



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CAMILA AZEVEDO FERREIRA

INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO DE FLORES DE *Moringa oleifera* Lamarck (MORINGACEAE) NA SOBREVIVÊNCIA E ATIVIDADE DE ENZIMAS DIGESTIVAS DE LARVAS DE *Plutella xylostella* Linnaeus (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE)

RECIFE

2019

CAMILA AZEVEDO FERREIRA

INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO DE FLORES DE *Moringa oleifera* Lamarck (MORINGACEAE) NA SOBREVIVÊNCIA E ATIVIDADE DE ENZIMAS DIGESTIVAS DE LARVAS DE *Plutella xylostella* Linnaeus (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Orientador: Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual

Coorientador: Msc. Welton Aaron de Almeida

RECIFE

2019

CAMILA AZEVEDO FERREIRA

INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO DE FLORES DE *Moringa oleifera* Lamarck (MORINGACEAE) NA SOBREVIVÊNCIA E ATIVIDADE DE ENZIMAS DIGESTIVAS DE LARVAS DE *Plutella xylostella* Linnaeus (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE)

Área de concentração: Ciências Biológicas

Data de defesa: 01/02/2019

Resultado: _____

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual (Presidente)

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

Profa. Dra. Jeine Emanuele Santos da Silva (1° Titular)

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

Msc. Lic. Isabella Coimbra Vilanova (2° Titular)

Departamento de bioquímica da UFPE

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C183i Ferreira, Camila
INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO DE FLORES DE Moringa oleifera Lamarck (MORINGACEAE)
NA SOBREVIVÊNCIA E ATIVIDADE DE ENZIMAS DIGESTIVAS DE LÁRVAS DE *Plutella xylostella* Linnaeus
(LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) / Camila Ferreira. - 2019.
46 f. : il.
- Orientador: Emmanuel Viana Pontual.
Coorientador: Welton Aaron de Almeida.
Inclui referências e anexo(s).
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em
Ciências Biológicas, Recife, 2021.
1. atividade larvicida. 2. inseticidas naturais. 3. inibidor de protease. 4. traça-das-brássicas. I. Pontual, Emmanuel
Viana, orient. II. Almeida, Welton Aaron de, coorient. III. Título

CDD 574

DEDICATÓRIA

Dedico esta monografia à minha família, em especial aos meus pais Noara Leão e Antonio Ferreira pelo apoio e incentivo para ir atrás dos meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse, dando sempre forças para continuar firme, guiando, mostrando as oportunidades e dando a graça de ter colocado pessoas tão especiais em minha vida, não só na caminhada universitária, mas no âmbito pessoal.

A toda minha família, a minha mãe, meu pai e meu irmão Artur por todo amor, investimento, por ter sido sempre minha base me fortalecendo e incentivando sempre a buscar ser uma pessoa melhor. Às minhas tias Niara e Nilma pela contribuição valiosa que me deram, permitindo chegar onde cheguei. E sem esquecer do meu xodó, Penelope, por ter sido inúmeras vezes minha companheira de estudos e por sempre me confortar apenas com sua presença.

Agradeço também ao melhor Orientador que poderia ter tido, Emmanuel Pontual. Por ter me dado oportunidade tanto de trabalhar quanto de conhecer melhor essa pessoa de coração enorme. Por sempre tá disposto a ensinar e dar o seu melhor com toda paciência do mundo e que desde o início acreditou e me orientou nessa caminhada. Orgulho e Gratidão é a palavra que define.

Ao meu Coorientador Welton Almeida, que desde o início sempre esteve presente e disposto a ajudar no que fosse preciso. Doando tempo para tirar dúvidas, auxiliar nos testes, na correção dos textos, na manutenção da criação junto com a gente. Meu muito obrigada por toda dedicação e ajuda de sempre.

A todos da equipe do Controle, Erasmo, Isabella e Pedro pelo companheirismo, pelos conhecimentos compartilhados, pela disponibilidade de ajudar sempre que pode. Sou muito grata à vocês, de verdade. Ao prof. Reginaldo, as meninas, Elaine e Franciny por todo suporte que nos deram.

Aos todos meus amigos que tornaram essa caminhada mais leve, Giovanna e Luís (meu trio ternura) que desde o início esteve comigo, os que pude contar pra tudo por muito tempo e que foram essenciais pra mim. Geise e Yago, pois, nas muitas vezes que me peguei desesperada com algum assunto, os dois sempre, com todo carinho e paciência, me tranquilizavam e passavam seus conhecimentos. A Erasmo mais uma vez, agradeço pela parceira e pelos momentos que pude contar contigo e essa parceria sempre foi recíproca. A Ana e Rodrigo pelas tardes juntos na biblioteca e no laboratório que por muitas vezes foi meu incentivo de ir à rural. A Lívia, Luiz e todos da galera uh ó pelas risadas e calouradas que curtimos juntos. Queria dizer que sem vocês essa caminhada não teria tido graça nenhuma e que cada um de vocês foram e são muito importante pra mim. Obrigada!

Agradeço ao Prof. Thiago Napoleão por disponibilizar e ajudar nos testes realizados no laboratório BIOPROT da Universidade Federal de Pernambuco junto com Isabella e Robson.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco por ser essa instituição que oferece estrutura, oportunidade e possui excelentes profissionais. Por ter o melhor R.U (restaurante universitário) com comidas deliciosas e funcionários dedicados. Todo meu carinho, afeto e gratidão por essa universidade.

Ao PIBIC/CNPq/UFRPE pelos 3 anos de bolsa de Iniciação Científica, ao CNPq (UNIVERSAL MCTI/CNPq 01/2016; Processo: 408789/2016-6) pelo fomento a esta pesquisa e à FACEPE pela bolsa de Treinamento de Técnico (Processo: BTT-0010-2.08/18).

A todos da banca examinadora por ter aceitado meu convite e pelas contribuições e observações feitas para o enriquecimento do meu trabalho.

EPÍGRAFE

“Seja forte, acredite, lute, conquiste, vibre, tenha sorte, mas não esqueça de aceitar a sua derrota.

há momentos na vida que devemos ser um pouco de tudo, é como um prato do chefe com uma pitada de cada coisa que sairá uma bela refeição, é assim que devemos nos portar diante da vida.

Existe aquele triste momento que você perde, você se ilude, você erra e você chora. Tudo isso faz parte do momento, porém é nessa hora que precisará de força para continuar, humildade para levantar, e determinação para seguir em frente e capacidade de entender que, acaba de acontecer mais um aprendizado.

Existe também aquele belo momento que você conquista, você vence, você cresce, porém é nessa hora que mostrará sua humildade diante dos fatos, mostrará o grande ser humano que tu és diante da conquista com o respeito que lhe cabe!

A vida resume-se em uma frase:

Continuar em frente, recupere-se do que passou, prepare-se para o que virá, seja forte para cair novamente e se levantar rápido o suficiente para não deixar nenhum momento da sua vida passar.” (Milorde)

RESUMO

Plutella xylostella é uma praga agrícola multirresistente que ataca plantações de brássicas no Brasil e no mundo. A utilização de produtos naturais com propriedades inseticidas para controle de *P. xylostella* pode ser vantajosa devido ao maior grau de degradabilidade e menor persistência no ambiente desses compostos quando comparados aos efeitos dos inseticidas sintéticos. *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae) é uma planta pantropical que sintetiza proteínas (lectinas e inibidor de tripsina) cuja atividade inseticida tem sido relatada. No presente trabalho, o extrato de flores de *M. oleifera* contendo inibidor de tripsina (MoFTI, do inglês *Moringa oleifera flower trypsin inhibitor*) foi investigado quanto à presença de peptídeos resistentes à hidrólise por proteases digestivas e efeito na sobrevivência das larvas do terceiro instar (L₃) e atividade de proteases do intestino médio dessas larvas de *P. xylostella*. O extrato de flores apresentou um polipeptídeo de alto peso molecular que foi resistente à hidrólise por proteases intestinais das larvas até 270 min de incubação, revelado por eletroforese em gel de poli(acrilamida). As larvas foram sensíveis ao tratamento com o extrato e a curva de mortalidade revelou uma resposta dose dependente, seguindo uma regressão polinomial de ordem 2 com valor de $R^2 = 0,99$. A taxa máxima de mortalidade ($60 \pm 10\%$) das larvas foi obtida para o extrato a 2% (m/v). Os adultos que emergiram do tratamento com o extrato de flores apresentaram alterações morfológicas, incluindo atrofia das asas e incapacidade de locomoção. Adicionalmente, alguns insetos não foram capazes de abandonar o casulo após o término da fase de pupa. As atividades de proteases totais e de tripsina-símile do intestino das larvas foram reduzidas em $67,75 \pm 0,64\%$ e $65,83 \pm 6,3\%$ pelo extrato de flores a 0,8% e 1% (m/v), respectivamente. Não foi detectado efeito deterrente alimentar quando larvas foram alimentadas com discos de couve tratados com o extrato a 0,5 e 1%. Em conclusão, o extrato de flores de *M. oleifera* é agente inseticida contra *P. xylostella* por causar mortalidade das larvas e malformações nos insetos adultos. O efeito larvicida do extrato de flores pode estar relacionado à inibição de enzimas que atuam nos processos digestivos em *P. xylostella*.

Palavras-chave: atividade larvicida, inseticidas naturais, inibidor de protease, traça-das-brássicas.

ABSTRACT

Plutella xylostella is a multiresistant agricultural pest that attacks brassica plantations in Brazil and worldwide. The use of natural products with insecticidal properties to control *P. xylostella* may be advantageous due to the higher degree of degradability and lower persistence of these compounds in the environment when compared with the effects of synthetic insecticides. *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae) is a pantropical tree that synthesizes proteins (lectins and trypsin inhibitor) whose insecticidal activity has been reported. In the present work, the *M. oleifera* flower extract containing trypsin inhibitor (MoFTI, *M. oleifera* flower trypsin inhibitor) was investigated for the presence of peptides resistant to hydrolysis by digestive proteases and effect on survival and protease activity from midgut of *P. xylostella* third instar larvae (L₃). The flower extract showed a high molecular weight polypeptide, which was resistant to hydrolysis by larval gut proteases up to 270 min incubation, revealed by polyacrylamide gel electrophoresis. The larvae were sensitive to the treatment with the extract and the mortality curve revealed a dose dependent response following a polynomial order 2 regression with $R^2 = 0.99$. The maximum mortality rate ($60 \pm 10\%$) of larvae was obtained for the extract at 2% (w/v). The adults who emerged from treatment with flower extract showed morphological alterations, including atrophy of the wings and inability to move. In addition, some insects were not able to abandon the cocoon after the end of the pupal phase. The total protease and trypsin-like activities from larval gut were reduced in $67.75 \pm 0.64\%$ and $65.83 \pm 6.3\%$ by the flower extract at 0.8% and 1%, respectively. Deterrent alimentary effect was not detected when the larvae were reared with cabbage discs treated with the extract at 0.5 and 1%. In conclusion, the *M. oleifera* flower extract is a larvicidal agent against *P. xylostella* by cause larval mortality and malformations in adult insects. The larvicidal effect of the flower extract may be linked to the inhibition of enzymes important for the digestive processes of *P. xylostella*.

Keywords: larvicidal activity, natural insecticides, protease inhibitors, diamondback moth.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo Biológico da *Plutella xylostella*, compreendendo a fase de ovo, larva (constituído por quatro instares), pupa e adulto.....17
- Figura 2.** Imagem da *Moringa Oleifera* mostrando sua folhagem da árvore e a flor utilizadas para produção do extrato vegetal.....26
- Figura 3.** Aspecto do ensaio larvicida em placas de Petri e com o disco de couve (3 cm de diâmetro), onde larvas no estágio L₁ foram adicionadas.....32
- Figura 4.** Atividade inibidora de tripsina no extrato de flores de *M.oleifera*. O asterisco indica diferença significativa em relação ao controle determinada pelo teste T de Student ($p < 0,05$)34
- Figura 5.** Investigação da resistência dos componentes do extrato de flores de *M. oleifera* à hidrólise pelas proteases do intestino de larvas de *P. xylostella* no terceiro instar (L₃). O extrato de intestino das larvas (1), o extrato de flores (2) e o extrato de flores após incubação com as proteases do intestino das larvas por 5, 15, 30, 90, 270, 1.440 min (3 a 8, respectivamente) foram aplicados em um gel de eletroforese em policrilamida (12%), corado com azul de Coomassie em ácido acético 10% (0,02%, v/v).....34
- Figura 6.** Efeito do extrato de flores de *M. oleifera* na sobrevivência e desenvolvimento de larvas de *P. xylostella*. (A) Mortalidade de larvas tratadas com o extrato de flores. (B) Adultos emergidos de larvas que sobreviveram ao ensaio larvicida. (1) Inseto controle. (2) Insetos emergidos a partir de larvas tratadas com extrato de flores a 2% (m/v) apresentando malformações nas asas (2, 3 e 4) ou incapacidade de abandonar o casulo (2 e 3).....35

Figura 7. Efeito do extrato de flores de *M. oleifera* na atividade de proteases do intestino de L₃ de *P. xylostella*. (A) Efeito do extrato de flores sobre a atividade proteolítica total do extrato de intestino de L₃. (B) Efeito do extrato de flores sobre a atividade de tripsina do extrato de intestino de L₃. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste T de Student ($p < 0,05$)36

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Inseticidas utilizados para controle de populações de *P. xylostella*.....20
- Tabela 2.** Taxa de consumo (%) por L₃ de *P. xylostella* dos discos de folhas de couve tratados com o extrato de flores de *M. oleifera*. A concentração do extrato de flores foi expressa em percentual (massa seca/volume). Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$ pelo teste T de Student.....36

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Brassicaceae.....	15
2.2 <i>Plutella xylostella</i>	16
2.3 Inseticidas Naturais.....	22
2.3.1 Inibidores de proteases.....	24
2.4 <i>Moringa oleifera</i>	25
3. OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivos Gerais.....	28
3.2 Objetivos Específicos.....	28
4. METODOLOGIA.....	29
4.1 Obtenção do extrato de flores de <i>M. oleifera</i>	29
4.2 Caracterização do extrato de flores de <i>M. oleifera</i> quanto á presença de atividade inibidora de tripsina.....	29
4.3 Obtenção de preparações de intestino de L ₃ contendo atividade enzimática.....	30
4.4 Investigação da resistência do extrato de flores à degradação por proteases digestivas de L ₃	31

4.5 Efeito do extrato de flores de <i>M. oleifera</i> na sobrevivência de L ₃ de <i>P. xylostella</i>	31
4.6 Efeito do extrato de flores de <i>M. oleifera</i> sobre a atividades de proteases totais e tripsina-símile do intestino de L ₃	32
4.7 Investigação do efeito deterrente alimentar do extrato de flores de <i>M. oleifera</i> para L ₃ de <i>P. xylostella</i>	32
4.8Análise estatística.....	33
5. RESULTADOS.....	33
6. DISCUSSÃO.....	37
7. CONCLUSÃO.....	40
8. REFERÊNCIAS.....	41

1. INTRODUÇÃO

Plutella xylostella Linnaeus (Lepidoptera: Plutellidae) é uma praga agrícola multirresistente e popularmente conhecida como traça-das-brássicas, sendo responsável por prejudicar o cultivo comercial de *Brassica oleracea* conhecida (Brassicaceae) no Brasil (DICKSON et al., 1990). É um inseto de ciclo curto, cuja temperatura ambiental é fator determinante, pois em condições de temperaturas mais elevadas o ciclo se completa em torno de 12 dias, enquanto em períodos frios esse tempo varia de 15 a 20 dias. O número de gerações da *P.xyostella* está em torno de 5 a 10 por ano, dependendo das condições climáticas e da disponibilidade de alimento, o que faz com que a densidade populacional dessa praga varie muito de um ano a outro (CASTELO BRANCO & VILLAS BÔAS 1997; DIAS et al., 2004).

O ciclo biológico de *P. xylostella* se inicia quando as fêmeas ovipositam, preferencialmente na face inferior de folhas de brássicas. A partir dos ovos, eclodem as lagartas de primeiro instar (L₁) que “minam” as folhas, alimentando-se do parênquima por dois ou três dias. Ainda no estágio L₁, as larvas abandonam as “minas” e passam a alimentar-se da epiderme, perfurando as folhas e inutilizando-as para a comercialização. Após os três instares subsequentes (L₂, L₃ e L₄), as lagartas atingem a fase de pupa no interior de um pequeno casulo de seda produzido por elas localizado na face inferior das folhas (IMENES et al., 2002).

Tem sido amplamente relatado que *P. xylostella* desenvolveu resistência aos inseticidas químicos atualmente utilizados e, por isso, a busca por novas medidas de controle economicamente viáveis e mais ecologicamente corretas tem crescido (CASTELO BRANCO & FRANÇA, 2001; THULER, 2006)

Moringa oleifera Lamarck (Moringaceae), nativa do norte da Índia, é atualmente encontrada em vários países dos trópicos, estando adaptada a climas úmidos e quentes e podendo sobreviver em solos pouco férteis e secos. Seu crescimento é rápido, porém não alcança grandes alturas e é considerada um arbusto ou árvore de pequeno porte. Inicialmente, foi introduzida no Brasil como planta ornamental. (KARADI et al., 2006; ANWAR et al., 2007; MATOS, 1998).

A moringa é uma hortaliça perene e o forte investimento no seu cultivo se deve à

reconhecida capacidade de adaptação a condições edafoclimáticas adversas, aliadas à possibilidade de aproveitamento das folhas, frutos verdes, flores e sementes, os quais apresentam quantidades representativas de nutrientes (OKUDA et al., 2000). Diversos programas de divulgação no Brasil têm sido realizados visando estimular o plantio e utilização da moringa com o objetivo de explorar o seu forte potencial biotecnológico (FERREIRA, 2008).

As sementes de *M. oleifera* contêm lectinas com atividade inseticida (COELHO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011) e suas flores apresentam antioxidantes, lectinas, inibidor de tripsina e alcaloides antimicrobianos (LIZZY et al., 1968; SÁNCHEZ-MACHADO et al., 2006; SANTOS et al., 2009; BIJINA et al., 2011; MOURA et al., 2011). Relatos prévios mostraram que o extrato aquoso de flores de *M. oleifera* é agente larvicida para *Aedes aegypti* (PONTUAL et al., 2012; PONTUAL et al., 2014).

Com base no potencial inseticida do extrato aquoso de flores de *M. oleifera* previamente relatado, esta monografia avaliou a hipótese de que esta preparação pode também ser tóxica para larvas de *P. xylostella*. Nesse sentido, o extrato de flores de *M. oleifera* contendo inibidor de tripsina (MoFTI, do inglês *Moringa oleifera* flower trypsin inhibitor) foi investigado quanto à presença de peptídeos resistentes à hidrólise por proteases digestivas de larvas de *P. xylostella* no terceiro instar (L₃) e efeito na sobrevivência e atividade de proteases do intestino médio das larvas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Brassicaceae

O gênero *Brassica* (família Brassicaceae) comporta cerca de 400 gêneros e 4.000 espécies possuindo distribuição cosmopolita. No Brasil, está representado por 10 gêneros que contém cerca de 50 espécies distribuídas do norte ao sul do país (SOUZA; LORENZI, 2005). 8 dentre os 10 gêneros descritos no Brasil bem como 11 de suas espécies ocorrem no Estado de São Paulo. O grupo das brássicas, antigamente conhecido como crucíferas, compreende seis espécies de importância econômica, entre as quais destaca-se *B. oleracea*, com diferentes variedades botânicas (CARDOSO, 2007; SILVA, 2009). Dentre as variedades de *B. oleraceae* destacam-se a couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), o repolho (*B. oleracea* var. *capitata*) e o brócolis (*B. oleracea* var. *italica*), por serem os mais cultivados e consumidos (FILGUEIRA, 2013). Nas avaliações descritas no presente trabalho, foram utilizados exemplares de couve manteiga (*B. oleracea* var. *acephala*), a qual possui grande valor nutricional devido à grande quantidade dos íons ferro e cálcio, vitaminas A, C e E, carotenoides, ácido fólico, dentre outros nutrientes.

As culturas brássicas exibem enorme diversidade e são usadas como fonte de óleos vegetais, condimentos de mostarda e forragem. Em sua maioria podem ser anuais, bienais ou perenes, sendo visivelmente lenhosas. Possuem maioritariamente um porte herbáceo, podendo existir alguns arbustos e trepadeiras. As suas folhas são permanentemente verdes e surgem normalmente de forma alterna, raramente surgindo de forma oposta. (BASU, S., & CETZLL-IX, W, 2014) A depender das condições ambientais, espécies anuais de brássicas podem variar bastante seu tamanho. Essas espécies apresentam alto teor de água e baixo teor de lipídeos e carboidratos e, conseqüentemente, reduzidas propriedades calóricas (VILAR et al., 2008), além de apresentar ação anticarcinogênica atribuída ao conteúdo de glucosinolatos, flavonoides, vitaminas e nutrientes minerais (MORENO et al., 2006; AZEVEDO et al., 2016).

Devido a essas reconhecidas propriedades nutricionais, nas últimas duas décadas, as culturas de Brassicaceae têm sido o foco de numerosas pesquisas baseadas em seus

benefícios para a saúde humana (TRAKA e MITHEN, 2009; VERKERK et al., 2009). A maioria dessas pesquisas tem se concentrado no teor de metabólitos secundários, principalmente os glucosinolatos referidos no parágrafo anterior. Estes compostos têm sido considerados de grande utilidade médica, pois quando metabolizados geram os isocianatos, os quais conferem proteção para as células por apresentarem ação antioxidante e ativarem enzimas envolvidas na detoxificação hepática.

A produção de Brassicaceae tem alta suscetibilidade a insetos-praga, incluindo especialmente as ordens Lepidoptera, Diptera, Coleoptera e Hemiptera (FREE e WILLIAMS, 1979; JOSHI et al., 1989; RATANPARA et al., 1992; BUCKLES et al., 1998). Uma vez que o grupo das brássicas compreende vegetais economicamente importantes pelo seu alto valor nutricional e presença de metabólitos importantes para a saúde humana, a demanda por novos agentes para controle de populações de pragas que não alterem as propriedades do vegetal e sejam menos tóxicos para os consumidores tem crescido.

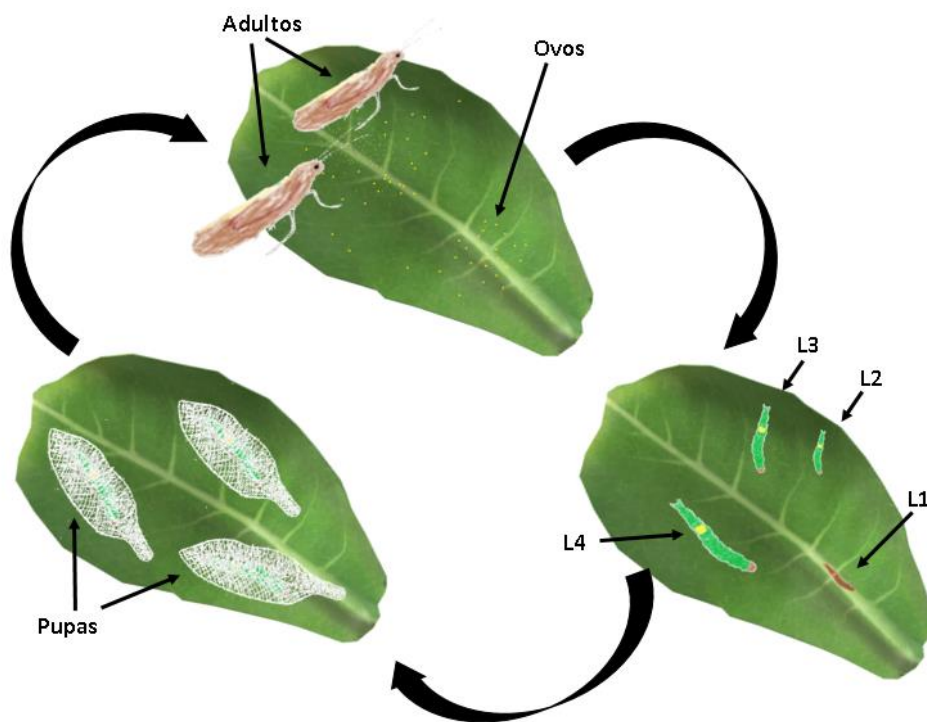
Como o uso de inseticidas sintéticos para proteção de culturas vegetais em geral tende a ser cada vez mais restrito, há um aumento no interesse em métodos alternativos de controle de pragas, como o uso de plantas resistentes ou estratégias integradas de cultivo nos quais metabólitos (primários ou secundários) da planta podem melhorar a proteção da cultura (AHUJA et al., 2010).

2.2 *Plutella xylostella*

A origem da *Plutella xylostella* Linnaeus (Lepidoptera: Plutellidae), popularmente conhecida como traça-das-brássicas, foi provavelmente a região do Mediterrâneo, também centro de origem das Brássicas, vegetais atacados por essa praga. Atualmente, *P. xylostella* está disseminada em todos os continentes, acompanhando a ocorrência das culturas de brássicas (FILGUEIRA, 1987; MONNERAT, 1995). No Brasil, o primeiro registro ocorreu na Bahia (BONDAR, 1928); atualmente, sua ocorrência é observada durante todo o ano em praticamente todos os campos onde são cultivadas brássicas (SIQUEIRA, 1981; CASTELO BRANCO e GUIMARÃES, 1990; MELO et al., 1994; LOGES et al., 1996).

O ciclo biológico de *P. xylostella* está representado na Figura 1. Cada fêmea deposita, durante seu ciclo, uma média de 18 a 350 ovos, isolados ou em grupos de dois ou três (MONNERAT, 1995; CASTELO BRANCO et al., 1997; GALLO et al., 2002). Esse número de ovos por fêmea é influenciado pelo fotoperíodo, pela temperatura e pelas condições de alimentação durante a fase larval (HARCOURT, 1957). Os ovos são pequenos, alaranjados e são depositados na parte inferior das folhas de brássicas (GALLO et al., 2002). Dos ovos, eclodem lagartas, sendo a fase larval composta por quatro instares denominados L₁, L₂, L₃ e L₄ (MONNERAT, 1995).

Figura 1. Ciclo Biológico de *Plutella xylostella* compreendendo a fase de ovo, lagarta (quatro instares larvais denominados L₁ a L₄), pupa e adulto.



Fonte: Arquivo Pessoal

Imediatamente após a eclosão das larvas (fase L₁), estas penetram no interior das folhas onde ficam de 2 a 3 dias alimentando-se do parênquima. Em seguida, abandonam a

galeria, ainda no primeiro instar (L₁) estágio inicial da lagarta, e passam a alimentar-se da epiderme do interior da folha. Com isso, inutilizam as folhas para consumo e comercialização (MONNERAT, 1995; CASTELO BRANCO e VILLAS BOAS, 1997; GALO et al., 2002). As lagartas comem a folha, exceto as nervuras; em alguns casos alimentam-se somente da epiderme inferior criando um efeito de transparência. No quarto e último instar a lagarta é mais voraz, causando mais prejuízos que nos primeiros estágios (MAU e KESSING, 2007).

As lagartas de primeiro e segundo instares possuem coloração preta, distinta do marrom-esverdeado da cabeça das lagartas de terceiro e quarto instares. As lagartas de quarto instar atingem o tamanho máximo de 8 a 10 mm de comprimento após 9 a 10 dias da eclosão (CASTELO BRANCO e VILLAS BOAS, 1997; MONNERAT, 1995; GALO et al., 2002). Diante das condições, o período da fase larval muda a 28° C, podendo durar de 6 a 30 dias (MAU; KESSING, 2007) ou de 7 a 11 dias (MEDEIROS et al., 2006). Ao final do quarto instar larval se inicia a confecção de um tênue casulo de seda branca (Figura 1) que irá abrigar a pupa, o qual é fixado na face inferior das folhas ou em áreas da planta mais protegidas (MONNERAT, 1995).

Após a fase de pupa, emergem os adultos como mariposas, microlepdópteros de coloração parda que apresentam cerca de 10 mm de comprimento. Quando suas asas estão fechadas, é possível observar no dorso, um desenho prismático branco que lembra um diamante esculpido, característica responsável pelo seu nome popular na língua inglesa (*diamondback moth*) que em português significa “traça de diamante” (SILVA JUNIOR, 1987).

Machos e fêmeas de *P. xylostella* apresentam hábitos noturnos e são do mesmo tamanho e ocorrem na razão sexual de 1:1. As fêmeas vivem de 7 a 47 dias, enquanto os machos vivem de 3 a 58 dias. A oviposição começa normalmente no dia da emergência dos adultos com duração aproximada de 10 dias, ocorrendo um pico na primeira noite de oviposição, exceto quando a temperatura ao pôr-do-sol estiver abaixo de 18,89° C.

O controle de populações de *P. xylostella* tem sido realizado utilizando principalmente compostos sintéticos, os quais pertencem a diferentes classes de inseticidas

(AGROFIT, 2017). Os chamados inseticidas neurotóxicos (Tabela 1) são os mais abundantes no mercado (IRAC, 2016; AGROFIT, 2017). Neste grupo, há vários produtos que atuam sobre canais de sódio. Estes são responsáveis pela iniciação e disseminação do potencial de ação nas células excitáveis. Em condições fisiológicas, após a chegada do estímulo e abertura dos canais de sódio dependentes da voltagem, ocorre a despolarização e os canais se tornam momentaneamente inativos. Quando os canais de sódio estão sob a ação de inseticidas do grupo dos piretróides, essa inativação ocorre com atraso, o que permite a entrada contínua de sódio para dentro da célula, mesmo após a despolarização. Como consequência, o processo de repolarização se torna mais lento, resultando em paralisia nervosa tanto ao nível do sistema nervoso central quanto do periférico.

Um representante do grupo dos piretróides que é historicamente importante é o (Dicloro-Difenil-Tricloroetano) DDT, o qual teve o uso descontinuado e a comercialização proibida devido à sua baixa seletividade e consequente alta toxicidade para espécies não alvo. As oxadiazinas também atuam bloqueando os canais de sódio, o que acarreta na interrupção imediata das funções do inseto, inclusive do seu comportamento alimentar (TOSHIO, 1992; WING et al, 2010). *P. xylostella* foi o primeiro inseto a apresentar resistência ao DDT, logo após 3 anos da sua liberação (ANKERSMIT, 1953). Foi relatada também a ocorrência de populações de *P. xylostella* resistentes a outros inseticidas, incluindo spinosad, avermectinas (cartap e abamectin), indoxacarbe, metaflumizone e diamidas (flubendiamida e o clorantraniliprol) (WANG, 2011; WING, 2010; WANG et al., 2016).

Indoxacarbe é uma oxadiazina cujo efeito ocorre após sua ativação metabólica por meio da ação de enzimas esterases ou amidases que clivam um grupo de ligação da ureia, libertando ureia livre (WING et al., 2000; SILVER et al., 2010). A atividade enzimática responsável por esse mecanismo de ação é encontrada em níveis elevados nos intestinos médios e nos tecidos gordurosos dos insetos (WING et al., 2000). Esse modo de ação relaciona-se com o surgimento dos sintomas de neurointoxicação, variando de pequenas convulsões até a paralisia seguida de morte (WING et al., 1998; WING et al., 2000; SILVER et al., 2010).

Tabela 1. Inseticidas utilizados para controle de populações de *P. xylostella*.

Inseticidas		Mecanismo de ação	Efeito
Classe	Composto		
Diamidas	Flubendiamida	Ativadores do receptor de rianodina (RyR) no retículo sarcoplasmático de insetos.	Paralisia de contração muscular irreversível e interrupção da alimentação característica
	Clorantranilipro		
Naturais	<i>Bacillus thuringiensis</i>	A toxina Cry é inserida na membrana do intestino dos insetos, paralisando o seu trato digestivo e formando poros.	Desnutrição e morte por inanição.
Tiocarbamatos	Cartap	Alteração da conformação do receptor da acetilcolina, impedindo a transmissão do impulso nervoso.	Paralisia e morte do inseto.
Avermectinas	Abamectin	Liga-se a receptor específico na membrana pós-sináptica, estimulando o influxo de Cl ⁻ para as células nervosas.	Hiperpolarização e paralisia do Sistema neuromuscular.
Oxadiazina	Indoxacarbe	Bloqueador dos canais de sódio.	Pequenas convulsões até a paralisia seguida de morte

Os inseticidas diamidas flubendiamida (Fenos®) e clorraniliprole (Prevathon®) foram registrados nas Filipinas em 2006 e 2007, respectivamente. Flubendiamida e clorraniliprol atuam por ativação seletiva do receptor de rianodina (RyR) no retículo sarcoplasmático dos insetos. A função desses canais é a liberação rápida de Ca^{2+} das reservas intracelulares, necessária para a contração muscular. (NAUEN, 2006, EBBINGHAUS-KINTSCHER et al., 2006, EBBINGHAUS-KINTSCHER et al., 2007, CORDOVA et al., 2006). Esta potente ativação de RyRs resulta em uma rápida eficácia inicial nas larvas de insetos, com uma sintomatologia única de paralisia de contração muscular irreversível e interrupção da alimentação característica (NAUEN, 2006). A população de *P. xylostella* na Tailândia mostrou pela primeira vez evidências de resistência à flubendiamida e resistência cruzada ao clorraniliprol apenas 18 meses após o lançamento da flubendiamida. Adicionalmente, o Voliam Flexi®, uma pré-mistura de clorraniliprole e tiametoxam (um inseticida neonicotinóide), foi registrado em 2008. Os neonicotinóides atuam como agonistas dos receptores nicotínicos de acetilcolina nos insetos ao nível do receptor alfa4beta2.

P. xylostella foi o primeiro inseto com relatos de populações resistentes ao *Bacillus thuringiensis*, tendo sido feito este registro em 1980 (TABASHNIK et al., 1990; TABASHNIK, 1994). Em algumas populações de *P. xylostella* a resistência ao *B. thuringiensis* é atribuída à redução da ligação do receptor δ - endotoxina nas membranas de borda em escova das células epiteliais do intestino médio (VAN RIE et al., 1990; FERRÉ et al., 1991).

Foi também previamente relatada a ocorrência de populações de *P. xylostella* resistentes a abamectin e cartap. Cartap é um tiocarbamato que altera a conformação do receptor da acetilcolina, impedindo a transmissão do impulso nervoso e acarretando paralisia e eventual morte do inseto. Abamectin age ligando-se ao seu receptor específico na membrana pós-sináptica e estimulando o fluxo de Cl^- para o interior da célula nervosa. Atua apenas em receptores excitatórios dos nervos nos insetos (CASTELO BRANCO, M.; MELO, C.A., 2002)

A resistência de *P. xylostella* aos diversos agentes inseticidas evolui em razão da pressão de seleção constante que é imposta pelo uso excessivo ou não planejado desses

agentes, o que acarretou na limitada eficácia do composto em longo prazo e no aumento da frequência dos indivíduos “pré adaptados”, ou seja, daqueles indivíduos que expressam genes que conferem resistência (RIBEIRO, 2014). O estabelecimento de uma população de insetos resistentes ocorre, geralmente, quando estes organismos estão em quantidade suficiente para causar danos econômicos na cultura (FITT et al., 2006). Há diversos mecanismos fisiológicos pelos quais os insetos podem expressar resistência aos inseticidas (OMOTO; RISCO; SCHMIDT, 2017). No caso dos produtos químicos, as principais formas são: bloqueio da penetração cuticular do produto (NOPPUN; SAITO; MIATA, 1989), redução da sensibilidade nervosa do sítio de ação do produto (HAMA; KONO; SATO, 1987) e degradação enzimática (KAO; HUNG; SUN, 1989).

A dificuldade em controlar a densidade populacional de *P. xylostella* se deve em grande parte à multirresistência aos inseticidas atualmente utilizados. O controle químico não tem sido suficiente, logo uma combinação de outros mecanismos pode ser necessária (MAU e KESSING, 2007). Ainda, um programa de rotação de agentes inseticidas pode minimizar a seleção de insetos resistentes. A existência de produtos naturais, incluindo extratos de plantas capazes de inibir a oviposição por mariposas de *P. xylostella* é relatada desde a década de 1960 (GUPTA e THORSTEINSON, 1960). Nesse sentido, a busca por novos produtos naturais ativos contra *P. xylostella* têm crescido.

2.3 Inseticidas Naturais

Na agricultura atual, produtos derivados da indústria química (sintéticos) têm sido utilizados para controlar populações de insetos-praga. Contudo, estes vêm ocasionando efeitos deletérios para o ser humano e para o meio ambiente, os quais incluem intoxicações dos aplicadores e dos consumidores, aumento nos custos da produção agrícola, aparecimento de populações de pragas resistentes e contaminação ambiental (solo, água e produtos agrícolas) (SANTOS et al., 2013). Nesse sentido, alternativas menos prejudiciais ao ambiente e à saúde dos organismos não alvo têm sido cada vez mais necessárias, recebendo destaque o uso de substâncias naturais. Essas substâncias destacam-se por serem geralmente mais biodegradáveis e menos persistentes, assim oferecendo a possibilidade de

um controle mais seletivo e menos prejudiciais ao ambiente e seres vivos (CORRÊA & SALGADO, 2011).

As plantas produzem substâncias que podem afetar a biologia, o desenvolvimento e a reprodução dos insetos. A síntese dessas substâncias pode estar relacionada a uma função autoecológica de defesa. Essas funções podem envolver elementos do metabolismo primário (proteínas, carboidratos e lipídeos) e secundário (flavonoides, terpenoides, esteroides, dentre outros), presentes nos extratos vegetais ou óleos essenciais, com propriedades alelopáticas e inseticidas (SANTOS et al., 2013; OOTANI et al., 2013). Há na literatura internacional, relatos de proteínas com atividade inseticida que pertencem aos grupos das enzimas (tais como as quitinases), das lectinas e dos inibidores de enzimas (WINK, 2003). Na próxima seção desta revisão de literatura, será dada ênfase aos inibidores da enzima tripsina, a qual apresenta importante função nos vários grupos do reino animal, incluindo microrganismos, moluscos, insetos e vertebrados (BHATTACHARYYA, A., LEIGHTON, S. M., BABU, C. R., 2007)

O uso popular dos bioativos de plantas tem guiado as pesquisas em busca de novos agentes, os quais podem atuar nos estágios de eclosão dos ovos, desenvolvimento dos insetos e até inibir seu desenvolvimento. Também podem ser repelentes, atraentes e estimulantes ou inibidores de oviposição. (KABIR, 2013). Os repelentes de oviposição são interessantes para eliminar potenciais sítios de oviposição, bem como afastar fêmeas grávidas de seus reservatórios naturais (NERIO, 2010).

De fato, os métodos alternativos para controle de pragas parecem mais apropriados para pequenas áreas, pois a quantidade de material vegetal necessário para extração e produção de inseticidas à base de extratos vegetais, em grandes lavouras, pode tornar o seu uso inviável. Contudo, suas vantagens em relação aos inseticidas sintéticos são evidentes. De acordo com Roel (2001), os inseticidas naturais são obtidos de recursos renováveis e, como já mencionado, rapidamente degradáveis, o que pode acarretar na necessidade de um maior número de aplicações para obtenção da eficiência desejada. Adicionalmente, os extratos vegetais podem minimizar a seleção de insetos resistentes, tornando este processo mais lento, uma vez que essas substâncias são misturas complexas, compostas por mais de um princípio ativo. Outras vantagens são o fácil acesso e obtenção por agricultores e a

ausência de resíduos nos alimentos, além da praticidade na sua produção.

2.3.1 Inibidores de proteases

A tripsina é um exemplo importante de protease que foi descrita no final do século XIX, cuja atividade proteolítica foi detectada em secreções pancreáticas. Estudos posteriores revelaram que esta enzima hidrolisou ligações peptídicas C-terminal especificamente em resíduos de aminoácidos de lisina (Lys) e arginina (Arg). Assim, foi percebido que enzimas com atividade de tripsina, mesmo que extraídas de diferentes fontes, mais ou menos ativas, compartilham a característica de atuar sobre o mesmo substrato que corresponde a qualquer peptídeo que contenha Lys ou Arg na sua sequência primária, sendo sua atividade ótima entre os valores de pH 7,5 e 8,5 e na presença de Ca^{2+} . Essa especificidade permite à tripsina servir às funções digestivas e reguladoras, como agente digestivo, a enzima degrada polipeptídeos grandes em fragmentos menores. Como uma protease reguladora, ela ativa outras proteínas através de proteólise (BAIRD JR, 2017). A tripsina pertence à superfamília de quimotripsina das seropinopeptidases que são caracterizadas pela presença de uma tríade catalítica contendo os aminoácidos His57, Asp102 e Ser195 (numeração de quimotripsinogênio) em seu sítio ativo (JIAN-MIN et al., 2013).

A inibição proteolítica ocorre através da formação de um complexo entre a enzima e uma molécula inibidora, que pode ser proteica ou não. Este complexo enzima-inibidor (EI) tem um potencial catalítico reduzido ou não é capaz de catalisar a hidrólise o substrato. (HABIB; FAZILI; 2007). Algumas substâncias se ligam covalentemente às enzimas deixando-as inativas. Na maioria dos casos a substância reage com um grupo funcional no sítio ativo bloqueando a interação com o substrato e deixando a enzima cataliticamente inativa. (DIXON, M; WEBB, E.C., 1979).

Os efeitos inseticidas de inibidores de proteases, especialmente de serino e de cisteíno proteases, têm sido estudados por meio da incorporação em dieta artificial ou por estudos de inibição *in vitro*. Alguns autores obtiveram resultados promissores com a utilização de inibidores sintéticos ou oriundos de fontes alternativas como inseticidas, os

quais ocasionaram redução do peso corporal e aumento da mortalidade de besouros *Nebria brevicollis* (BURGESS et al., 2002). Redução da taxa de postura na espécie *Frankliniella occidentalis* também já foi descrita (ANNADANA et al., 2002).

Quando ingeridos pelos insetos, os inibidores de proteases causam efeitos deletérios severos, incluindo prejuízos ao processo de digestão, diminuição da biodisponibilidade de aminoácidos e dificuldade na absorção de nutrientes, o que usualmente resulta em morte por inanição (BHATTACHARYYA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2007; RAMOS et al., 2009).

Devido à importância dos inibidores de proteases, o investimento do mercado global na sua síntese está avaliado em US\$ 104,4 bilhões no ano de 2010, sendo a taxa de crescimento anual nesse ramo de 4% (DABHADE et al., 2016). Outras aplicações de inibidores de proteases envolvem propriedades farmacológicas. Alguns medicamentos comercializados têm como mecanismo de ação a inibição de enzimas, entre elas, a notável classe das estatinas. Estas são inibidores de uma enzima chave no processo de síntese de colesterol, a hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase (FONSECA, 2005).

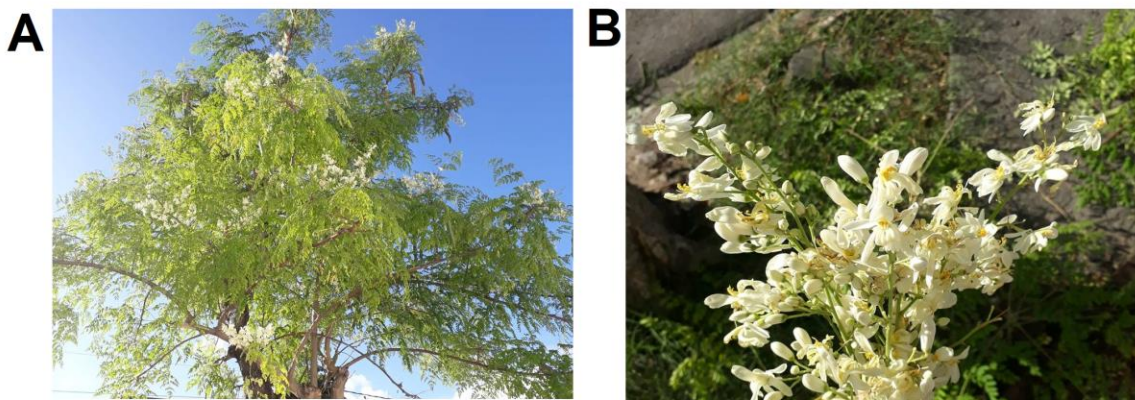
2.4 *Moringa oleifera*

M. oleifera é conhecida como “acácia branca”, “marungo”, “muringa” ou “moringuiero” em português, “árbol del ben”, “morango” ou “moringa” em espanhol e “horseradish tree” em inglês. pertencente à família Moringaceae, a qual é composta pelo único gênero *Moringa*, o qual compreende 14 espécies. Originária do sul da Ásia, essa planta cresce perto das montanhas do Himalaia, desde o noroeste do Paquistão, ao norte da Índia. Foi introduzida em muitas partes do mundo, incluindo América (desde o México até o Peru, ilhas do Caribe, Paraguai e Brasil). É uma árvore perene, mas com curta longevidade, que pode viver no máximo 20 anos (GONZÁLEZ, 2012). Apresenta um rápido crescimento, podendo chegar a taxas de 1,50 cm/dia, atingindo de 7 a 12 metros de altura com grande produção de folhas (CYSNE, 2006; BARRETO et al., 2009). Sua propagação pode ser feita através de sementes (sexuada), mudas ou estacas (assexuada). Apresenta folhas bipinadas, flores brancas e cheirosas e seus frutos longos e triquinados,

com aparência próxima de uma vagem de cor marrom (ALVES et al., 2005).

Caracteriza-se por sua grande plasticidade ecológica, já que se encontra localizada em diferentes condições de solo, precipitação e temperatura. Tem como vantagens de cultivo a tolerância a solos pobres, grande resistência a seca e facilidade de cultivo, tendo a capacidade de aceitar grandes podas e se adapta melhor a solos levemente ácidos a neutros (FOIDL et al., 2003; GONZÁLEZ, 2012; PASSOS et al., 2013). Jesus et al. (2013), cita que esta planta pode ser cultivada nos mais diversos tipos de solo, no entanto, apresenta limitação de crescimento em solos mal drenados. A temperatura ótima para seu crescimento encontra-se em torno de 25° C a 35° C, podendo tolerar temperaturas momentâneas de até 48° C (GAZA, 2007).

Figura 2. *Moringa oleifera*. Árvore (A) e Inflorescência (B).



Fonte: Arquivo Pessoal

A introdução de *M. oleifera* foi realizada no Brasil pelo fato da planta se adaptar a algumas regiões brasileiras de difíceis condições, com longos períodos de estiagem, pluviosidade média anual de 500 mm e altas temperaturas (ROSA, 1993; ANWAR et al. 2007). Pode ser cultivada extensivamente, apresentando rendimentos, em média de 8,3 toneladas MS/ha com 45 dias de corte (PÉREZ et al., 2010; BONAL et al., 2014). Outro ponto positivo é o baixo custo de produção e a ampla possibilidade de aproveitamento, podendo ser utilizadas as folhas, talos, sementes, frutos e flores, com quantidades

significativas de nutrientes (OKUDA et al., 2001; FERREIRA et al., 2008). Benefícios têm sido associados a metabólitos como compostos fenólicos, vitaminas e proteínas (FAHEY, 2005; GOYAL et al., 2007; ADEDAPO et al., 2009).

As sementes de *M. oleifera* contém lectinas (proteínas ligadoras de carboidratos), dentre as quais, WSMoL (lectina solúvel em água de sementes de *M. oleifera*) foi agente larvicida e ovicida contra *Aedes aegypti*. A atividade larvicida dessa proteína está provavelmente relacionada com sua ligação a glicoconjugados presentes na matriz peritrófica e epitélio intestinal das larvas enquanto a ação ovicida resulta da indução da morte do embrião quando o ovo é colocado em contato com a lectina (COELHO et al., 2009; SANTOS et al., 2012). Agra-Neto et al. (2014) demonstraram ainda que essa lectina foi capaz de causar desbalanço na atividade de enzimas digestivas e detoxificantes de L4.

Pontual et al. (2012) demonstraram que extrato aquoso de flores de *M. oleifera* contendo inibidor de tripsina (MoFTI, do inglês *M. oleifera* flower trypsin inhibitor) apresentou atividade larvicida contra *A. aegypti* no segundo, terceiro e quarto instares larvais (L2, L3 e L4, respectivamente), bem como reduziu a atividade de tripsina no intestino das larvas L4. Quando isolado, MoFTI promoveu mortalidade das larvas recém-eclodidas, com CL50 de 0,3 mg/mL e inibiu o crescimento (CMI de 0,031 mg/mL) e eliminou (CMB de 1,0 mg/mL) bactérias do intestino de L4 (PONTUAL et al., 2014).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito do extrato de flores de *M. oleifera* na sobrevivência das larvas de *P.xylostella* e atividade de enzimas digestivas no estágio L₃.

3.2 Objetivos Específicos

- Extrair proteínas a partir de flores de *M. oleifera*.
- Caracterizar o extrato de flores quanto à presença de atividade inibidora de tripsina.
- Obter preparações de intestino de larvas de *P. xylostella* contendo atividade enzimática.
- Investigar a resistência dos peptídeos presentes no extrato de flores à degradação por proteases digestivas das larvas L₃.
- Determinar o efeito do extrato de flores na sobrevivência de larvas de *P. xylostella* e acompanhar a viabilidade dos adultos emergidos a partir deste tratamento.
- Avaliar o efeito do extrato de flores sobre as atividades de enzimas (proteases totais e tripsina-símile) envolvidas na digestão de proteínas em larvas de *P. xylostella*.
- Investigar o extrato de flores quanto ao efeito deterrente alimentar para larvas de *P. xylostella*.

4. METODOLOGIA

4.1 Obtenção do extrato de flores de *M. oleifera*

M. oleifera é conhecida como “acácia branca”, “marungo”, “muringa” ou “moringuiero” em português, “árbol del ben”, “morango” ou “moringa” em espanhol e “horseradish tree” em inglês. O nome da espécie foi confirmado utilizando o website <http://www.theplantlist.org> em 23 de janeiro de 2019. Flores de *M. oleifera* foram coletadas no Campus da Universidade Federal de Pernambuco (8°02'57.9"S 34°56'47.8"O), Recife, Pernambuco, Brasil. O acesso ao material vegetal foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o número AF99882. Uma exsicata (número 73.345) encontra-se depositada no Herbário Dárdano de Andrade Lima do Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA), Recife, Pernambuco Brasil.

As flores frescas (50 g) foram homogeneizadas com água destilada (100 mL) por 5 min, utilizando um liquidificador. A mistura obtida foi filtrada em gaze e centrifugada (3.000 x g; 15 min) e o sobrenadante límpido correspondeu ao extrato de flores. Em seguida, o extrato foi liofilizado e ressuspendido em água destilada para se obter uma solução estoque de concentração 4,0% expressa em peso seco/volume (m/v).

4.2 Caracterização do extrato de flores de *M. oleifera* quanto á presença de atividade inibidora de tripsina

A investigação da presença de atividade inibidora de tripsina no extrato de flores foi realizada em placas de microtitulação de acordo com a metodologia descrita por Pontual et al. (2014). Uma alíquota (5 µL) de solução de tripsina bovina de origem comercial (0,1 mg/ml, em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, contendo CaCl₂ 0,02 M) foi incubada com o extrato de flores (0,1 e 0,2%, m/v). Em seguida, foi adicionado o substrato N-α-benzoil-DL-arginina-ρ-nitroanilida (BApNA, 5 µl) e o volume de cada poço foi ajustado para 200 µl com tampão Tris. Foram realizados controles do substrato (ausência da enzima e do extrato), do extrato (ausência de enzima e substrato) e enzima 100% (ausência do extrato).

Em seguida, a medida de absorvância a 405 nm foi determinada. A inibição foi calculada pela atividade residual da tripsina e expressa em relação à hidrólise dos substratos promovida na ausência do extrato de flores.

4.3 Obtenção de preparações de intestino de L₃ contendo atividade enzimática

As larvas de *P. xylostella* foram obtidas a partir de uma cultura mantida em folhas de couve, em condições controladas ($26 \pm 1^\circ \text{C}$; fotoperíodo de $11 \pm 0,5 \text{ h}$; 65-70% de umidade relativa) no Laboratório de Biologia de Insetos da Área de Fitossanidade do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Larvas de terceiro instar (L₃) foram utilizadas nos bioensaios.

Grupos de L₃ (n=100) foram imobilizadas por hipotermia (4°C , 10 min) e seus intestinos foram removidos utilizando-se uma agulha. Após a dissecação, os intestinos foram imediatamente homogeneizados com Tris-HCl 0,1 M pH 8.0 (1 mL) em um homogeneizador de tecidos. A mistura foi centrifugada ($9,000 \times g$, 4°C , 15 min) e o sobrenadante correspondeu ao extrato de intestino de L₃. A concentração de proteínas foi determinada de acordo com Lowry *et al.* (1951) utilizando-se uma curva padrão (0 a 500 µg/ml) de albumina sérica bovina.

Para determinar se o extrato de intestino de L₃ continha proteases ativas, sua atividade proteolítica foi investigada de acordo com Azeez *et al.* (2007). Uma alíquota (250 µg de proteínas) do extrato de intestino de L₃ foi adicionada a 300 µL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,5 e 50 µL de azocaseína a 0,6 % (m/v). Em seguida, 100 µL de triton X-100 0,1% (v/v) foram adicionados à mistura, sendo o ensaio incubado a 37°C por 3 h.

Após a incubação, a reação foi interrompida com uma solução (200 µL) de ácido tricloroacético 10% (v/v) e o ensaio foi novamente incubado (4°C , 30 min). Posteriormente, a mistura foi centrifugada (9.000g, 10min) e a absorvância a (366 nm) do sobrenadante foi determinada. Uma unidade de atividade proteolítica correspondeu à quantidade de enzima que fornece um aumento de 0,01 na absorvância.

4.4 Investigação da resistência do extrato de flores à degradação por proteases digestivas de L₃

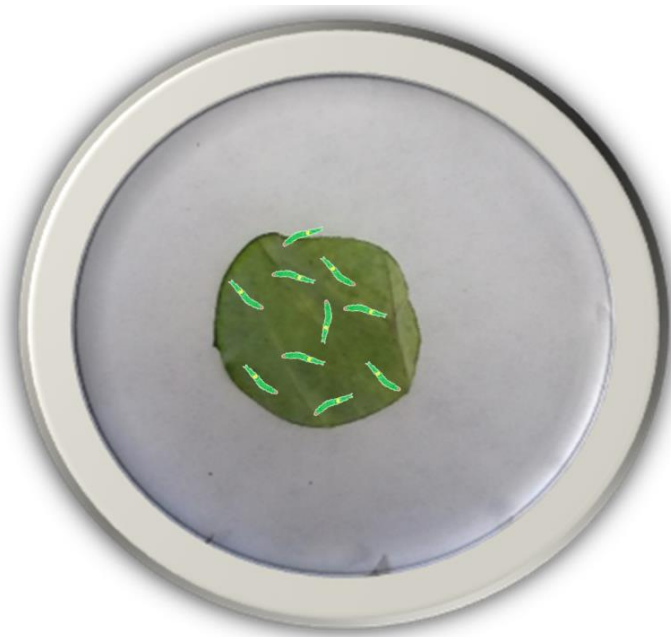
Uma alíquota (200 µL) do extrato de flores foi incubada (37° C, 60 min) com o extrato de intestino de L₃ (200 µL) em Tris-HCl contendo NaCl 0,15 M. Após o período de incubação, as misturas foram aquecidas (100°C, 20 min) para inativação das enzimas. O controle recebeu apenas tampão Tris-HCl e o extrato de flores. As misturas teste e controle foram avaliadas quanto à atividade inibidora de tripsina, conforme descrito no item 4.2, para indicar se o extrato resistiu à proteólise pelas enzimas digestivas de L₃.

A resistência do extrato de flores foi também investigada tratando-se as amostras conforme descrito acima por 5, 15, 30, 90, 270 e 1440 min. Em seguida alíquotas de cada mistura foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) de acordo com o Laemmli (1970). Após a migração, cada gel foi corado com azul de Coomassie em ácido acético 10% (0,02%, v/v).

4.5 Efeito do extrato de flores de *M. oleifera* na sobrevivência de L₃ de *P. xylostella*

O ensaio larvicida (Figura 3) foi realizado de acordo com Lingathurai *et al.* (2010). Discos (3 cm de diâmetro) de folhas frescas de couve manteiga (*Brassica oleracea* var. acephala, família Brassicaceae) foram perfurados com uma agulha e imersos (13 segundos) em diferentes concentrações do extrato de flores (0,5 a 2%, m/v) ou em água destilada (controle). Após secagem ao ar durante 40 min, um disco de folha de couve tratada foi colocado em placa de Petri e oferecido às L₁ de *P. xylostella* (sem alimentação por 4 h) durante 24h. Após esse tempo, as larvas foram continuamente mantidas alimentadas com discos de couve não tratados, trocados a cada 24 h. O experimento foi realizado em triplicata e cada placa recebeu um total de 10 larvas. A mortalidade das larvas foi acompanhada diariamente, até a emergência de adultos. A viabilidade dos adultos emergidos foi também analisada. Os insetos foram fotografados com o auxílio de um estereomicroscópio.

Figura 3. Aspecto do ensaio larvicida utilizando discos (3 cm de diâmetro) de folhas frescas de couve manteiga (*Brassica oleracea* var. *acephala*) tratados com o extrato de flores de *M. oleifera* e oferecidos a larvas de *P. xylostella* no estágio L₃.



4.6 Efeito do extrato de flores de *M. oleifera* sobre a atividades de proteases totais e tripsina-símile do intestino de L₃.

O efeito do extrato de flores sobre a atividade de proteases totais e de tripsina-símile de larvas L₃ foi realizado conforme descrito nos itens 4.2 e 4.3, respectivamente. Contudo, a investigação da presença de inibidores da atividade proteolítica total foi realizada utilizando o extrato de intestino de L₃ como preparação enzimática, em presença do extrato de flores de *M. oleifera* a 0.4 e 0.8%. A investigação da atividade inibidora de enzimas tripsina-símile no extrato de flores de *M. oleifera* a 0,1 e 0,2% foi realizada substituindo-se a tripsina de origem comercial pelo extrato de intestino de L₃.

4.7 Investigação do efeito deterrente alimentar do extrato de flores de *M. oleifera* para L₃ de *P. xylostella*

Para avaliar o potencial deterrente do extrato de flores, dez L₃ de *P. xylostella* (sem alimentação por 4 h) foram introduzidas em placa de Petri. Cada placa recebeu um disco de folha de couve tratado com o extrato de flores (0,5 a 2%, m/v) ou com água destilada (controle), conforme descrito no item 4.5. Após 24 h de incubação, a taxa de consumo foi determinada subtraindo-se o peso dos discos antes e depois de oferecidos às larvas. O resultado foi expresso como valor percentual, considerando 100% o peso inicial de cada disco.

4.8 Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média para valores em percentuais \pm desvio padrão e as diferenças entre os tratamentos foram determinadas utilizando o teste T de Student, considerando significativos valores de $p < 0,05$. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas de três experimentos independentes.

5. RESULTADOS

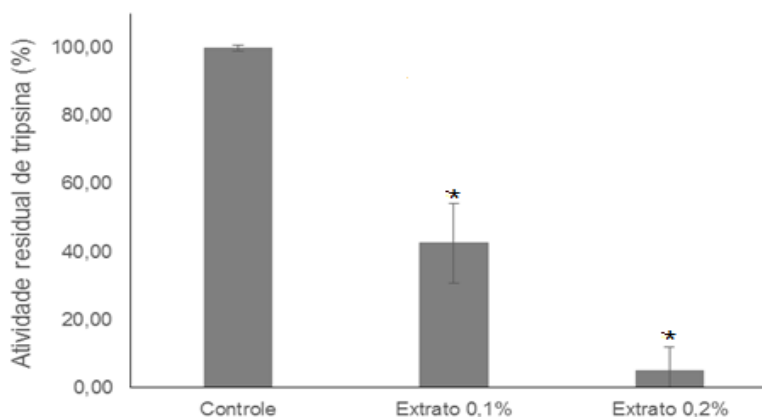
O ensaio para avaliação da presença de inibidores de tripsina mostrou que o extrato de flores de *M. oleifera* foi capaz de inibir a catálise da reação de hidrólise do substrato BApNA pela tripsina de origem comercial (Figura 4). A máxima taxa de inibição (95%) ocorreu para o extrato de flores na concentração de 0,2%.

O extrato de intestino foi obtido e o ensaio de atividade proteolítica utilizando o substrato azocaseína revelou que esta preparação foi capaz de catalisar a hidrólise do substrato com atividade específica de 43.468 ± 22 U/mg, esse dado demonstra que as proteases do extrato de intestino estavam ativas.

A atividade inibidora de tripsina presente no extrato de flores de *M. oleifera* a 0,2 % resistiu à incubação com o extrato de intestino de L₃ de *P. xylostella*, pois mesmo após 60

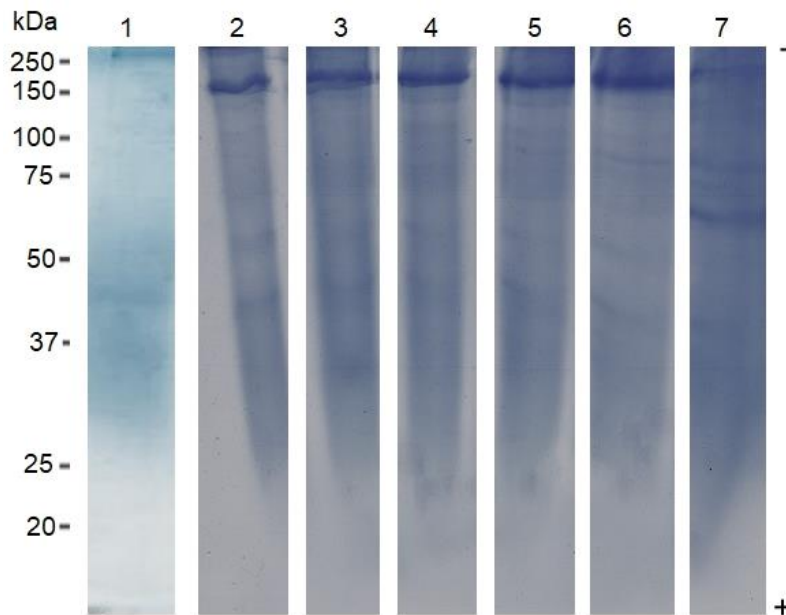
min de incubação com as proteases das larvas, foi capaz de abolir a atividade da tripsina comercial. SDS-PAGE revelou que o extrato de flores contém um peptídeo de alta massa molecular (>150 kDa), o qual resistiu à hidrólise até 270 min de incubação com o extrato de intestino de L₃ de *P. xylostella*. Por outro lado, após 24 h de incubação, esse peptídeo sofreu hidrólise, uma vez que a intensidade da banda foi reduzida, enquanto outros peptídeos de menor massa apareceram no gel como produtos de hidrólise (Figura 5).

Figura 4. Atividade inibidora de tripsina no extrato de flores de *M.oleifera*. O asterisco indica diferença significativa em relação ao controle determinada pelo teste T de Student ($p < 0,05$).



O ensaio de atividade larvicida revelou que o extrato de flores foi tóxico quando ingerido por larvas L₁ de *P. xylostella*, acarretando em morte das larvas. Essa mortalidade foi registrada até o estágio L₃ (Figura 6A). Foi registrada uma máxima taxa de mortalidade de $60 \pm 10\%$ para o extrato a 2%, até 96 h após o início do experimento. Os dados de mortalidade das larvas tratadas com o extrato de flores mostraram uma resposta dose dependente em uma curva que seguiu uma regressão polinomial de ordem 2 com valor de $R^2 = 0,99$.

Figura 5. Investigação do extrato de flores de *M. oleifera* quanto à presença de peptídeos resistentes à hidrólise por proteases digestivas de L3 de *P. xylostella*. SDS-PAGE (12%, m/v) onde foram aplicados o extrato de intestino (1), o extrato de flores (2), o extrato de flores após incubação com o extrato de intestino por 15, 30, 90, 270 e 1440 min (3 a 7, respectivamente).



Interessantemente, ao acompanharmos o desenvolvimento das larvas que permaneceram vivas após o bioensaio de atividade larvicida, foi observado que o tratamento com o extrato de flores resultou na emergência de insetos adultos com malformações, incluindo atrofia de asas, asas sem motilidade ou dificuldade para abandonar o casulo (Figura 6B).

O extrato de flores a 0,8% causou redução de $67,75 \pm 0,64\%$ na habilidade das proteases do extrato de intestino de L₃ em catalisar a hidrólise da azocaseína (Figura 7A). O extrato de intestino de L₃ de *P. xylostella* apresentou também atividade de tripsina ($ABS_{405nm} = 0,635$), uma vez que foi capaz de clivar o substrato BApNA. Essa atividade foi reduzida de forma dose-dependente em presença do extrato de flores de *M. oleifera*, tendo sido registrada a máxima taxa de inibição ($65,83 \pm 6,3\%$) para o extrato de flores na concentração de 1% (Figura 7B).

Figura 6. Efeito do extrato de flores de *M. oleifera* na sobrevivência e desenvolvimento de larvas de *P. xylostella*. (A) Mortalidade de larvas tratadas com o extrato de flores. (B) Adultos emergidos de larvas que sobreviveram ao ensaio larvicida. (1) Inseto controle. (2) Insetos emergidos a partir de larvas tratadas com extrato de flores a 2% (m/v) apresentando malformações nas asas (2, 3 e 4) ou incapacidade de abandonar o casulo (2 e 3).

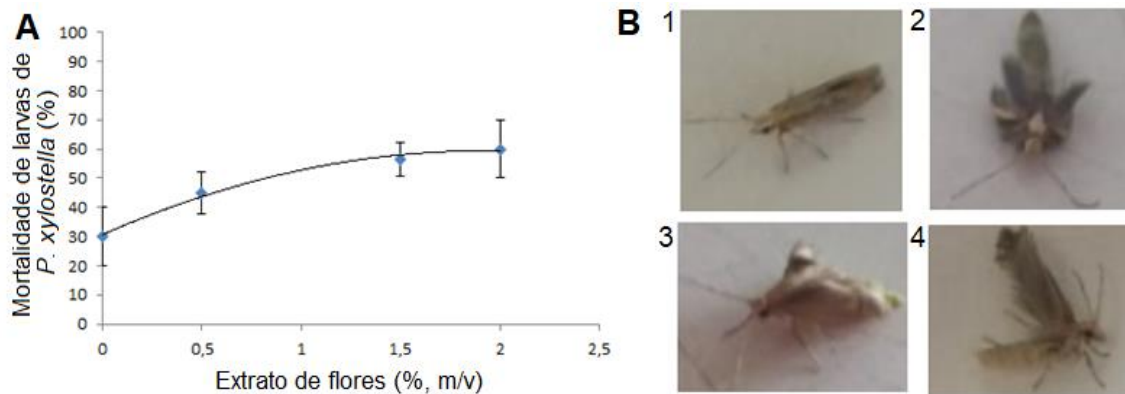


Figura 7. Efeito do extrato de flores de *M. oleifera* na atividade de proteases do intestino de L₃ de *P. xylostella*. (A) Efeito do extrato de flores sobre a atividade proteolítica total do extrato de intestino de L₃. (B) Efeito do extrato de flores sobre a atividade de tripsina do extrato de intestino de L₃. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste T de Student ($p < 0,05$).

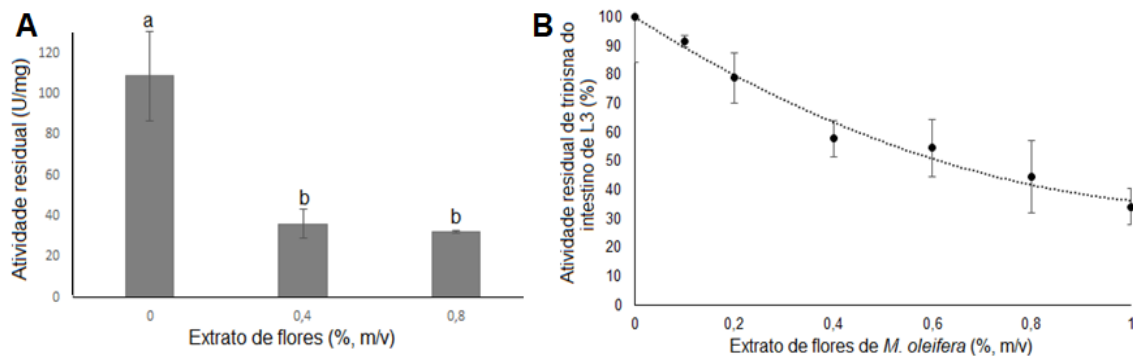


Tabela 2. Taxa de consumo (%) por L₃ de *P. xylostella* dos discos de folhas de couve tratados com o extrato de flores de *M. oleifera*. A concentração do extrato de flores foi expressa em percentual (massa seca/volume). Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$ pelo teste T de Student.

Tratamento	Taxa de consumo (%)	Valor de p
Controle	78,79 ± 9,69	-----
Extrato de flores de <i>M. oleifera</i>		
0,5%	61,76 ± 13,53	0,15
1%	61,98 ± 10,93	0,117
1,5%	61,52 ± 6,16	0,06
2%	73,03 ± 5,37	0,419

O extrato de flores de *M. oleifera* não interferiu no comportamento alimentar das larvas uma vez que o tratamento estatístico não revelou diferenças significativas (valor mínimo de $p = 0,06$) entre as taxas de consumo nos tratamentos teste e controle (Tabela 2).

6. DISCUSSÃO

A avaliação da toxicidade do extrato de flores de *M. oleifera* para larvas de *P. xylostella* foi estimulada pela importância deste inseto como praga agrícola multirresistente e pelos relatos prévios do potencial inseticida do extrato de flores. Antes de iniciar as investigações propostas nos objetivos deste trabalho, o extrato de flores foi avaliado quanto à capacidade de inibir a atividade de tripsina de origem comercial. A presença de inibidor de tripsina no extrato detectada em nossos experimentos corroborou com os resultados obtidos por Pontual et al. (2012; 2014) que demonstraram a presença de um peptídeo inibidor de tripsina no extrato de flores de *M. oleifera* obtido pelo mesmo protocolo utilizado no presente trabalho. Os autores relacionaram o efeito inseticida do extrato de flores com a presença de inibidor de tripsina.

Antes de avaliar a toxicidade do extrato de flores de *M. oleifera* para as larvas de *P. xylostella*, a presença de peptídeos resistentes à hidrólise por enzimas digestivas de L₃ neste

extrato foi investigada. O terceiro instar larval foi selecionado para a obtenção da preparação contendo atividade enzimática por ser maior que os estágios iniciais e se alimentar mais ativamente, o que sugere que a expressão de enzimas digestivas pode ser mais intensa neste estágio.

A detecção da capacidade do extrato de intestino de L₃ de hidrolisar a azocaseína garantiu que esta preparação correspondia a uma mistura complexa contendo proteases digestivas com atividade preservada. Sendo assim, esta preparação foi incubada com o extrato de flores de *M. oleifera* para ver se a atividade inibidora de tripsina era capaz de resistir à hidrólise pelas enzimas de L₃. O resultado desta avaliação revelou então que o inibidor de tripsina de flores de *M. oleifera* resiste à clivagem enzimática in vitro pelas proteases de L₃ de *P. xylostella*.

Pontual et al. (2012) reportaram a presença de um peptídeo de 169,9 kDa no extrato de flores de *M. oleifera* e demonstraram através de zimografia reversa que este peptídeo apresenta atividade inibidora de tripsina. Este resultado corrobora com a presença de um peptídeo de alta massa molecular (>150 kDa) no extrato de flores detectada quando este foi analisado por eletroforese sob condições desnaturantes no presente trabalho. Adicionalmente, a ausência de alteração no padrão de bandas polipeptídicas visualizada no gel quando o extrato de flores foi incubado com o extrato de intestino de L₃ até 270 min é mais uma evidência de que o principal peptídeo do extrato de flores pode resistir ao efeito das proteases digestivas das larvas de *P. xylostella* por tempo suficiente para causar prejuízos às larvas. Este resultado nos encorajou a prosseguir este estudo avaliando a toxicidade por ingestão do extrato de flores para larvas de *P. xylostella*.

A mortalidade das larvas de *P. xylostella* após tratamento com o extrato de flores aqui descrita é um resultado promissor, uma vez que este inseto se trata de uma praga multirresistente (WANG et al., 2016). A ausência de efeito deterrente alimentar quando os discos de couve tratados com o extrato de flores de *M. oleifera* foi oferecida às larvas garante que a toxicidade do extrato de flores relatada aqui foi devido à ação dos componentes do extrato e não decorrente da falta de ingestão de nutrientes pelas larvas. Adicionalmente, a emergência de adultos malformados após alimentação das larvas L₁ com o extrato de flores por apenas 24 h parece conferir vantagem ao uso desta preparação por

indicar a necessidade de apenas uma aplicação no início do estágio larval para prejudicar o desenvolvimento do inseto, resultado incomum para as amostras de origem natural. Além disso, este dado revela o efeito crônico do extrato de flores de *M. oleifera* para as larvas.

Os extratos vegetais constituem alternativas interessantes ao uso de inseticidas sintéticos devido ao seu maior grau de biodegradáveis e menor persistência no ambiente, oferecendo, nesse sentido, a possibilidade de um controle mais seletivo e menos agressivo (CORRÊA e SALGADO, 2011). Em adição, essas preparações são consideradas vantajosas por serem obtidas a partir de recursos renováveis, além da possibilidade de minimizar a seleção de insetos resistentes, uma vez que são misturas complexas, as quais contém vários compostos com a possibilidade de atuar através de diferentes mecanismos de ação (ROEL, 2001). A praticidade na preparação dessas amostras é outra vantagem, pois garante a possibilidade de seu uso pela população.

Outros estudos têm relatado a atividade inseticida de extratos vegetais. O extrato de flores de *M. oleifera* foi também capaz de causar mortalidade de larvas de *A. aegypti* nos estágios L₂, L₃ e L₄ e de larvas de larvas L₁ recém eclodidas (PONTUAL *et al.*, 2012; PONTUAL *et al.*, 2014). O extrato de folhas de *Schinus terebinthifolia* contendo proantocianidinas poliméricas, taninos hidrolisáveis, heterosídeos e favonóides agliconas, derivados do ácido cinâmico, traços de esteróides e lectinas causou mortalidade de larvas de *A. aegypti* no quarto instar com CL₅₀ de 0,62% (para larvas não alimentadas) e 1,03% (pra larvas alimentadas) (PROCÓPIO *et al.*, 2015). O extrato de folhas atrasou o desenvolvimento das larvas e promoveu intensa desorganização do epitélio intestinal, incluindo deformação e hipertrofia das células, desorganização das microvilosidades e vacuolização do citoplasma, afetando as células digestivas, enteroendócrinas regenerativas e proliferativas. Adicionalmente, o extrato induziu a fragmentação do DNA em algumas células intestinais. Os autores mostraram ainda que os derivados do ácido cinâmico e flavonoides estão envolvidos no efeito lervicida do extrato, sendo os primeiros mais eficientes em causar danos às larvas.

Com o objetivo de apontar um possível mecanismo para a ação larvicida do extrato de flores, o efeito dessa preparação sobre a atividade de proteases do intestino das larvas foi investigado. Interessantemente, o extrato de flores causou inibição das proteases totais e da

fração tripsina-símile das enzimas digestivas das larvas de *P. xylostella*. A tripsina é uma importante serinoprotease do trato digestivo de insetos, pois é responsável por uma parcela significativa da digestão de proteínas (PONTUAL *et al.*, 2014). Relatos prévios demonstraram que o extrato de flores de *M. oleifera* não apenas foi capaz de inibir *in vitro* a atividade de enzimas tripsina-símile do intestino de larvas de *A. aegypti*, como também acarretou na forte redução *in vivo* da atividade dessas enzimas quando ingerido pelas larvas.

Os achados deste trabalho revelam que o extrato de flores de *M. oleifera* é agente inseticida contra *P. xylostella* por causar mortalidade das larvas e malformações nos insetos adultos. O efeito larvicida do extrato de flores pode estar relacionado à inibição de enzimas importantes para os processos digestivos de *P. xylostella* causando a mortalidade dos insetos por desnutrição.

7. CONCLUSÕES

- O extrato de flores de *M. oleifera* contém atividade inibidora de tripsina e peptídeos resistentes à hidrólise por proteases digestivas de larvas de *P. xylostella*.
- As larvas de *P. xylostella*, embora reconhecidamente resistentes a muitos inseticidas utilizados atualmente na agricultura, foram sensíveis ao tratamento com o extrato de flores de *M. oleifera*.
- O extrato de flores causou inibição *in vitro* da atividade de proteases totais e da fração tripsina-símile das enzimas digestivas das larvas de *P. xylostella*.
- A ausência de efeito deterrente alimentar quando a dieta tratada com o extrato de flores de *M. oleifera* foi oferecida às larvas garante que a toxicidade do extrato de flores relatada aqui foi devido à ação dos componentes do extrato e não decorrente de desnutrição das larvas pela falta de ingestão de nutrientes.
- O extrato de flores de *M. oleifera* é um agente larvicida contra *P. xylostella* e esse efeito pode estar relacionado a prejuízos nos processos de digestão das larvas decorrentes da ação de peptídeos que conseguem passar intactos pelo trato digestivo das mesmas.

8. REFERÊNCIAS

- AHUJA, I.; De VOS. R.C.H.; BONES, A.M.; HALL, R.D.; Plant molecular stress responses face climate change. **Trends Plant Sci.** 15, 664–674. 2010B
- FREE, J.B., WILLIAMS, I.H. **Distribution of insect pests on crops of oil-seed rape (*Brassica napus L.*) and the damage they cause.** J. Agric. Sci. 92, 139–149. 1979
- ALVES, M. C. S.; et al. Germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de *Moringa oleifera* Lam. em diferentes locais de germinação e submetidas à pré-embedição. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n.5, p. 1083-1087, 2005.
- ANNADANA, S.; PETERS, S. J.; GRUDEN, K.; SCHIPPER, A.; OUTCHKOUROV, N. S.; BEEKWILDER, M. J.; UDAYAKUMAR, M.; JOSMA, M. A. Effects of cysteine protease inhibitors on oviposition rate of the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. **Journal of Insect Physiology**, 48:701–706 2002
- ANWAR, F.; SAJID, L.; MUHAMMAD, A.; ANWARUL, H.G. **Moringa oleifera: A Food plant with multiple medicinal uses.** *Phytother. Res.*, v. 21, p.17- 25. 2007.
- AZEVEDO, A. M. et al. Estudo da repetibilidade genética em clones de couve. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 1, 2016. p. 54-58.
- BARRETO, M. B. *et al.* Constituintes químicos voláteis e não-voláteis da *Moringa oleifera* Lam., Moringaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 893-897, out./dez., 2009.
- BASU, S., & CETZAL-IX, W. Brassicaceae: **An agri-horticulturally important family.** 2014
- BHATTACHARYYA, A., LEIGHTON, S. M., BABU, C. R., Bioinsecticidal activity of *Archidendron ellipticum* trypsin inhibitor on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Spodoptera litura*. **Comp Biochem Physiol C**, 145, 669–677a. 2007
- BIJINA B.; CHELLAPPAN S.; KRISHNA JG.; BASHEER SM.; ELYAS KK.; BAHKALI AH.; CHANDRASEKARAN M.; 2011. **Protease inhibitor from *Moringa oleifera* with potential use as therapeutic drug and as seafood preservative.** *Saudi J Biol Sci* 18:273–281.
- BONAL, R. et al. ***Moringa oleifera*: a healthy option for the well being,** 2014.
- OKUDA, T. *et al.* “Isolation and characterization of coagulant extracted from *Moringa oleifera* seed by salt solution”. **Water Research**, v.35, p. 405-410, 2001.

BUCKLES, D., TRIOMPHE, B., SAIN, G. **Cover crops in hillside agriculture**. Farmer innovation with *Mucuna*. International Maize and Wheat Improvement Center, Mexico. 1998

CASTELO BRANCO, M.; VILLAS BÔAS, G. L. Traça-das-crucíferas *Plutella xylostella* – **Artrópodes de importância econômica**. Comunicado Técnico da Embrapa Hortaliças, Brasília – DF, n. 4, p. 1-3, 1997.

CASTELO BRANCO, M; GUIMARÃES, A.L. Controle da traça-das-crucíferas em repolho. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 10, n. 1, p. 24-25, 1990.

CASTELO BRANCO, M.; FRANÇA, F. H.; Traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). In: VILELA E. F.; ZUCCHI R. A.; CANTOR F. (Eds.). **Histórico e impacto das introduzidas no Brasil**. Ribeirão Preto: *Holos*. p.85-89, 2001

CARDOSO, A. D. et al. Produtividade e qualidade de tubérculos de batata em função de doses e parcelamentos de nitrogênio e potássio. **Ciências Agrotécnicas**, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1729-1736. 2007

COELHO JS.; SANTOS NDL.; NAPOLEÃO TH.; GOMES FS.; FERREIRA RS.; ZINGALI RB.; COELHO LCBB.; LEITE SP.; NAVARRO DMAF.; PAIVA PMG.; 2009. **Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae**. *Chemosphere* 77:934–938.

CYSNE, J. R. B. **Propagação in vitro de *Moringa oleifera* L.** Fortaleza, 2006. 81f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Ceará, UFC, 2006.

DABHADE, A. R; MOKASHE, N. U; PATIL, U. K. Purification, characterization, and antimicrobial activity of nontoxic trypsin from *Albizia amara* Boiv. **Process Biochemistry** V. 51, n. 5, p.659-674, 2016

DIAS, D. G. S.; SOARES, C. M S.; MONNERAT, R.; **Avaliação de larvicidas de origem microbiana no controle da traça-das-crucíferas em couve-flor**. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 22, n. 3, p. 553-556, 2004

DICKSON, M. H.; SHELTON, A. M.; EIGENBRODE, S. D.; VAMOSY, M. L.; MORA, M.; **Selection for resistance to diamondback moth (*Plutella xylostella*) in cabbage**. *Hortscience*, Alexandria, v. 25, n. 12, p. 1643-1646, 1990

DIXON, M; WEBB, E. **Enzymes**. New york: Academic Press, 1116 p. 1979

FAHEY, J.W. *Moringa oleifera*: A Review of the Medical Evidence for Its Nutritional, Therapeutic, and Prophylactic Properties. Part 1. **Trees for Life Journal** 1:5, 2005.

FERREIRA, C.A. **Avaliação da atividade larvicida do extrato de flores de *Moringa oleifera* contra a traça-das-brássicas *Plutella xylostella***. Recife, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), 13 p. (Relatório de Iniciação Científica/PIBIC/UFRPE) 2017.

FERREIRA, P.M.P.; FARIAS D.F.; OLIVEIRA, J.T.A; CARVALHO, A.F.U. **Moringa oleifera : compostos bioativos e potencialidade nutricional**. *Rev. Nutr.*, v.21, n.4, p.431-437, 2008.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa: Editora UVF, 2013. 421 p.

FILGUEIRA, F.A.R. **ABC da olericultura: guia da pequena lavoura**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1897.

FOIDL, N.; MAYORAGA L.; VÁSQUEZ, W. **Utilización del marango (*Moringa oleifera*) como forraje fresco para ganado**. Conferência eletrônica da FAO sobre “Agroforestería para la producción animal en Latinoamérica”. Proyecto Biomasa. Managua; Nicaragua. 5p. 2003.

FONSECA, F. A . H. Farmacocinética das estinas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, V. 85, p. 9-14, 2005

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

GAZA. Cidadão Solitário. **Moringa: Folhas Nutritivas**. [Guarantina], 2007.

ROSA, K. R. *Moringa oleifera*: a perfect tree for home gardens. Agroforestry **Information Service**, 1993.

GONZÁLEZ, D. *Moringa oleifera* – La garantía de un futuro mejor. **Revista ACPA** – Órgano Oficial de la Asociación Cubana de Producción Animal – Artículos Técnicos, La Habana, Cuba, n. 3, p. 40-42, 2012.

GOYAL, B.R.; AGRAWAL, B.B.; GOYAL, R.K.; MEHTA, A.A. Phyto-pharmacology of *Moringa oleifera* Lam. Ó an overview. **Natural Product Radiance**. Vol. 6(4), pp. 347-353, 2007.

HARCOURT, D.G. Biology of the diamondback moth, *Plutella maculipennis* (Curt.) (Lepdoptera: Plutellidae), in Eastern Ontario. II. Life-history, behavior, and host relationships. **Canadian Entomologist**, Ottawa, v. 89, p. 554-564, 1957.

HABIB, H., FAZILI, K. M., Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**.2:68-85. 2007

LOGES, V. **Danos causados pela traça-das-crucíferas *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) em cultivares de repolho *Brassica oleracea* var. *capitata* (L.) e efeito sobre populações da praga e do parasitóide *Oomyzus sokolowskii* (Kurdjumov, 1912), em condições de campo.** 1996. 98 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1996.

IMENES, S. D. L.; CAMPOS, T. B. de ; RODRIGUES NETTO, S. M.; BERGMANN, E. C.; **Avaliação da atratividade de feromônio sexual sintético da traça das crucíferas, *Plutella xylostella* (L.)**(Lepidoptera: Plutellidae), em cultivo orgânico de repolho. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 69, n. 1, p. 81-84, 2002

JAHANGIR, M. et al. Health-Affecting Compounds in Brassicaceae. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 8, n. 2, p. 31-43, 2009.

JESUS, A. R. et al. **Cultivo da *Moringa oleifera***. Instituto Euvaldo Lodi – IEL/BA, 2013.

JIAN-MIN; EVETTE S. RADISKY; CLAUDE FÉREC., **Handbook of Proteolytic Enzymes** v.3, p. 2600-2609, 2013.

JOSHI, M.L., AHUJA, D.B., MATHUR, B.N. **Loss in seed yield by insect pests and their occurrence on different dates of sowing in Indian Mustard (*Brassica juncea subsp juncea*).** Indian J. Agric. Sci. 59, 166–168. 1989

LIZZY KS.; NARASHIMA RAO PL.; PUTTASWAMY TL.; **Chemotherapy of bacterial infections.** Part 4: potential anticholera agents. Indian J Exper Biol 6:168–169, 1968

KARADI, R.V.; GADGE, N. B.; ALAGAWADI, K. R.; Savadi, R. V. **Effect of *Moringa oleifera* Lam. rootwood on ethylene glycol induced urolithiasis in rats.** *J. of Ethnoph.*, v. 105, p. 306-311, 2006.

MAU, R.F.L.; KESSING, J.L.M. ***Plutella xylostella* (Linnaeus).** Disponível em: <<http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/Type/plutella.htm>> Acesso em: 27 set. 2006

MEDEIROS, P.T.; DIAS, J.M.C.S.; MONNERAT, R.G.; SOUZA, N.R. **Instalação e manutenção de criação massal da traça-das-crucíferas (*Plutella xylostella*).** Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. (Circular Técnica, 29), 2006.

MELLO, P.E.; CASTELO BRANCO, M.; MADEIRA, N.R. Avaliação de genótipos de repolho para a resistência à traça-das-crucíferas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 12, n. 1, p. 19-24, 1994.

MONNERAT, T.R.G. **Interrelations entre la teigne des cruciferes, *Plutella xylostella*, son parasitoïdes *Diadegma* sp. et al bacterie entomopathogene *Bacillus thuringiensis* Berliner.** 1995. 160p. These (Doctorat en Sciences Agronomiques) - Ecole Nationales Superieure Agronomique de Montpellier, Montepellier, 1995.

MORENO, D. A. et al. Chemical and biological characterization of nutraceutical compounds of broccoli. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdã, v. 41, 2006. p. 1508-1522.

MOURA MC.; PONTUAL EV.; GOMES FS.; NAPOLEÃO TH.; XAVIER HS.; PAIVA PMG.; COELHO LCBB.; **Preparations of *Moringa oleifera* flowers to treat contaminated water**. In: Daniels AJ, editor. *Advances in environmental research*, Vol. 21. New York: Nova Publishers Inc. p 269–275, 2011

OLIVEIRA CFR.; LUZ LA.; PAIVA PMG.; COELHO LCBB.; MARANGONI S.; MACEDO MLR.; **Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects**. *Process Biochem* 46:498–504, 2011

OKUDA, T.B.; NISHIJIMA, A.U.W.; OKADA, M. **Isolation and characterization of coagulant extracted from *Moringa oleifera* seed by salt solution**. Faculty of Engineering, Hiroshima University 1-4-1 Kagamiyama, 2000

PASSOS, M. et al. Qualidade pós-colheita da moringa (*Moringa oleifera* Lam.) utilizada na forma in natura e seca. **Revista Geintec**, v. 3, p. 113-120, 2013.

PÉREZ, A. et al. Características y potencialidades de *Moringa oleifera*, Lamark. Una alternativa para la alimentación animal. **Pastos y Forrajes**, Matanzas, Cuba, v. 33, n. 4, p. 1- 16, 2010.

PONTUAL, E.V; SANTOS, N.D.L; MOURA, M.C; COELHO, L.C.B.B; NAPOLEÃO, T.H; PAIVA, P.M.G.; **Trypsin inhibitor from *Moringa oleifera* flowers interferes with survival and development of *Aedes aegypti* larvae and kills bacteria inhabitant of larvae midgut**. *Parasitol Res* 113:727–733, 2014

RATANPARA, H.C., PATEL, J.R., BORAD, P.K., METHA, D.M., PATEL, A.M., SHAH, B.R. **Relationship between insect damage and yield of cabbage (*Brassica oleracea* convar *capitata* var *capitata*) transplanted during different times**. *Indian J. Agric. Sci.* 62, 88–90. 1992

RICH, T.C.G. **Crucifers of Great Britain and Ireland**. Botanical Society of the British Isles, London. 336 pp. 1991

SÁNCHEZ-MACHADO DI.; LÓPEZ-CERVANTES J.; VÁZQUEZ NJR.; **High-performance liquid chromatography method to measure α and γ -tocopherol in leaves, flowers and fresh beans from *Moringa oleifera***. *J Chromatogr A* 1105:111–114, 2006

SANTOS AFS.; LUZ LA.; ARGOLO ACC.; TEIXEIRA JÁ.; PAIVA PMG.; COELHO LCBB.; **Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin**. *Process Biochem* 44:504–508, 2009

SILVA JUNIOR, A.A. **Repolho**: fitopatologia, fitotecnia, tecnologia alimentar e mercadologia. Florianópolis: EMPASC, 295 p. 1987.

SILVA, A. V. C. et al. Uso de embalagens e refrigeração na conservação de atemóia. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 2, p. 300-304. 2009

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. ; "**Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**". Nova Odessa: Instituto Plantarum, 640p. 2005

T.T. BAIRD JR., **Reference Module in Life Sciences**, Review in Comprehensive Microsystems, p. 375-432, 2017.

THULER, R.T.; *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutelidae): **estratégias para o manejo integrado**. 2006. 83f. Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola), Universidade Estadual Paulista, Unesp, Jaboticabal, 2006

TRAKA, M., MITHEN, R. Glucosinolates, isothiocyanates and human health. **Phytochem. Rev.** 8, 269–282. 2009

VERKERK, R., SCHREINER, M., KRUMBEIN, A., CISKA, E., HOLST, B., ROWLAND, I., SCHRIJVER, R.D., HANSEN, M., GERHAUSER, C., MITHEN, R., DEKKER, M. **Glucosinolates in Brassica vegetables: the influence of the food supply chain on intake, bioavailability and human health**. *Mol. Nutr. Food Res.* 53, 219–265. 2009

VILAR, M.; CARTEA, M. E.; PADILLA, G. The potential of kales as a promising vegetable crop. **Euphytica**, Nova Iorque, v. 25, n. 10, 2008, p. 153-165.

WARWICK, S.I. and AL-SHEHBAZ, I.A. **Brassicaceae: chromosome number index and database on CD-ROM**. *Pl. Syst. Evol.* 259: 237–248. 2006