média de 282,2 ovos por oito gerações sucessivas se obtêm, teoricamente, um estrondoso número de 29.687.500 indivíduos, o que demonstra que o *S. zeamais* possui um elevado potencial biótico. Além disso, ele apresenta a capacidade de infestação cruzada, atacando produtos tanto nos armazéns e depósitos quanto nas lavouras agrícolas. Como são capazes de voar, infestam agilmente as espigas em plantios agrícolas e nos estabelecimentos de armazenamento. O gorgulho do milho é polifágico, ou seja, possui a capacidade de se alimentar de vários produtos como milho (ocorrência marcante), amendoim, arroz, sorgo, soja, trigo, cevada, aveia, pêssegos, maçã, marmelo e ameixa além de produtos processados como macarrão e biscoitos. Ensaios comprovaram que o *S. zeamais* em uma infestação natural provocou uma perda de peso (danos qualitativos) na ordem de 50-80% durante seis meses de alimentação de grãos de milhos. Além disso, quando a perda de peso causada aos grãos é maior que 25,9% o valor nutricional do milho torna-se insignificante. Os gorgulhos associados com outras pragas de grãos armazenados podem resultar numa perda em torno de 20-30% da produção de milho (GALLO et al., 2002, 1988; BOTTON et al., 2005; BUZZI, 2005; ANTUNES; DIONELLO, 2010; FAZOLIN et al., 2010; TEFERA et al., 2011).

Os inseticidas triclorfon, fention, clorpirifós, malation, metidation e tiametoxam são eficientes no controle via contato residual enquanto que fention, clorpirifós, malation, fenitrothion e metidation são eficientes via contato direto (BOTTON et al., 2005; PEREIRA et al., 2009; BRAGA et al., 2011). Contudo, as estratégias de controle do *S. zeamais* têm acarretado inúmeros prejuízos principalmente pelo efeito a organismos que não são alvos e ao próprio homem. Além disso, é descrito na literatura caso de resistência do *Sitophilus* a alguns inseticidas como Malation, Lindane, deltametrina e fosfinas (PEREZ-MENDOZA, 1999).

Um estudo realizado por Nakatika e Ikenaga (1997) relata que para a utilização da temperatura com intuito de erradicar os gorgulhos do milho em ambientes armazenados é necessário manter valores abaixo de 15°C. Tanto a eclosão como a metamorfose foram completamente inibidas a 10°C. Outro trabalho realizado por Potrich (2006) revela que associando variedades resistentes de milho e fungos entomopatogênicos pode-se aumentar a

duração do ciclo ovo-adulto, reduzir os números de insetos emergidos e a diminuir a perda de peso dos grãos. Outros estudos alternativos aos inseticidas/repelentes estão sendo desenvolvidos como aplicação do pó da folha de *Eucalyptus citriodora*, que promove um índice de 96% de repelência dos *S. zeamais*, e o pó da *Chenopodium ambrosioides*, que causa mortalidade total (PROCÓPIO et al., 2003). A exposição tópica e fumigação dos óleos essenciais das espécies *Piper hispidinervum* e *Piper aduncum* promoveram uma taxa de mortalidade acima dos 70% dos insetos (ESTRELA et al., 2006). A lectina MuLL apresentou efeito deterrente e foi de afetar os parâmetros nutricionais de adultos *S. zeamais*, além de interferir na atividade de enzimas digestivas (NAPOLEÃO et al., 2013).

## 2.5 Família Anacardiaceae

A família Anacardiaceae pertence à ordem Sapindales, classe Magnoliopsida, divisão Magnoliophyta e ao reino Plantae. Sua distribuição é pantropical, possuindo algumas espécies nas regiões temperadas. Apresenta em torno de 70 gêneros e 700 espécies e, no Brasil, estão presentes 15 gêneros e cerca de 70 espécies. O gênero com maior número de espécies é o gênero *Rhus* que possui em torno de 100 espécies (JUDD et al., 2002; LORENZI, 2008a; CHASE; REVEAL, 2009).

As plantas da família Anacardiaceae são geralmente do porte arbustivo ou arbóreo. As folhas frequentemente são alternas compostas, ou menos abundantemente, simples. Não possuem estípulas e apresentam margem inteira ou serrada. As inflorescências são normalmente do tipo cimosa. Suas flores são pouco vistosas, em sua maioria unissexuada, actinomorfas e diclamídeas, com cálice e corola pentâmeros. Tanto as pétalas quanto as sépalas podem ser separadas (diali) ou fusionadas (gamo) e a prefloração de ambas é valvar ou imbricada. As anteras são cimosas e ovários gamocarpelares (1-12 carpelos), geralmente súperos e com a presença de apenas um lóculo fértil. Apresentam disco nectarífero e placentação do tipo ereta ou pêndula e lóculos uniovulados. Os frutos encontrados são do tipo drupa ou sâmara, e são geralmente dispersos por aves e vários mamíferos, incluindo morcegos. A polinização ocorre por intermédio de insetos (polinização entomófila). Geralmente apresentam taninos e ductos de resina ou canais de látex que podem estar presente nas folhas, flores e frutos. Essas resinas podem desencadear reações alergênicas (CRONQUIST, 1981; JUDD et al., 2002; LORENZI, 2008a).

As anacardiáceas possuem variadas importâncias econômicas e socioculturais com representantes no setor de alimentação, industrial, ornamental, condimentício, madeireiro e medicinal (BARROSO, 1991). Como representante do setor alimentício pode-se citar o caju - *Anacardium occidentale*; manga - *Mangifera indica*; cajá - *Spondias* sp.; umbu - *Spondias tuberosa*; e seriguela - *Spondias purpurea* (LORENZI, 2008a). Do setor medicinal pode-se evidenciar o gênero *Toxicodendron* e *Metopium*, que promove dermatite em indivíduos susceptíveis ao composto fenólico 3-n-pentadecatecol, presente na resina. É sabido ainda que a castanha de caju, embora comestível, pode promover reações alérgicas (JUDD et al., 2002). Contudo, efeitos benéficos também são constatados como a casca da espécie *Sclerocarya birrea*, que possui atividade antiinflamatória (OJEWOLE, 2003). A casca da espécie *Rhus chiridensis* que apresenta atividade hipoglicemiante e analgésica (OJEWOLE, 2007).

Outras propriedades também são encontradas como efeito antimicrobiano da *Amphipterygium adstrigens*, atividade inseticida da *Schinus molle* contra variados insetos como a mosca (*Musca domestica*), larvas de *Cydia pomonella* e besouro (*Tribolium castaneum*) (WIMALARATNE et al., 1996; CHIRINO; CARIACY; FERRERO, 2001; CASTILLO-JUAREZ et al. 2007; FERRERO et al., 2007). Como exemplo de espécies no setor madeireiro de qualidade pode-se citar a aroeira (*Myracrodruon urundeuva*), a aroeira-branca (*Lithraea molleoides*), braúna (*Schinopsis brasiliensis*), Gonçalves-Alves (*Astronium fraxinifolium*) e guaritá (*Astronium graveolens*). Além de espécies ornamentais como aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius*), o charão (*Rhus succedanea*) e a aroeira-salsa (*Schinus molle*) (LORENZI, 2008a).

### **2.5.1 *Myracrodruon urundeuva* (aroeira do sertão)**

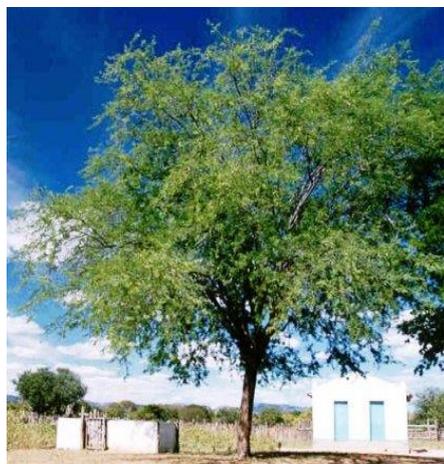
A espécie *Myracrodruon urundeuva* (Figura 5A) foi descrita por Francisco Allemão e Cysneiro no ano de 1862, pertencendo à Família Anacardiaceae e ao clado das angiospermas. Possui como sinônimas botânicas *Astronium urundeuva* (Allemão) Engl. e *Astronium juglandifolium* Griseb. Tem ocorrência relatada desde o México a Argentina (BARKLEY, 1968; GARRIDO; POGGIANI, 1979; LORENZI, 2008a). Ao longo de todo o território nacional diversos nomes são atribuídos à mesma espécie como urundeúva ou aroeira verdadeira, aroeira, aroeira do sertão, aroeira do campo, aroeira da serra, aroeira preta, entre outros nomes. O termo aroeira faz alusão (corruptela) ao termo “arara” e “eira” que tem por

significado a expressão “árvore da arara”. O epíteto específico, urundeúva, provem do tupi-guarani que corresponde a expressão “não se deteriora na água” (ALMEIDA-CORTEZ et al., 2007; LORENZI, 2008a).

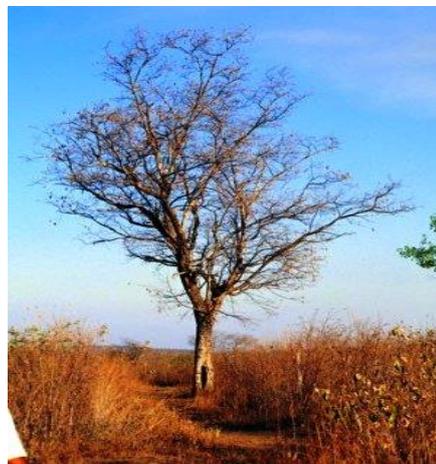
A aroeira apresenta uma ampla distribuição no território nacional brasileiro. Encontra-se desde a região da Caatinga do Ceará até os estados do Paraná e Mato Grosso do sul. Seu predomínio ocorre na região nordestina, na região oeste dos estados da Bahia, Minas Gerais e São Paulo e na região sul dos estados do Mato Grosso, Mato Grosso do sul e Goiás. É uma planta decídua (Figura 5B), que se desenvolve bem com grande intensidade luminosa (heliófita). Não se tem dados suficientes que comprovem que a aroeira exige solos ricos em nutrientes, mas relatou-se a presença de forma razoável em luvisolos (solos ricos) do nordeste e nos solos mais ricos do sudoeste. O nível de pH elevado do solo se mostrou ser um importante fator para o sucesso da espécie, como ocorre em solos com afloramentos calcários, atingindo o tamanho máximo. A aroeira consegue sobreviver por períodos extensos sem umidade como ocorre na região semiárida do nordeste, mas o seu tamanho é diretamente proporcional à disponibilidade de recursos hídricos. Encontrado a partir da região da caatinga onde passa pelo cerrado até as regiões de florestas pluviais. Geralmente ocorrem em agrupamentos densos, tanto em formações abertas, como a Caatinga, quanto nas formações fechadas como as florestas pluviais (GARRIDO; POGGIANI, 1979; FAO, 1986; MUÑOZ, 1990; LEITE, 2002; LORENZI, 2008a).

**Figura 5** - *Myracrodruon urundeuva*. (A) planta inteira; (B) árvore sem folhas

**A**



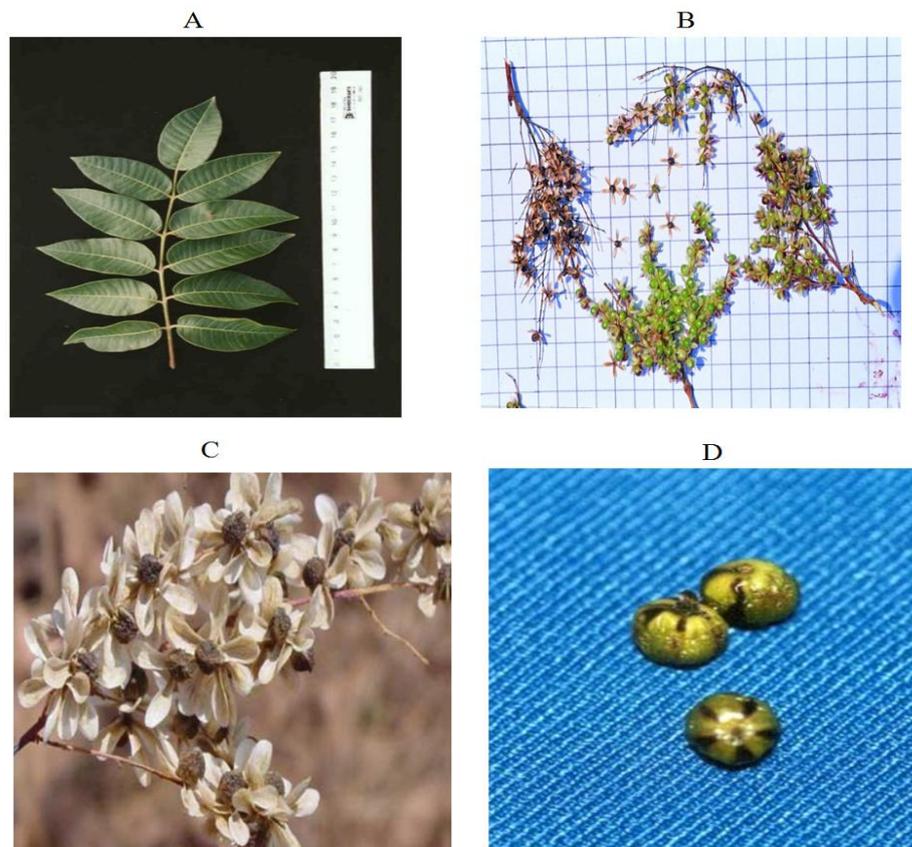
**B**



Fonte: CNIP/APNE.

Geralmente a aroeira apresenta uma altura que vai de 6 a 14 m nos biomas do Cerrado e da Caatinga e tendo seu tamanho máximo nas florestas latifoliadas semidecíduas atingindo de 20 a 25 m de altura. O diâmetro do tronco pode variar de 15 a 100 cm, mas geralmente estão em torno de 50 a 80 cm. O seu tronco é reto e cilíndrico. As folhas são compostas do tipo imparipenada (Figura 6A), com 10 a 30 cm de comprimento, ápice levemente acuminado, base suavemente oblíqua, consistência coriácea e borda serrada. A inflorescência (Figura 6B) são panículas terminais, que possuem flores amarelas, em ramos sem folhas. As flores (Figura 6C) são unissexuadas, hipóginas e pentâmeras, com sépalas persistentes, permanecendo ao redor do fruto. O fruto (Figura 6D) são pequenas drupas globosas com 3 a 4 mm de diâmetro (FAO, 1986; LÓPEZ, 1987; LEITE, 2002; LORENZI, 2008a).

**Figura 6** - *Myracrodruon urundeuva*. (A) Folha. (B) Inflorescência com frutos verdes e maduros. (C) Flores. (D) Frutos.

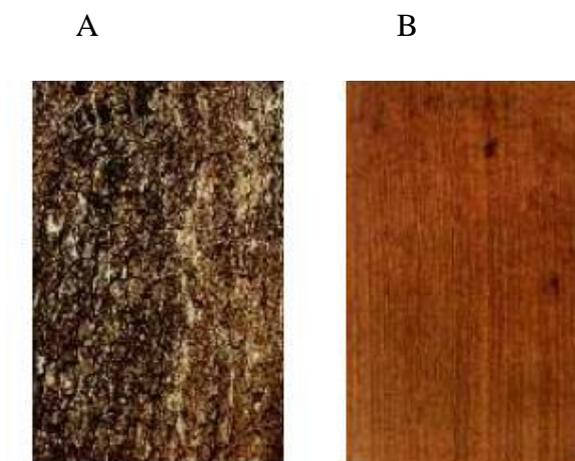


Fonte: CNIP/APNE

O período de floração, em geral, vem após a queda das folhas (abscisão foliar), que ocorre dentre os meses de novembro e janeiro. A abelha *Trigona spinipes* foi descrita como o agente polinizador e a semente possui como o agente dispersor o vento (dispersão anemocórica). A dormência da semente varia de acordo com as variedades da aroeira e as condições do local de germinação, podendo ocorrer após 4 a 7 dias ou até duas semanas depois (LEITE, 2002).

A casca da aroeira possui uma tonalidade de marrom-escuro (Figura 7A) com escamas no tronco dos indivíduos mais velhos e lisos nos mais jovens (RIZZINI, 1978). A madeira (Figura 7B) é muito pesada e densa (densidade de 1,19 g/cm<sup>3</sup>) possui uma alta resistência mecânica e praticamente imputrescível. A madeira é resistente a biodegradação sendo então muito utilizada para obras externas e na construção civil na forma de mourões, postes, estacas, vigas, dormentes, tacos para assoalhos, armações de pontes entre outros. Também é utilizado na construção naval e hidráulica, além da produção de carvão vegetal. (LÓPEZ, 1987; MORAIS, NASCIMENTO; QUEIROZ, 1999; LORENZI, 2008a).

**Figura 7** - *Myracrodruon urundeuva*. (A) casca; (B) madeira.



Fonte: Lorenzi (2008a).

A árvore também é utilizada como planta ornamental, pois tem aparência bela e copa piramidal, além de ser recomendada para arborização em geral (LORENZI, 2008a). Outras características também são observadas, como suas propriedades medicinais como nas atividades antiulcerogênica e anticolinérgica (MENEZES; RAO; FONTELES, 1986), anti-inflamatória (RAO et al., 1986), atividade antidiarréica e analgésica (ALMEIDA-CORTEZ et

al., 2007) e taninos com ação analgésica e anti-inflamatória (VIANA et al., 1997). Possivelmente a árvore pode ocasionar reações alérgicas em indivíduos sensíveis (LORENZI, 2008a). Além desses potenciais medicinais a aroeira também apresenta lectinas e outras substâncias que podem ser utilizadas no controle biológico cupins (NAPOLEÃO et al., 2011), larvas de *Aedes aegypti* (SÁ et al., 2009b), bem como no combate a bactérias de importância médica e fungos fitopatogênicos (SÁ et al., 2009a).

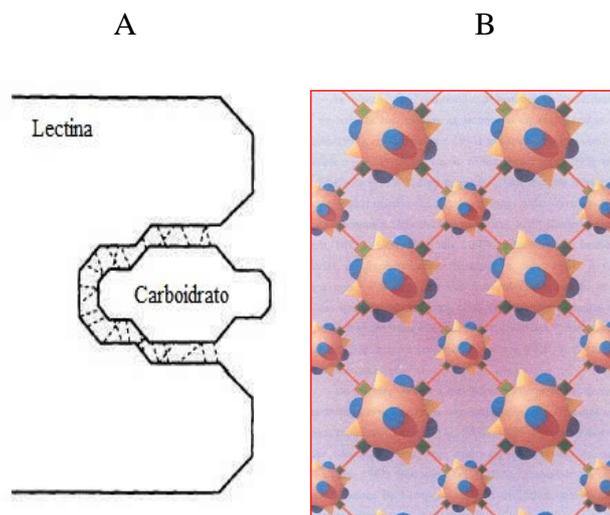
Devido à destruição do seu habitat (cerrado e cantiga) e a grande exploração madeireira, a aroeira é uma das espécies de plantas lenhosas que está ameaçada. Uma vez que a aroeira tem se mostrado importante na produção de fármacos, na utilização da madeira e em tantas outras aplicabilidades biotecnológicas, essa espécie necessita de medidas de conservação. Sendo assim, estudos vêm sendo feitos com intuito de acumular informações sobre a biologia, ecologia e manejo e silvicultura da aroeira do sertão, buscando manter sua conservação genética e sua sustentabilidade. No Brasil ela se encontra ameaçada, principalmente devido à falta informações sobre a biologia reprodutiva e pela falta de medidas e ações dos órgãos competentes (LEITE, 2002; OLIVEIRA et al., 2007).

## 2.6 Lectinas

### 2.6.1 Lectinas e suas fontes

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas que possuem a capacidade de se ligar especificamente a carboidratos (Figura 9A), daí que surgiu o termo *lectina* que provém do latim “lectus” cujo significado é “selecionado”. Interagem com variados tipos celulares sendo, inclusive, capazes de induzir aglutinação devido à ligação com os glicoconjugados presentes nas superfícies celulares (Figura 9B). A origem das lectinas não é imunológica, o que as diferencia dos anticorpos, que também têm a capacidade de reconhecerem e aglutinarem células. As lectinas fazem parte do grupo de proteínas de plantas que possuem atividade inseticida (GOLDSTEIN et al., 1980; KENNEDY et al., 1995; PEUMANS; VAN DAMME, 1995; SHARON; LIS, 2002).

**Figura 8.** Lectinas. (A) Desenho esquemático da ligação lectina-carboidrato. As linhas pontilhadas estão representando pontes de hidrogênio. (B) Representação esquemática da aglutinação celular promovida pelas lectinas. Lectina (  ) interagindo com seus ligantes da superfície celular (  ) onde os ligantes podem ser carboidratos ou não.



Fonte: A e B Kennedy *et al.* (1995).

As lectinas são encontradas em variados tipos de organismos, desde vírus até plantas e animais, incluindo os seres humanos, atuando na mediação de eventos de reconhecimento biológico (RINI, 1995). Em plantas elas tem sido detectadas em diversas partes como folhas (GOMES *et al.*, 2010), sementes (CARVALHO *et al.*, 2015), frutos (WEARNE; WINTER; GOLDSTEIN, 2012), flores (SANTOS *et al.*, 2009), raízes (SOUZA *et al.*, 2011), rizomas (SANTANA *et al.*, 2012), casca (ARAÚJO *et al.*, 2012) e cerne (SÁ *et al.*, 2008).

### 2.6.2 Métodos de purificação

Para o isolamento e caracterização das lectinas são necessárias várias etapas. A primeira é a extração de proteínas em água, solução salina ou tampão. A detecção de lectinas é efetuada pelo o ensaio de hemaglutinação, em que se evidencia a presença de agentes com capacidade de aglutinar os eritrócitos (PAIVA; COELHO, 1992; FREIRE *et al.*, 2002). Variados agentes químicos podem interferir na atividade hemaglutinante, como taninos e lipídeos, os quais promovem a dispersão dos eritrócitos, gerando um falso positivo para a

presença de proteínas hemaglutinantes. Sendo assim é essencial a realização de ensaios de inibição da aglutinação na presença de monossacarídeos ou glicoproteínas. Nesse caso, os sítios de reconhecimento de carboidratos das lectinas serão ocupados pelos carboidratos livres em solução e não poderão interagir com os açúcares das superfícies celulares, ocorrendo a precipitação dos eritrócitos (KENNEDY et al., 1995; CAVADA et al., 1998; KAWAGISHI et al., 2001).

Após a etapa de extração e da constatação da presença de lectina, o extrato pode ser submetido à etapa do fracionamento salino, que concentra as proteínas e realiza uma purificação parcial (COELHO; SILVA, 2000). Posteriormente ao fracionamento, realiza-se a diálise exaustiva de cada fração (KABIR et al., 1998) para eliminação do sal e de outros possíveis contaminantes. Em seguida variadas técnicas cromatográficas poderão ser utilizadas como as de exclusão molecular (separação pelo tamanho das proteínas), troca iônica (separação pelas cargas) e a de afinidade (separação por afinidade pela matriz da coluna). Para a caracterização estrutural das proteínas e determinação do seu grau de pureza se pode utilizar a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) que evidenciará a quantidade de proteínas presentes e sua carga líquida; PAGE em condições desnaturante e/ou redutora dissocia a proteína em suas subunidades. A utilização do reagente de Schiff permite identificar se a proteína se trata de uma glicoproteína ou não através da coloração no gel (PAIVA; COELHO, 1992; KENNEDY et al., 1995; COELHO; SILVA, 2000; PAIVA et al., 2006; PAIVA et al., 2011).

### **2.6.3 Funções e aplicações biológicas**

Diversas importâncias biológicas têm sido atribuídas as lectinas. Nas plantas, tem se observado ação defensora contra microrganismos patógenos 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. Desta forma interferem nas funções de enzimas digestivas e proteínas assimilatórias dificultando a digestão e a absorção de nutrientes (COELHO; MARANGONI; MACEDO, 2007; OLIVEIRA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2015).

A maioria dos grupos de insetos, exceto Hemiptera e Homoptera, apresenta uma membrana presente no intestino médio chamada matriz peritrófica (BANDYOPADHYAY et al., 2001; DAMASCENO-SÁ; SILVA, 2007). Essa membrana é formada por um polímero de N-acetilglicosamina (quitina) e glicoproteínas. Sua função é de compartimentalizar os processos digestivos além de promover a proteção contra infecções microbianas e danos mecânicos ocasionados por partículas alimentares (TELLAM; WIJFFELS; WILADSEN, 1999; HEGEDUS et al., 2009). As lectinas de plantas que apresentam afinidade por N-acetilglicosamina são capazes de se ligar a quitina e proteínas glicosiladas da matriz peritrófica, ocasionando alteração da dinâmica dos processos digestivos e da absorção de nutrientes (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; ZHU-SALZMAN et al., 1998; ZHU-SALZMAN; SALZMAN, 2001; CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002; MACEDO et al., 2004; MACEDO et al., 2007). As lectinas ainda podem penetrar no sistema circulatório de insetos interferindo nas moléculas de autodefesa encontradas na hemolinfa (FITCHES et al., 2001).

#### **2.6.4 Lectinas de *M. urundeuva***

Lectinas foram isoladas de diferentes tecidos de *M. urundeuva*: folha (MuLL, do inglês *M. urundeuva leaf lectin*), entrecasca (MuBL, do inglês *M. urundeuva bark lectin*) e cerne (MuHL, do inglês *M. urundeuva heartwood lectin*). MuLL é uma glicoproteína básica, termoestável, com massa molecular de 14,2 kDa e afinidade por glicoproteínas, que

apresentou ação inseticida contra larvas de *Aedes aegypti*, termiticida contra cupins *Nasutitermes corniger* e forte ação deterrente contra o *Sitophilus zeamais*. MuLL ainda se mostrou capaz de intervir na sobrevivência de bactérias simbiotes do trato digestivo dos cupins, além de interferir nas atividades enzimáticas digestivas das larvas de *A. aegypti* e adultos de *S. zeamais* (NAPOLEÃO et al., 2011, 2012, 2013).

As lectinas MuBL e MuHL, avaliadas neste trabalho, também apresentaram atividade inseticida contra cupins da espécie *N. corniger* e larvas de *A. aegypti* (SÁ et al., 2008, 2009b; NAPOLEÃO et al., 2011). A MuBL é uma proteína básica, termoestável, que apresenta uma massa molecular de 14,0 kDa. A lectina MuHL também é básica e termoestável, com peso molecular de 14,4 kDa. Ambas apresentam afinidade pelo monossacarídeo *N*-acetilglicosamina. MuHL também apresentou ação inibitória do crescimento de bactérias de importância médica e de espécies fúngicas do gênero *Fusarium* (SÁ et al., 2009a).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

- Analisar o efeito de extratos e lectinas isoladas da entrecasca (MuBL) e do cerne (MuHL) de *Myracrodruon urundeuva* sobre a sobrevivência, parâmetros nutricionais e atividade de enzimas digestivas de adultos de *Sitophilus zeamais*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Obter extratos salinos da entrecasca e do cerne de *M. urundeuva*.
- Isolar as lectinas da entrecasca (MuBL) e do cerne (MuHL) de *M. urundeuva*, seguindo procedimentos pré-estabelecidos.
- Avaliar a toxicidade por ingestão de dieta artificial contendo extrato ou lectina contra *S. zeamais*.
- Determinar o índice de deterrência alimentar das dietas contendo extrato ou lectina.
- Calcular parâmetros nutricionais (taxa relativa de ganho de biomassa, taxa de consumo relativo e eficiência de conversão do alimento ingerido) de adultos de *S. zeamais* que ingeriram dieta artificial contendo extrato ou lectina.
- Obter extratos de intestino de *S. zeamais* alimentados ou não com extrato ou lectina e avaliar as atividades de proteases,  $\alpha$ -amilase, celulasas (endoglucanase, exoglucanase e  $\beta$ -glicosidase) e fosfatases ácidas e alcalinas.

#### 4. REFERÊNCIAS

- ADDOR, R.W. Insecticides. In: GODFERY, C.R.A. (ed.). **Agrochemicals from natural products**. New York: Marcel Dekker Inc., p. 1-62, 1994.
- ALMEIDA-CORTEZ, J.S. et al. **Caatinga**. Coleção Biomas do Brasil. 1ª ed. São Paulo: Harbra, 2007.
- ANTUNES, L.E.G.; DIONELLO, R.G. **Bioecologia de *Sitophilus zeamais* Motschulsky 1885 (Coleoptera: Curculionidae)**. 2010. Artigo em hipertexto. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2010\\_2/Sitophilus/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2010_2/Sitophilus/index.htm)>. Acesso em: 30/06/2015.
- ARAÚJO, R.M.S. et al. *Crataeva tapia* bark lectin is an affinity adsorbent and insecticidal agent. **Plant Science**, v. 183, p. 20-26, 2012.
- BANDYOPADHYAY, S.; ROY, A.; DAS, S. 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.
- BARKLEY, F. A. Anacardiaceae: Rhoideae: *Astronium*. **Phytologia**, v. 16, p. 107–152, 1968.
- 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.
- BARROSO, G.M. et al. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. v.2, 1.ed. Minas Gerais: Ed. Imprensa Universitária, 1991.
- BEGON, M.; TOWNSEND, C.R.; HARPER, J.L. **Ecologia: de indivíduos a ecossistemas**. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- BORROR, D.J. **Borrer and DeLong's: Introduction to the study of insects**. 7ª ed. Australia: Thomson, Brooks/Cole, 2005.
- BOTTON, M. et al. **O gorgulho do milho *Sitophilus zeamais* (Coleptera: Curculionidae) como praga em frutíferas de clima temperado**. Circular Técnica n° 58. Bento Gonçalves: Embrapa, 2005.
- BRAGA, L.S. et al. Face or flee? Fenitrothion resistance and behavioral response in populations of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Journal of Stored Products Research**, v. 47, p. 161-167, 2011.
- BUZZI, Z. J. **Entomologia didática**. 4. ed. Curitiba: Editora UFPR, 2005.
- 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.
- CARLINI, C.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potential as bioinsecticides. **Toxicon**, v.40, p. 1515-1539, 2002.

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

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

CASTILHO-JUAREZ, I. Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n.1, p. 72-77, 2007.

CAVADA, B.S. et al. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke. **Phytochemistry**, v.49, n.3, p. 675-680, 1998.

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.

CHASE, M.W.; REVEAL, J.L. A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 161, p.122–127, 2009.

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.

CHIRINO, M.; CARIACY, M.; FERRERO, A.A. Actividad insecticida de extractos crudos de drupas de *Schinus molle* L. (Anacardiaceae) sobre larvas neonatas de *Cydia pomonella* L. (Lepdoptera: Tortricidae). **Boletín de Sanidad Vegetal. Pragmas**, v.27, n.3, p. 305-314, 2001.

COELHO, L.C.B.B.; SILVA, M.B.R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical Analysis**, v. 11, p. 295-300, 2000.

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 Part C, Toxicology and Pharmacology**, v. 146, p. 406-414, 2007.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981.

DAMASCENO-SÁ, J.C.; SILVA, J.C. Evolução e aspectos do sistema digestório em Hemiptera. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, p. 32-40, 2007.

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

DESPRÉS, L.; DAVID, J.; GALLET, C. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemical. **Trends in Ecology and Evolution**, v.22, n.6, p. 298-307, 2007.

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

ESTRELA, J.L.V. et al. Toxicidade de óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* em *Sitophilus zeamais*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 217-222, 2006.

FAO. Databook on endangered tree and shrub species and provenances. **FAO Forestry Paper**, v. 77. Roma: FAO, 1986.

FAZOLIN, M. et al. Fumigação de milho para o controle do gorgulho utilizando caule de *Tanaecium nocturnum* (Bignoniaceae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, p. 1-6, 2010.

FERRERO, A.A. et al. Repellence and toxicity of *Schinus molle* extracts on *Blattella germanica*. **Fitoterapia**, v.78, p. 311-314, 2007.

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.

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.

FREIRE, M.G.M. et al. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.40, p. 61-68, 2002.

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.

GALLO, D. et al. **Manual de entomologia agrícola**. 2ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1988.

GARRIDO, M.A.O.; POGGIANI, F. Características silviculturais de cinco espécies indígenas plantadas em povoamentos puros e misto. **Silvicultura em São Paulo**, v. 13, p. 33-48, 1979.

GOLDSTEIN, I.J. et al. What should be called a lectin? **Nature**, v.255, p. 66-69, 1980.

GOMES, F. S. et al. Isolation and Antimicrobial Activity of Lectin from *Schinus terebinthifolius* Leaves. **Journal of Biotechnology**, v. 50, p. 453-453, 2010.

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.

HARBORNE, J.B. **Introduction to Ecological Biochemistry**. 4a ed. London: Academic Press, 1993.

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.

HEGEDUS, D.D. et al. Peritrophic matrix synthesis, architecture and function: new insights. **Annual Review of Entomology**, v. 54, p. 285–302, 2009.

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

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.

JUDD, W.S. et al. **Plant systematics: a phylogenetic approach** . 2<sup>a</sup> ed. Sinauer Associates, 2002.

KABIR, S. Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications in immunobiological research. **Journal of Immunological Methods**, v.212, p.193-211, 1998.

KAWAGISHI, H.I. et al. Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Mycoleptodonoides aitchisii*. **Phytochemistry**, v.56, n.1, p.53-58, 2001.

KENNEDY, G.G.; BARBOUR, J.D. Resistance variation in natural and managed systems. In: FRITZ, R. S.; SIMMS, E. L. (eds.). **Plant Resistance to herbivores and pathogens**. Chicago: The University of Chicago Press, p. 13-41, 1992.

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

KOGAN, M. Plant resistance in pest management. In: METCALF, R. L.; LUCKMANN, W. H. **Introduction to insect pest management**. New York: Wiley-Interscience Publication, p. 103-146, 1994.

LEITE, E.J. State-of-knowledge on *Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão (Anacardiaceae) for genetic conservation in Brazil. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 5, p. 193-206, 2002.

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.

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

LÓPEZ, J.A. **Árboles comunes del Paraguay**. Ñande Yvirá Mata Kuera. Asunción: Cuerpo de Paz, 1987.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 5.ed. Nova Odessa, São Paulo, Instituto Plantarum, 2008a.

LORENZI, H.; ABREU MATOS, F.J. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2.ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008b.

MACEDO, M.L.R. et al. 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, Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, p. 486-498, 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**, v. 56, p. 84-96, 2004.

MACEDO, M.L.R. et al. Purification and characterization of an N-acetylglucosamine-binding lectin from *Koelreuteria paniculata* seeds and its effect on the larval development of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) and *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2980-2986, 2003.

MACELISKI, M.; KORUNIC, Z. Contribution to the morphology and ecology of *Sitophilus zeamais* motsch. In Yugoslavia. **J. stored Prod. Res.**, Vol. 9, pp. 225-234. Pergamon Press. 1973.

MARVALDI, A.E.; LANTERI, A.A. Key to higher taxa of South American weevils based on adult characters (Coleoptera, Curculionoidea). **Revista Chilena de História Natural**, v.78, p. 65-87, 2005.

MENEZES, A.M.S.; RAO, V.S.N.; FONTELES, M.C. Anti-ulcerogenic activity of *Astronium urundeuva*. **Fitoterapia**, v. 57, p. 253-256, 1986.

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

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

MORAIS, S.A.L.; NASCIMENTO, E.A.; QUEIROZ, C.R.A.A. Studies on polyphenols of *Myracrodruon urundeuva* wood. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 10, p. 447-452, 1999.

MUÑOZ, J.D. **Anacardiaceae. Flora del Paraguay**. Geneve: Missouri Botanical Garden, 1990.

NAKAKITA, H.; IKENAGA, H. Action of Low Temperature on Physiology of *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) in Rice Storage. **J. stored Prod. Res.** Vol. 33, No. 1. pp. 31-38. 1997.

NAPOLEÃO, T. H. et al. Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 52-59, 2011.

NAPOLEÃO, T.H. et al. Deleterious effects of *Myracrodruon urundeuva* leaf extract and lectin on the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 54, p. 26-33, 2013.

NAPOLEÃO, T.H. et al. Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. **Parasitology Research**, v. 110, p. 609-616, 2012.

NASCIMENTO, C.O. et al. Optimized extraction of a lectin from *Crataeva tapia* bark using AOT in isooctane reversed micelles. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 779-782, 2008.

OJEWOLE, J.A.O. Analgesic, anti-inflammatory and hypoglycaemic effects of *Rhus chirindensis* (Baker F.) [Anacardiaceae] stem-bark aqueous extract in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.113, n.2, p. 338-345, 2007.

OJEWOLE, J.A.O. Evaluation of the anti-inflammatory properties of *Sclerocarya birrea* (A. Rich.) Hochst. (family Anacardiaceae) stem-bark extracts in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.85, n.2, p. 217-220, 2003.

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. et al. Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 498-504, 2011.

OLIVEIRA, R.L.C. et al. Conservation priorities and population structure of woody medicinal plants in an area of Caatinga vegetation (Pernambuco State, NE Brazil). **Environmental Monitoring Assessment**, v. 132, n. 1-3, p.189-206, 2007.

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.G. et al. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants, In: MENDEZ-VILAS, A. (ed.). **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, vol. 2, Badajoz: Formatex, p. 396-406, 2010.

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

PAIVA, P.M.G. et al. Purification and primary structure determination of two Bowman-Birk type trypsin isoinhibitors from *Cratylia mollis* seeds. **Phytochemistry**, v.67, n.6, p.545-522, 2006.

PAIVA, P.M.G., COELHO, L.C.B.B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (amarante bean). **Appl. Biochem. Biotechnol.** v.36, p.113-118, 1992.

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

PEREIRA, C.J. et al. Organophosphate resistance in the maize weevil *Sitophilus zeamais*: Magnitude and behavior. **Crop Protection**, v. 28, p. 168-173, 2009.

PEREZ-MENDONZA, J. Survey of insecticide resistance in Mexican populations of maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 35, p. 107-115, 1999.

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

PINTO-COELHO, R.M. **Fundamentos em Ecologia**. Porto Alegre: Artmed, 2000.

POTRICH, M. **Associação de variedades resistentes de milho e fungos entomopatogênicos para o controle de *Sitophilus* sp.** [Mestrado em agronomia] Universidade estadual do oeste do Paraná, Paraná, 2006.

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, S.O. et al. Bioatividade de diversos pós de origem vegetal em relação à *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Ciência & Agrotecnologia**, v. 27, p. 1231-1236, 2003.

RAO, V.S.N. et al. Effect of *Astronium urundeuva* Engl. (aroeira) in experimental colitis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.19, p. 568-569, 1986.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. 6a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

RICKLEFS, R.E. **A economia da natureza**. 5a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

RINI, J.M. Lectin structure. **Annu Rev. Biophys. Biomol. Struct.** v. 24, p.551-577, 1995.

RIZZINI, C.T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil: manual de dendrologia brasileira**. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 1978.

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

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

SÁ, R.A. et al.. Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 62, p. 460-464, 2008.

SADEGHI, A. et al. Deterrent activity of plant lectins on cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (F.) ovoposition. **Phytochemistry**, v.67, n.18, p.2078-2084, 2006.

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.

SANTANA, G.M.S. *et al.* Electrochemical potential of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin. **Bioelectrochemistry**, v. 85, p. 56-60, 2012.

SANTOS, A.F.S. et al. Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 504-508, 2009.

SHARON, N.; LIS, H. How proteins bind carbohydrates: lessons from legume lectins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 50, p. 6586-6591, 2002.

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. et al. A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65(5), p. 696-702, 2011.

SOUZA, J.D. et al. A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. **Intenational Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 696-702, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TAVARES, M.A.G.C.; VENDRAMIM, J.D. Bioatividade da Erva-de-Santa-Maria, *Chenopodium ambrosioides* L., sobre *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, 2005.

TEFERA, T. et al. The metal silo: An effective grain storage technology for reducing post-harvest insect and pathogen losses in maize while improving smallholder farmers' food security in developing countries. **Crop Protection**, v. 30, p. 240-245, 2011.

TELLAM, R.L., WIJFFELS, G., WILADSEN, P. Peritrophic matrix proteins. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, p. 87-101, 1999.

VIANA, G.S.B., et al. Analgesic and antiinflammatory effects of the tannin fraction from *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. **Phytotherapy Research**, v.11, p. 118-122, 1997.

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.

WEARNE, K.; WINTER, H. C.; GOLDSTEIN, I. J. Isolation of banana lectin—a practical scale procedure from ripe banana fruit. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 43(3), p. 285–292, 2012.

WIMALARATNE, P.D.C. et al. Isolation and identification of house fly, *Musca domestica* L., repellents from pepper tree, *Schinus molle* L. **Journal of Chemical Ecology**, v.22, n.1, p. 49-59, 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 SE – 7**, v. 1200, p. 79–92, 2014.

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

ZHU-SALZMAN, K. et al. Carbohydrate binding and resistance to proteolysis control insecticidal activity of *Griffonia simplicifolia* lectin II (GSII). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 15123–15128, 1998.

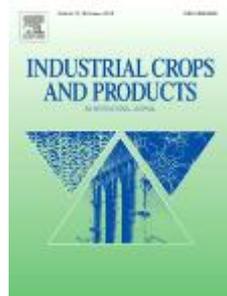
ZHU-SALZMAN, K., SALZMAN, R.A. Functional mechanics of the plant defensive *Griffonia simplicifolia* lectin II: resistance to proteolysis is independent of glycoconjugate binding in the insect gut. **Journal of Economic Entomology**, v. 94, p. 1280–1284, 2001.

**5. ARTIGO**

**Evaluation of insecticidal activity of extracts and lectins from  
*Myracrodruon urundeuva* bark and heartwood against *Sitophilus zeamais*  
(Coleoptera, Curculionidae)**

ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO

“Industrial Crops and Products”



Fator de impacto: 2.837

**Evaluation of insecticidal activity of extracts and lectins from *Myracrodruon urundeuva* bark and heartwood against *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae)**

Bernardo do Rego Belmonte<sup>a</sup>, Tatiana Soares<sup>a</sup>, Emmanuel Viana Pontual<sup>b</sup>, Thiago Henrique Napoleão<sup>a</sup>, Patrícia Maria Guedes Paiva<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>*Departamento de Bioquímica-CCB, Universidade Federal de Pernambuco 50670-420, Recife. Pernambuco, Brazil.*

<sup>b</sup>*Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco 52171-900, Recife. Pernambuco, Brazil.*

\*Corresponding author. Tel: +558121268540; Fax: +558121268576

E-mail: ppaivaufpe@yahoo.com.br

**Abstract**

This work evaluated the deleterious effects of extracts and lectins isolated from the bark (MuBL) and heartwood (MuHL) of *Myracrodruon urundeuva* against the maize weevil (*Sitophilus zeamais*). For determination of insecticidal activity, the samples were incorporated into wheat flour disks that served as diet for the insects during 7 days. The concentration ranges (mg of sample per mg of wheat flour) tested were : 4–20 mg/g (bark extract), 14–70 mg/g (heartwood extract), 0.6-3.0 mg/g (MuBL) and 1.4-7.0 mg/g (MuHL). After this period, it was evaluated the mortality rate and the following nutritional parameters: feeding deterrence index (FDI), relative consumption rate (RCR), relative biomass gain rate (BGR) and efficiency in conversion of ingested food (ECIF). Extracts from gut of insects that ingested the highest concentration of samples were obtained and evaluated for the activities of protease, cellulases (endoglucanase, exoglucanase,  $\beta$ -glucosidase), phosphatases (acid and alkaline) and  $\alpha$ -amylase. The diets containing the bark and heartwood extracts did not induce mortality of the insects in a period of 7 days of assay as well as did not exert deterrent effect on the insects. However, both extracts and lectins interfered with the nutritional parameters of the insects and impaired the conversion of food into biomass. Only MuHL showed deterrent effect, ranging from weak to strong according to the concentration. The ingestion of extracts and lectins cause alterations in the levels of digestive enzymes of insect gut, which were higher or lower than in insects from control groups. In conclusion, the extracts and lectins from bark and heartwood of *M. urundeuva* exerted antinutritional effects on *S. zeamais* adults, showing potential for use in control of the damages caused by this insect pest.

**Keywords:** *Sitophilus zeamais*; lectin; antinutritional effects; digestive enzymes.

## 1. Introduction

The Brazil is the third largest producer of maize (*Zea mays* L.) in the world, accounting for 8% of global production in 2012, behind only of United States and China (Ranum et al., 2014). Since the maize production is seasonal in several countries, including Brazil, there is a need for storage of the grains, when they become more subject to the attack of pests (Di Domenico et al., 2015). The action of storage insect pests causes injuries of nutritional properties, seed viability, grinding quality and sanity, reducing the commercial value (Reed et al., 2007). In addition, the deterioration and degradation of grains void a lot of energy resources that correspond to billions of dollars and affect food security because the damaged grains are more susceptible to contamination by pathogens (FAO, 2009).

The insects of *Sitophilus* genus (Order Coleoptera, Family Curculionidae) are cosmopolitans in tropical regions and cause numerous economic losses in agriculture (Gallo et al., 2002; Fazolin et al., 2010; Groote et al., 2013); among them, it can be highlighted the *Sitophilus oryzae* Linn., *Sitophilus granaries* Linn., and *Sitophilus zeamais* Motsch. The *S. zeamais* is known as maize weevil and promotes cross-infestation, attacking the crops both in pre- and post-harvest conditions (Giles and Ashman, 1971; Gallo et al., 2002; Trematerra et al., 2013). The maize weevil is polyphagous, being able to feed on maize (main diet), peanuts, rice, sorghum, soybeans, wheat, barley, oats, peaches, apples, quince, and plum as well as industrialized products. Studies showed that a natural infestation by *S. zeamais* cause losses in the order of 50-80% within six months. Moreover, when the weight loss of the maize grains exceeds 25.9%, the nutritional value of the product becomes insignificant. *S. zeamais*, together with other stored grain pests, are responsible for losses in the order of 20-30% in maize production (Gallo et al., 1988, 2002; Botton et al., 2005; Buzzi, 2005; Fazolin et al., 2010; Tefera et al., 2011).

*S. zeamais* populations have shown insecticide resistance to lindane (interrupted use) and malathion. There are also reports on populations with some degree of resistance to pirimiphos-methyl, deltamethrin and permethrin (Perez-Mendoza, 1999). Also, it is expected the emergence of resistance to fenitrothion in the future, due to the massive use of this insecticide (Braga et al., 2011).

Lectins are carbohydrate-binding proteins broadly distributed in nature (Yau et al., 2015). These proteins have shown entomotoxic effects against insects from several orders (Paiva et al., 2013). Three chitin-binding lectins were isolated from bark (MuBL), heartwood (MuHL) and leaf (MuLL) of *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Anacardiaceae), which is a hardwood tree known in Brazil as “aroeira-do-sertão” (Sá et al., 2009; Napoleão et al., 2011). MuBL, MuHL and MuLL showed insecticidal activity against termite *Nasutitermes corniger* Motsch. and larvae of the mosquito *Aedes aegypti* Linn. (Sá et al., 2008, 2009; Napoleão et al., 2011, 2012). Napoleão et al. (2013) reported that MuLL exerted strong feeding deterrence to *S. zeamais* adults when incorporated in an artificial diet; in addition, the ingestion of this lectin by the insects caused alterations in the activity of their digestive enzymes.

This work reports the evaluation *M. urundeuva* bark and heartwood extracts, MuBL and MuHL for insecticidal activity against *S. zeamais* adults. The effects of extracts and lectins on survival, feeding and activity of digestive enzymes were investigated.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Plant material*

Bark and heartwood of *M. urundeuva* were collected in Caxias, State of Maranhão, northeastern Brazil, with authorization (number 38690) of the *Instituto Chico Mendes de*

*Conservação da Biodiversidade* (ICMBio) from the Brazilian Ministry of the Environment. A voucher specimen is deposited under number 054 at the Herbarium *Aluisio Bittencourt*, *Centro de Estudos Superiores de Caxias, Universidade Estadual do Maranhão*, Brazil. The bark and heartwood were powdered, passed through 40 mesh screen, and stored at 28 °C.

## 2.2. Insects

*S. zeamais* colonies are reared in the *Laboratório de Bioquímica de Proteínas* of the *Departamento de Bioquímica* from the *Universidade Federal de Pernambuco*. The colonies are maintained at 28±2°C in glass containers (capacity, 1 L) sealed with unwoven fabric to permit aeration. The diet consisted of maize grains (200 g per container), selected according to integrity, sanitary conditions, size, and absence of contamination with other insects. The rearing of the insect also has authorization (number 36301) from ICMBio.

## 2.3. Chemicals

*N*-acetylglucosamine, Avicel, azocasein, *N*-benzoyl-DL-arginyl- $\rho$ -nitroanilide (BAPNA), bovine serum albumin (BSA), carboxymethylcellulose, chitin powder from shrimp shells, 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS), D(+)-glucose, glutaraldehyde,  $\rho$ -nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside,  $\rho$ -nitrophenyl phosphate,  $\rho$ -nitrophenol, sodium bicarbonate, soluble starch, trichloroacetic acid and Trishydroxymethylaminomethane (Tris) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Acetic acid, ammonium sulphate, chloridric acid, dibasic sodium phosphate, monobasic sodium phosphate, and sodium chloride were purchased from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). Calcium chloride, sodium acetate, sodium hydroxide, and

Triton X-100 were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All reagents were of analytical grade.

#### *2.4. Isolation of lectins*

MuBL and MuHL were isolated according to the Sá et al. (2009). The powder of bark or heartwood was suspended in 0.15 M NaCl (in proportion of 10%, w/v) and the mixture was homogenized in a magnetic stirrer during 16 h at 28 °C. Next, the material was filtered through gauze (Cremer, Blumenau, Brazil) and the filtrate was centrifuged (3,000 g, 15 min). The supernatants corresponded to the extracts. Bark and heartwood extracts were then treated with ammonium sulphate and the 20-40% supernatant (from bark extract) or the 40-60% precipitate (from heartwood extract) were collected and dialyzed against distilled water (4 h) and 0.15 M NaCl (4 h). These fractions were separately chromatographed on chitin columns (7.5 × 1.5 cm) equilibrated with 0.15 M NaCl. After removal of non-adsorbed compounds, MuBL and MuHL were eluted with 1.0 M acetic acid and dialyzed against four changes of distilled water every 2 h.

#### *2.5. Protein content*

Protein concentration was determined according to Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin (31.25–500 µg/mL) as standard.

#### *2.6. Hemagglutinating activity*

Hemagglutinating assay was carried out in microtiter plates (TPP-Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland) according to Paiva and Coelho (1992) by incubating (45 min, 28°C) 50 µl of lectin sample with the same volume of a 2.5% (v/v) suspension of rabbit erythrocytes treated with glutaraldehyde (Bing et al., 1967). The number of hemagglutinating activity units (HAU) were defined as the reciprocal of the highest dilution of the sample promoting full agglutination of erythrocytes. Specific hemagglutinating activity was defined as the ratio between HAU and protein concentration (mg/mL). HA inhibitory assay was performed by incubation (30 min, 28°C) of lectin sample with 200 mM *N*-acetylglucosamine solution (Sá et al., 2009) before addition of erythrocyte suspension.

## 2.7. Bioassays

The bioassays consisted in offer to *S. zeamais* adults an artificial diet consisting of wheat flour disks containing the sample, following the method of Xie et al. (1996) with some modifications described by Napoleão et al. (2013). First, it was prepared a suspension consisting in 2 g of autoclaved wheat flour (Dona Benta<sup>®</sup>, Bunge Alimentos S.A., Benevides, Brazil) mixed with 5 mL of extract or lectin solution prepared with sterile distilled water. In each bioassay, five aliquots (200 µL) of the suspension were placed on a petri dish (90 × 100 mm; PETRIQ<sup>®</sup>, Boeco, Germany) of known weight to form flour disks. After incubation overnight at 56°C, the dish was weighed again and the masses of the flour disks were determined. Twelve *S. zeamais* adults with known weight were then transferred to the dish. Each bioassay was performed in quadruplicate. The tested concentrations of samples in flour disks ranged from 4 to 20 mg/g (mg of protein/g of wheat flour) for bark extract, 14 to 70 mg/g for heartwood extract, 1.2 to 3.0 mg/g for MuBL, and 1.5 to 7.0 mg/g for MuHL. In controls, only sterile distilled water was added to wheat flour. The assays were maintained at

28±2°C in darkness for 7 days. After this period, the mortality rates and the weights of flour disks and insects were recorded.

With the recorded data, it was possible to calculate the feeding-deterrence index (FDI) and nutritional parameters. The FDI was calculated as follows:  $FDI (\%) = 100 \times (A - B)/A$ , where  $A$  is the mass of food ingested by insects in the control assay and  $B$  is the mass of food ingested by insects in the sample assay (Isman et al., 1990). According to the FDI value, the sample was classified as no deterrent ( $FDI < 20\%$ ), weakly deterrent ( $50\% > FDI \geq 20\%$ ), moderately deterrent ( $70\% > FDI \geq 50\%$ ), or strongly deterrent ( $FDI \geq 70\%$ ) (Liu et al., 2007). The nutritional indices calculated were: (a) the relative consumption rate =  $C/(D \times \text{days})$ , where  $C$  is the mass of ingested food in mg and  $D$  corresponds to the initial insect biomass in mg; (b) the relative biomass gain rate =  $E/(D \times \text{days})$ , where  $E$  corresponds to the biomass gained in mg; and (c) the efficiency of conversion of ingested food =  $E/(C \times 100)$  (Xie et al., 1996)

## 2.8. Determination of digestive enzyme activities

For evaluation of the effect of samples on the activity of digestive enzymes, bioassays were performed as described above with bark extract (20 mg/g), heartwood extract (70 mg/g), MuBL (3.0 mg/g), MuHL (7.0 mg/g) or distilled water (control). After 7 days, groups of 50 *S. zeamais* adults from each treatment were immobilized by placing them at -20°C for 10 min and had their gut dissected manually. The guts were then homogenized with 1 mL of Tris buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, containing 0.02 M CaCl<sub>2</sub> and 0.15 M NaCl), acetate buffer (0.1 M sodium acetate, pH 5.5, containing 0.02 M CaCl<sub>2</sub> and 0.15 M NaCl), or sodium phosphate buffer (0.02 M sodium phosphate, pH 7.0, containing 0.15 M NaCl) by using a 3-mL tissue grinder (Pyrex<sup>®</sup>, Corning Inc., NY, USA). The homogenates were centrifuged at

13,000 g at 4°C for 15 min. The supernatants (gut extracts) were collected and evaluated for protein concentration. Assays were performed in quadruplicate.

Protease activity was determined by mixing gut extract in Tris buffer (50 µL; 192 µg of protein) with 300 µL of 0.1 M sodium phosphate pH 7.5 and 50 µL of 0.6% (w/v) azocasein (Azeez et al., 2007). The mixture was supplemented with 100 µL of 0.1% (v/v) Triton X-100 and incubated at 37 °C for 3 h. The reaction was stopped by adding 200 µL of 10% (v/v) trichloroacetic acid and the assay was incubated at 4 °C for 30 min. Next, it was centrifuged at 9,000 g for 10 min and the absorbance of the supernatant at 366 nm was determined using a spectrophotometer (GeneQuant™ 1300, GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ, USA). One unit of protease activity was defined as the amount of enzyme that gave an increase of 0.01 in absorbance. Assays were performed in quadruplicate.

The activities of acid and alkaline phosphatases were determined according Koodalingam et al. (2011). Gut extract in sodium phosphate buffer (50 µL; 190 µg of protein) was mixed with 450 µL of 0.05 M sodium acetate buffer pH 4.0 (for detection of acid phosphatases) or 0.05 M Tris-HCl pH 8.0 (for evaluation of alkaline phosphatases). Next, 500 µL of 12.5 mM  $\rho$ -nitrophenyl phosphate in acetate or Tris buffer was added. After incubation for 15 min at 37°C, the enzyme reaction was stopped by adding 100 µL of 0.5 M sodium hydroxide and the assay was centrifuged (4000 g; 5 min). The absorbance at 410 nm of the supernatants was then recorded using spectrophotometer. The amount of  $\rho$ -nitrophenol ( $\rho$ NP) released by hydrolysis of substrate was determined using the standard curve  $Y=16.992X+0.0001$ , where  $Y$  is the absorbance at 410 nm and  $X$  is the  $\rho$ NP concentration in mg/mL. One unit of acid or alkaline phosphatase activity was defined as the amount of enzyme required to generate 1 µmol of  $\rho$ -nitrophenol per minute. Assays were performed in quadruplicate.

Endoglucanase, exoglucanase and amylase activities were determined according to Li et al. (2009), Wood and Bhat (1988) and Bernfeld (1955) respectively, with some modifications. The reactions started by incubation (50 °C, 10 min) of gut extract in acetate buffer (100 µL; 385 µg of protein) with 400 µL of a 1% (w/v) carboxymethylcellulose (for endoglucanase), 1% (w/v) Avicel (for exoglucanase) or 1% (w/v) soluble starch (for amylase) solutions in sodium acetate pH 5.5 containing 0.15 M NaCl. In the assays for amylase activity, the reaction medium was also supplemented with 0.02 M CaCl<sub>2</sub>. After incubation, 500 µL of DNS were added to stop the reaction and the mixtures were heated (100 °C) for 6 min and immediately cooled on ice (15 min). Then, the absorbance at 540 nm was measured using spectrophotometer. The amount of reducing sugars was determined using a standard curve of glucose ( $Y=0.1534X-0.0183$ ;  $Y$  is the absorbance at 540 nm;  $X$  is the glucose concentration in mg/mL). One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme required to generate 1 µmol of glucose per minute. Blanks were performed submitting gut extract to the same reaction steps in absence of substrate. Assays were performed in quadruplicate.

The β-glucosidase activity was determined according to Tan et al. (1987). Gut extract in acetate buffer (50 µL; 192 µg of protein) was incubated (50 °C; 10 min) with 400 µL of 0.1% (w/v) p-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside solution in sodium acetate pH 5.5 containing 0.15 M NaCl. After incubation, 500 µL of 10% (w/v) sodium bicarbonate were added to stop the reaction and the absorbance at 410 nm from 200 µL-aliquots of each reaction was measured using a microplate reader. The amount of pNP released by hydrolysis of the substrate was determined using the standard curve described above. One unit of activity was defined as the amount of enzyme required to generate 1 µmol of pNP per minute. Reaction blanks were performed without substrate. Assays were performed in quadruplicate.

### 2.9. Statistical analysis

Standard deviations (SD) were calculated using GraphPad Prism version 4.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA), and data were expressed as the mean of replicates  $\pm$  SD. Significant differences between treatment groups were analyzed using Student's *t*-test and Tukey's test for multiple comparison (both with significance at  $p < 0.05$ ) with Origin 6.0 and Action 2.4.163.322 softwares.

## 3. Results and discussion

The ingestion of saline extracts from *M. urundeuva* bark and heartwood did not result in mortality of *S. zeamais* adults after 7 days (Table 1), unlike previously reported for the extract from leaves of this same plant, which caused the death of insects when incorporated to artificial diet at concentrations from 10 mg/g (Napoleão et al., 2013). In spite of the absence of mortality, we investigated whether the ingestion of *M. urundeuva* bark and heartwood extracts could have interfered with nutritional parameters of the insects.

The results from bioassays using the bark extract shows that the relative biomass gain rate was negative (ranging from -0.010 to -0.040 mg/mg/day) in all treatments (Fig. 1A). This datum reveals that the ingestion of bark extract caused loss of biomass by the insects. The effect of the 20 mg/g treatment was significantly ( $p < 0.05$ ) different from the other treatments. The relative consumption rates were not significantly ( $p > 0.05$ ) different from control (Fig. 1B), indicating no changes in the amount of food ingested relative to the body size of insects. Since there was no reduction in consumption but the insects lost biomass, it can be inferred that the ingestion of bark extract interfered with digestion and/or absorption

processes. This is reinforced by the negative values of efficiency in conversion of ingested food (Fig. 1C), which reached -70% in treatment at 20 mg/g. This result indicates that the food ingested by the insect is being predominantly used to generate energy and also body reserves are being metabolized in order to maintain the homeostasis.

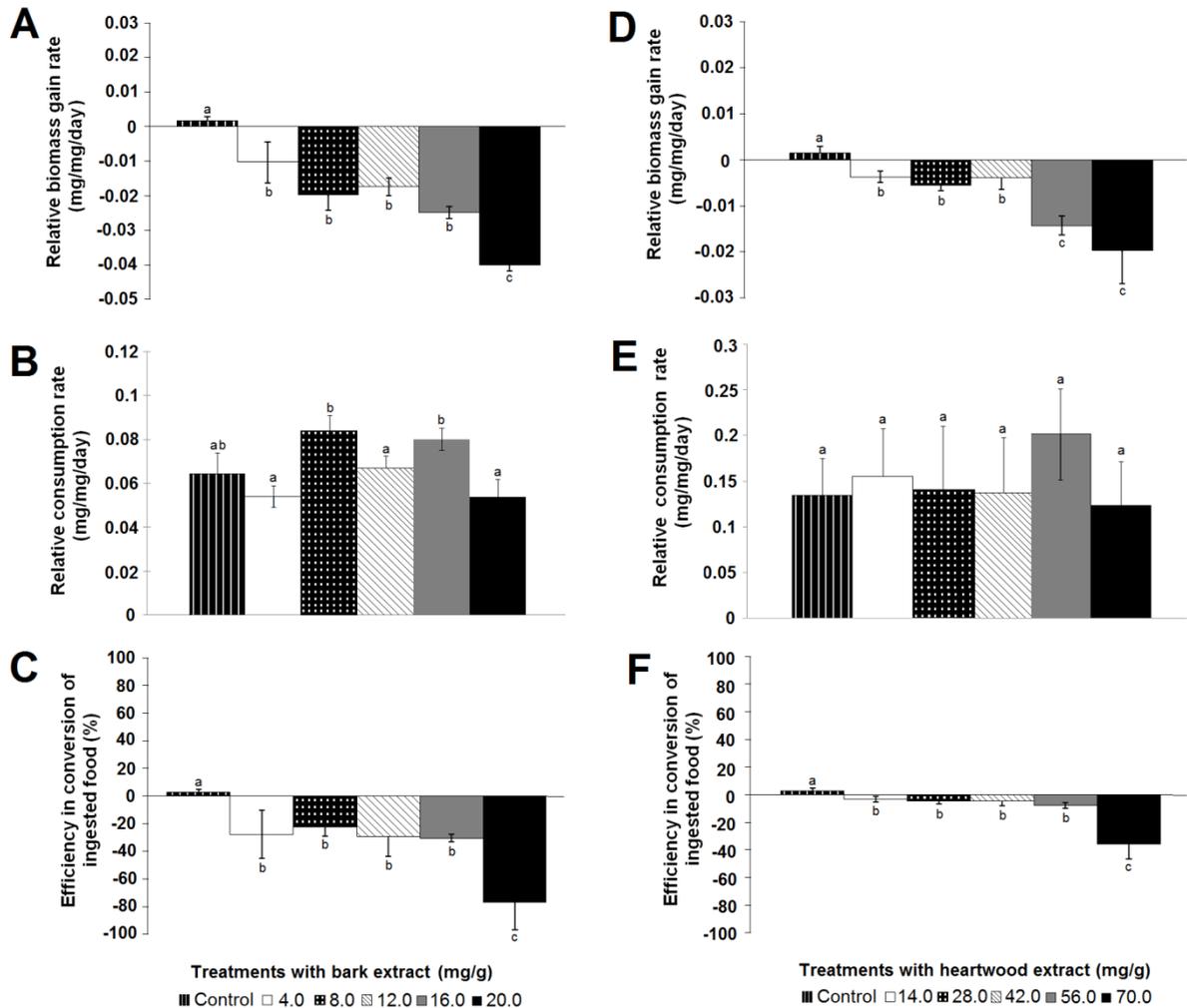
**Table 1.** Survival rates of *S. zeamais* adults reared for 7 days on diets containing *M. urundeuva* bark extract or heartwood extract.

Sample concentration (mg/g of wheat flour)	Mortality rate (%) after 7 days
<b>Bark extract</b>	
4.0	0,0 ± 0.0 a
8.0	1.25 ± 2.5a
12.0	2.44± 2.8a
16.0	0,0 ± 0,0 a
20.0	8.75 ± 2.5a
Control	0,0 ± 0,0 a
<b>Heartwood extract</b>	
14.0	6.25 ± 4.8a
28.0	3.63 ± 4.6 a
42.0	0,0 ± 0,0 a
56.0	5.00 ± 4.1a
70.0	2.25 ± 2.5 a
Control	1.25 ± 2.5a

Control treatments contained only wheat flour. Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between treatments.

The ingestion of heartwood extract also promoted alterations in nutritional parameters of *S. zeamais* adults. The biomass gain rates were negative in all treatments with the extract (Fig. 1D) with a significantly ( $p < 0.05$ ) higher effect at 56.0 and 70.0 mg/g. The relative consumption rates (Fig. 1E) were not significantly distinct ( $p > 0.05$ ) from control and the

efficiency in conversion of ingested food (Fig. 1F) was negative in all treatments reaching the value of -35% in treatment at 70.0 mg/g,



**Figure 1.** Nutritional parameters of *S. zeamais* adults reared on artificial diets consisting of wheat flour disks prepared with distilled water (controls) or *M. urundeuva* bark (A, B, C) or heartwood (D, E, F) extracts. The relative biomass gain rate indicates the amount of biomass in mg gained every day per mg of initial body weight. The relative consumption rate indicates the amount of food consumed in mg per mg of insect body weight per day. The efficiency in conversion of ingested food (%) indicates the amount of ingested food incorporated by insects as biomass. Each bar corresponds to the mean  $\pm$  SD of four replicates. Different letters indicate significant ( $p < 0.05$ ) differences between treatments.

The bark and heartwood extracts did not exert deterrent effect at any of tested concentrations, differently from leaf extract, which exerted moderate deterrent effect at concentrations from 25 to 150 mg/g (Napoleão et al., 2013). The comparison of the results obtained for these three extracts show that the leaf extract possess higher appeal for use in control of *S. zeamais* because of its abilities to reduce the feeding activity of *S. zeamais* adults and provoke their mortality, probably by induction of starvation and action of toxic components (Napoleão et al., 2013). However, the bark and heartwood extracts also constitute an interesting alternative for control of these insects since, at concentrations lower than the other *M. urundeuva* leaf extract, they were able to disturb the digestive processes without being rejected by the insects. Since there was no feeding deterrent effect of bark and heartwood extracts, the nutritional damages resulted from the ingestion of extract components, similarly to that was observed with the toxic effect of *ar*-turmerone from *Curcuma longa* rhizome on *S. zeamais* adults (Tavares et al., 2013).

The low cost and biodegradability of plant extracts become them interesting alternatives in integrated pest management programs, which prioritize the use of insecticides with the least possible hazard to people and the environment (Procópio et al., 2015). It has been considered that botanical insecticides might be better placed in rotation programs for crop protection, in order to fight the development of resistance; also, compounds with antifeedant activity and damaging for insect nutrition have potential for use as synergists (Isman, 2006; Bullangpoti et al., 2012).

Since the lectins MuBL and MuHL were reported as active principle of the insecticidal activity of *M. urundeuva* bark and heartwood extracts against termites and mosquito larvae (Sá et al., 2008, 2009; Napoleão et al., 2011), we evaluated the effects of them on *S. zeamais* adults. Both MuBL and MuHL did not promote mortality of the insects when incorporated

into the artificial diet (Table 2). However, the ingestion of these proteins affected the nutritional parameters.

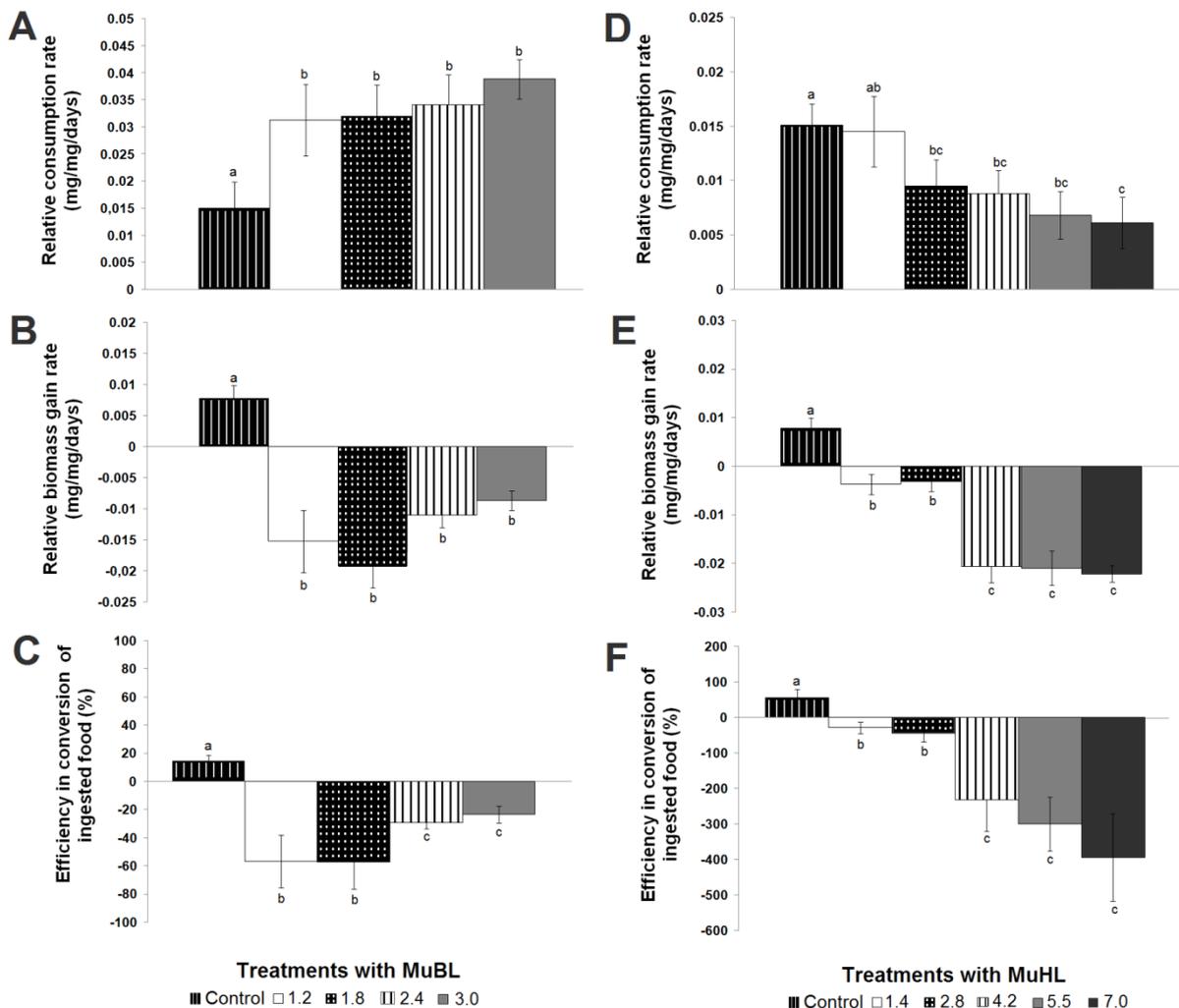
**Table 2.** Survival rates of *S. zeamais* adults reared for 7 days on diets containing *M. urundeuva* bark (MuBL) or heartwood (MuHL) lectins.

Sample concentration (mg/g of wheat flour)	Mortality rate (%) after 7 days
<b>MuBL</b>	
0.6	6.25 ± 4.8 a
1.2	5.00 ± 4.1 a
1.8	3.75 ± 4.8 a
2.4	5.00 ± 0.0 a
3.0	2.50 ± 2.9 a
Control	2.50 ± 5.0 a
<b>MuHL</b>	
1.4	0.0 ± 0.0 a
2.8	1.25 ± 2.50 a
4.2	0.0 ± 0.0 a
5.6	0.0 ± 0.0 a
7	0.0 ± 0.0 a
Control	0.0 ± 0.0 a

Control treatments contained only wheat flour. Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between treatments.

The relative consumption rate (Fig. 2A) significantly ( $p < 0.05$ ) increased in comparison with control when MuBL was incorporated in flour disks at 1.2, 2.4 and 3.0 mg/g. In spite of the increase in the amount of ingested food, the relative biomass gain rates (Fig. 2B) were negative ranging from -0.009 to -0.019 mg/g/day. The values of efficiency in conversion of ingested food (Fig. 2C) were also negative in all treatments with MuBL. These results show that the ingestion of MuBL was damaging for the nutrition of the insects, which

lost biomass although they had even ingested a more amount of diet when this lectin was present. In this sense, MuBL may be responsible for at least part of the antinutritional effects of the bark extract.



**Figure 2.** Nutritional parameters of *S. zeamais* adults reared on artificial diets consisting of wheat flour disks prepared with distilled water (controls), MuBL (A, B, C) or MuHL (D, E, F) extracts. The relative biomass gain rate indicates the amount of biomass in mg gained every day per mg of initial body weight. The relative consumption rate indicates the amount of food consumed in mg per mg of insect body weight per day. The efficiency in conversion of ingested food (%) indicates the amount of ingested food incorporated by insects as biomass.

Each bar corresponds to the mean  $\pm$  SD of four replicates. Different letters indicate significant ( $p < 0.05$ ) differences between treatments.

In the assays with MuHL, there was a significant ( $p < 0.05$ ) decrease of 2.21 and 8.8 times of the relative consumption rates (Fig. 2D) in treatments at 5.6 and 7.0 mg/g, in comparison with control. The values of biomass gain rates (Fig. 2E) were negative in all treatments, with relative biomass losses ranging from -0.004 to -0.022 mg/g. The efficiency in conversion of ingested food (Fig. 2F) was also negative with a drastic effect (-360%) in treatment at 7.0 mg/g. The feeding deterrence indexes for MuHL showed that, depending of the amount of lectin present in the diet, there was weak (2.8 and 4.2 mg/g), moderate (5.6 mg/g) or strong (7.0 mg/g) deterrent effects. The effects of MuHL on *S. zeamais* adults were similar to those previously reported for MuLL, the lectin isolated from *M. urundeuva* leaves, which also showed a deterrent effect and affected the nutritional parameters; the authors suggested that the reduction in food ingestion can lead the insects to a starvation status affecting development, reproduction and survival (Napoleão et al., 2013). As a deterrent agent, MuHL was more effective than MuLL since this last only exerted a strong deterrent effect at 30 mg/g, while the heartwood lectin was active at this level when incorporated into the diet at only 7.0 mg/g.

Although the extracts and lectins from *M. urundeuva* bark and heartwood evaluated here did not caused mortality of the insects after 7 days, the damaging effects on nutrition of *S. zeamais* would be able to affect the reproductive success of the individuals that ingest these preparations. Oliveira et al. (2015) showed that the chronic ingestion of *Dioclea violacea* lectin by *Anagasta kuehniella* larvae did not affect survival but caused decrease of biomass, interfering with development. The ingestion of *Phaseolus vulgaris* whole meal or protein extract, rich in lectins and lectin-like proteins, significantly decreased the fecundity of

*Callosobruchus maculatus* females and also affected the percentage of adult emergence and increased the development time (Karbache et al., 2011).

When a lectin reaches the insect gut, it can bind to gut cells, modulate cell turnover, and interact with enzymes affecting the digestion process, which results in nutrient malabsorption (Vasconcelos and Oliveira, 2004). Chitin-binding lectins are able to bind the peritrophic matrix of insects, affecting the integrity of this structure. The disorganization of peritrophic matrix may result in deregulation of enzyme activities, alteration of gut permeability and damage of microvillar brush border (Paiva et al., 2013)

In order to evaluate whether antinutritional effects of extracts and lectins from *M. urundeuva* bark and heartwood would be linked to damages in digestion processes, we determined the digestive enzymes activities in gut of insects that ingested the artificial diets containing them. The activities of protease, acid phosphatases, alkaline phosphatases and  $\beta$ -glucosidase in gut extracts from control insects were not significantly different ( $p > 0.05$ ) from those in gut extract from insects that ingested the bark extract (Table 3). On the other hand, the activities of endoglucanase, exoglucanase and  $\alpha$ -amylase were, respectively, 21.4%, 84.4% and 24.4% higher than in control.

For insects that ingested the heartwood extract (Table 3), the activities of protease, exoglucanase and  $\alpha$ -amylase were respectively 49.6%, 26.9% and 36.6% lower than in control group, while the activity of acid phosphatases was 8.02% higher. The interference with the activity of digestive enzymes at *S. zeamais* gut may disturb the regulation of all the digestive process. Particularly, the reduction of amylase activity has a great impact in the nutrition of these insects, since the starch accounts for 88% of the endosperm, which correspond to 83% of the dry weight of maize grains (Paes, 2006). The amylases have been described as targets of lectins at insect midgut (Macedo et al., 2015).

**Table 3.** Digestive enzyme activities in gut extracts from *S. zeamais* adults reared on diets consisting on wheat flour disks containing extracts from *M. urundeuva* bark and heartwood.

Enzyme	Treatment groups		Treatment groups	
	Control	Bark extract	Control	Heartwood extract
Protease (U/mg)	13.51 ± 1.82 a	16.23 ± 1.58 a	10.98 ± 0.68 a	5.53 ± 0.89 b
Acid phosphatase (mU/mg)	13.07 ± 0.04 a	13.08 ± 0.10 a	12.09 ± 0.09 a	13.06 ± 0.06 b
Alkaline phosphatase (mU/mg)	2.16 ± 0.05 a	2.22 ± 0.09 a	1.03 ± 0.13 a	1.14 ± 0.02 a
Endoglucanase (U/mg)	0.28 ± 0.02 a	0.34 ± 0.00 b	0.42 ± 0.01 a	0.38 ± 0.03 a
Exoglucanase (U/mg)	0.45 ± 0.04 a	0.83 ± 0.07 b	1.60 ± 0.05 a	1.17 ± 0.08 b
β-glucosidase (mU/mg)	32.44 ± 4.07 a	39.36 ± 3.48 a	ND	ND
α- amylase (U/mg)	0.96 ± 0.14 a	1.194 ± 0.03 b	1.34 ± 0.04 a	0.85 ± 0.03 b

Control treatments contained only wheat flour and distilled water. Different letters indicate significant ( $p < 0.05$ ) differences between treatments. Each value corresponds to the mean ± SD of four replicates. ND: not determined.

In gut extracts from insects of treatment with MuBL (Table 4), the activities of acid phosphatases and α-amylase were respectively 25.7% and 2.2% lower than in control while the activities of protease, endoglucanase and exoglucanase were 362.3%, 35.7% and 26.8% higher, respectively. The highest levels of the most of digestive enzymes evaluated are probably linked to the higher ingestion of food by insects when MuBL was incorporated into the diet. In addition, although the amylase activity was little different between treated and control insects. However, the presence of this lectin had a negative effect on the conversion of food in biomass, which suggests that it may be interfering with the absorption of nutrients.

In the case of insects treated with MuHL (Table 4), the activities of acid and alkaline phosphatases and exoglucanases were respectively 7.7%, 28.7% and 20% lower than those in gut extracts from control insects. The activities of the other enzymes evaluated were not significantly different ( $p > 0.05$ ) from control. At the concentration used in this assay, MuHL showed a strong deterrent effect and thus the loss of biomass was probably more linked to an

insufficient ingestion of nutrients by the insects than to interferences with the digestive enzyme activities.

Several lectins have been reported as able to modulate the activity of digestive enzymes from insects, which may be due to binding of the lectin to glycosylated moieties or other sites at the enzyme structure (Paiva et al, 2013; Macedo et al., 2015). The ingestion of *M. urundeuva* leaf lectin (MuLL) by *S. zeamais* adults resulted in decreased protease, alkaline phosphatase, endoglucanase, and  $\alpha$ -amylase activities; this lectin also was able to modulate the activity of proteases and amylase from larvae of *A. aegypti* (Napoleão et al., 2012, 2013). Ingestion of *Dioclea violacea* lectin decreased trypsin-like, chymotrypsin-like, and  $\alpha$ -amylase activities of *A. kuehniella* larvae (Oliveira et al., 2015).

**Table 4.** Digestive enzyme activities in gut extracts from *S. zeamais* adults reared on diets consisting on wheat flour disks containing lectins from *M. urundeuva* bark (MuBL) and heartwood (MuHL).

Enzyme	Treatment groups		Treatment groups	
	Control	MuBL	Control	MuHL
Protease (U/mg)	13.72 $\pm$ 1.06 a	63.43 $\pm$ 1.48 b	12.16 $\pm$ 2.11 a	11.39 $\pm$ 1.69 a
Acid phosphatase (mU/mg)	13.79 $\pm$ 0.11 a	10.24 $\pm$ 0.03 b	9.61 $\pm$ 0.03 a	8.87 $\pm$ 0.05 b
Alkaline phosphatase (mU/mg)	1.32 $\pm$ 0.15 a	1.07 $\pm$ 0.25 a	2.09 $\pm$ 0.0 a	1.49 $\pm$ 0.17 b
Endoglucanase (U/mg)	0.14 $\pm$ 0.07 a	0.19 $\pm$ 0.01 b	0.14 $\pm$ 0.03 a	0.10 $\pm$ 0.01 a
Exoglucanase (mU/mg)	1.27 $\pm$ 0.48 a	1.60 $\pm$ 0.26 b	2.50 $\pm$ 0.14 a	2.00 $\pm$ 0.10 b
$\beta$ -glucosidase (mU/mg)	12.62 $\pm$ 0.22 a	12.54 $\pm$ 0.20 b	ND	ND
$\alpha$ - amylase (U/mg)	0.46 $\pm$ 0.00 a	0.45 $\pm$ 0.00 b	0.70 $\pm$ 0.04 a	0.66 $\pm$ 0.08 a

Control treatments contained only wheat flour and distilled water. Different letters indicate significant ( $p < 0.05$ ) differences between treatments. Each value corresponds to the mean  $\pm$  SD of four replicates. ND: not determined.

#### 4. Conclusion

Extracts and lectins from bark and heartwood of *M. urundeuva* are able to exert anutritional effects on *S. zeamais* adults, showing then potential for use in control of the damages caused by this stored grain pest.

### Acknowledgments

The authors express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq; 472546/2012-0) for research grants and fellowship (LCBBC, VSB and PMGP). We are also grateful to the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES), the Brazilian Ministry for Science, Technology and Innovation (MCTI; 01200.003711/2011-11) and the *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE; APQ-0318-2.08/13) for financial support. E.V. Pontual and T. Soares would like to thank FACEPE for post-doctoral scholarships (APQ-0137-2.08/12; BCT-0421-2.08/12; BCT-0133-2.08/15). B.R. Belmonte would like to thank FACEPE for graduate scholarship (PBPG-0234-2.08/13).

### References

- Azeez, A., Sane, A.P., Bhatnagar, D., Nath, P., 2007 Enhanced expression of serine proteases during floral senescence in *Gladiolus*. *Phytochemistry* 68, 1352-1357.
- Bernfeld, P., 1955. Amylases,  $\alpha$  and  $\beta$ . *Methods in Enzymology* 1, 149-158.
- Bing, D.H., Weyand, J.G.M., Stavitsky, A.B., 1967. Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 124, 1166-1170.

- Botton, M. et al., 2005. O gorgulho do milho *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) como praga em frutíferas de clima temperado. Circular Técnica n° 58. Bento Gonçalves: Embrapa.
- Braga, L.S., Corrêa, A.S., Pereira, E.J.G., Guedes, R.N.C., 2011. Face or flee? Fenitrothion resistance and behavioral response in populations of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. Journal of Stored Products Research 47, 161-167.
- Bullangpoti, V., Wajnberg, E., Audant, P., Feyereisen, R., 2012. Antifeedant activity of *Jatropha gossypifolia* and *Melia azedarach* senescent leaf extracts on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and their potential use as synergists. Pest Manag Sci 68, 1255-1264.
- Buzzi, Z. J., 2005. Entomologia didática. 4.ed. Curitiba: Editora UFPR.
- Domenico, A.S.D., Christ, D., Hashimoto, E.H., Busso, C., Coelho, S.R.M., 2015. Evaluation of quality attributes and the incidence of *Fusarium* sp. and *Aspergillus* sp. in different types of maize storage. Journal of Stored Products Research 61, 59-64.
- FAO, 2009. Post-harvest losses aggravate hunger. FAO Media Centre. Available in: <http://www.fao.org/news/story/en/item/36844/icode>.
- Fazolin, M., da Costa, C.R., Damaceno, J.E.O., de Albuquerque, E.S., Cavalcante, A.S.S., Estrela, J.L.V., 2010. Fumigação de milho para o controle do gorgulho utilizando caule de *Tanaecium nocturnum* (Bignoniaceae). Pesquisa Agropecuária Brasileira 45, 1-6.
- Gallo, D. et al. , 2002. Entomologia agrícola. Piracicaba: FEALQ.
- Gallo, D. et al., 1988. Manual de entomologia agrícola. 2ed. São Paulo: Agronômica Ceres.
- Giles, P.H., Ashman, F., 1971. A study of pre-harvest infestation of maize by *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera, Curculionidae) in the Kenya highlands. Journal of Stored Products Research 7, 69-72.

- Grootea, D. H., Kimenjua, S.C., Likhayob, P., Kanampiua, F., Teferaa, T., Hellin, J., 2013. Effectiveness of hermetic systems in controlling maize storage pests in Kenya. *Journal of Stored Products Research* 53, 27–36.
- Isman, M.B., 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology* 51, 45–66.
- Isman, M.B., Koul, O., Luczynski, A., Kaminski, J., 1990. Insecticidal and antifeedant bioactivities of neem oils and their relationship to azadirachtin content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38, 1406–1411.
- Karbache, F., Mouhouche, F., Fleurat-Lessard, F., 2011. Deterrent and insecticidal properties of bean seed (*Phaseolus vulgaris* L.) whole meal or protein extract incorporated into the diet of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research* 47, 197-203.
- Koodalingam, A., Mullainadhan, P., Arumugam, M., 2011. Effects of extract of soapnut *Sapindus emarginatus* on esterases and phosphatases of the vector mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Acta Tropica*. 118, 27-36
- Li, Y., Yin, Q., Ding, M., Zhao, F., 2009. Purification, characterization and molecular cloning of a novel endo- $\beta$ -1,4-glucanase AC-EG65 from the mollusc *Ampullaria crosseana*. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 153, 149-156.
- Liu, Z.L., Goh, S.H., Ho, S.H., 2007. Screening of Chinese medicinal herbs for bioactivity against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium castaneum* (Herbst). *Journal of Stored Products Research* 43, 290-296.
- Lowry, D.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randal, R.J., 1951 Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
- Macedo, M.L.R., Oliveira, C.F.R., Oliveira, C.T., 2015. Insecticidal Activity of Plant Lectins and Potential Application in Crop Protection. *Molecules* 20, 2014-2033.

- Napoleão, T.H., Belmonte, B.R., Pontual, E.V., Albuquerque, L.P., Sá, R.A., Laura, L.M., Coelho, L.C.B.B., 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.
- 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., 2011. Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65, 52-59.
- 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.F., Paiva, P.M.G., 2012. Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. *Parasitology Research* 110, 609-616.
- Oliveira, C.T., Kunz, D., Silva, C.P., Macedo, M.L.R., 2015. Entomotoxic properties of *Dioclea violacea* lectin and its effects on digestive enzymes of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera). *Journal of Insect Physiology* 81, 81–89.
- Paes, M.C.D., 2006. Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho. Circular Técnica n° 75. Sete Lagoas, MG, Embrapa.
- Paiva, P.M.G., Coelho, L.C.B.B., 1992. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology* 36, 113-118.
- Paiva, P.M.G., Pontual, E.V., Napoleão, T.H. and Coelho, L.C.B.B. (2013) Lectins and trypsin inhibitors from plants: Biochemical characteristics and adverse effects on insect larvae. New York: Nova Science Publishers, Inc.

- Perez-Mendonza, J., 1999. Survey of insecticide resistance in Mexican populations of maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research* 35, 107-115.
- 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., 2015. *Schinus terebinthifolius* Leaf Extract Causes Midgut Damage, Interfering with Survival and Development of *Aedes aegypti* Larvae, *PLoS ONE* 10, 5.
- Ranum, P., Peña-Rosas, J. P., Garcia-Casal, M. N., 2014. Global maize production, utilization, and consumption. *Ann. N.Y. Acad. Sci* 1312, 105-112.
- Reed, C., Doyungan, S., Ioerger, B., Getchell, A., 2007. Response of storage molds to different initial moisture contents of maize (corn) stored at 25°C, and effect on respiration rate and nutrient composition. *J. Stored Prod. Res* 43, 443-458.
- Sá, R.A. et al., 2008. Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. *International Biodeterioration and Biodegradation* 62, 460-464.
- Sá, R.A. et al., 2009. Larvicidal activity of *Myracrodruon urundeuva* lectins on *Aedes aegypti*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C, Toxicology and Pharmacology*. 149: 300-306.
- Tan, L.U.L., Mayers, P., Saddler, J.N., 1987. Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Canadian Journal of Microbiology* 33, 689–694.
- Tavares, W.S., Freitas, S.S., Graziottin, G.H. Parente, L.M.L., Lião, L.M., Zanuncio, J.C., 2013. Ar-turmerone from *Curcuma longa* (Zingiberaceae) rhizomes and effects on *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Industrial Crops and Products* 46, 158– 164.

- Tefera, T., Kanampiu, F., De Groote, H., Hellin, J., Mugo, S., Kimenju, S., Beyene, Y., Boddupalli, P.M., Shiferaw, B., Banziger, M., 2011. The metal silo: An effective grain storage technology for reducing post-harvest insect and pathogen losses in maize while improving smallholder farmers' food security in developing countries. *Crop Protection* 30, 240-245.
- Trematerra, P., Ianiro, R., Athanassiou, C.G., Kavallieratos, N.G., 2013. Behavioral responses of *Sitophilus zeamais* Motschulsky adults to conditioned grain kernels. *J. Stored Prod. Res* 53, 77-81.
- Vasconcelos, I.M., Oliveira, J.T.A., 2004. Antinutritional properties of plant lectins. *Toxicon* 44, 385-403.
- Wood, T.M., Bhat, M.K., 1988. Methods for measuring cellulase activities. In: Wood, W.A., Kellogg, S.T. (Eds.) *Methods in Enzymology*, Vol. 160. Academic Press Inc., London, pp. 87-112.
- Xie, Y.S., Bodnaryk, R.P., Fields, P.G., 1996. A rapid and simple flour-disk bioassay for testing substances active against stored-product insects. *Canadian Entomology* 128, 865-875.
- Yau, T., Dan, X., Ng, C.C.W., Ng, T.B., 2015. Lectins with Potential for Anti-Cancer Therapy *Molecules* 203, 791-3810.

## 6. CONCLUSÃO

Extratos e lectinas de entrecasca e cerne de *M. urundeuva* exerceram efeitos antinutricionais sobre adultos de *S. zeamais*, afetando a conversão do alimentado ingerido em biomassa e interferindo na atividade de enzimas digestivas; adicionalmente, a lectina do cerne (MuHL) apresentou efeito deterrente. Dessa forma, ambos extratos e lectinas apresentam potencial para uso no controle dos danos causados por esse inseto-praga.