

EFEITO DO EXTRATO E DA LECTINA DE CLADÓDIOS DE *Opuntia ficus-indica* (L.) MILL  
(CACTACEAE) NA BIOLOGIA E FISIOLOGIA DIGESTIVA DE *Plutella xylostella* (L.)  
(LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE)

por

ELAINE CRISTINA BATISTA FERREIRA

(Sob Orientação do Professor Reginaldo Barros – UFRPE)

RESUMO

As plantas produzem uma ampla diversidade de metabólitos que estão ligados aos mecanismos de defesa. Esses compostos orgânicos podem exibir um potencial inseticida tornando-se uma importante alternativa ao uso de inseticidas. O mecanismo de defesa química das plantas, também, inclui a produção de proteínas. O objetivo deste estudo foi investigar o efeito do extrato de cladódios de *Opuntia ficus-indica* (palma forrageira) sobre a biologia (sobrevivência, fertilidade e comportamento de oviposição) de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) e determinar se a lectina (OfiL) é princípio ativo do extrato. Extratos de cladódios foram avaliados sobre a atividade de enzimas digestivas, organização estrutural e a histoquímica do intestino de larvas de *P. xylostella* são descritos. Os resultados demonstraram que o extrato de *O. ficus indica* contém lectinas (atividade hemaglutinante específica: 178), e metabólitos secundários como flavonoides, derivados cinâmicos, terpenos, esteroides e açúcares redutores. A viabilidade dos ovos de *P. xylostella* (33%) foi significativamente ( $F = 11,34$ ;  $P < 0,0001$ ) reduzida pelo extrato de cladódios a 7,2% (m/v) quando comparada ao grupo controle (95%). Quando larvas de primeiro instar foram

tratadas com o extrato a 7,2%, os resultados mostraram uma redução significativa ( $F = 11,32$ ;  $P < 0,0001$ ) do percentual de larvas (53,00%) que alcançaram a fase de pupa em relação ao controle (80%). A OfiL não modificou na viabilidade de larvas e de pupas. Contudo, a lectina e o extrato de cladódios causaram inibição da atividade de proteases no intestino das larvas, desorganização do epitélio e expressão aumentada de carboidratos neutros e proteínas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Traça-das-crucíferas, inseticidas botânicos, proteína vegetal, palma forrageira.

EFFECT OF EXTRACT AND LECTIN OF CLADODIUM OF *Opuntia ficus-indica* (L.) MILL  
(CACTACEAE) IN DIGESTIVE BIOLOGY AND PHYSIOLOGY OF *Plutella xylostella* (L.)  
(LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE)

by

ELAINE CRISTINA BATISTA FERREIRA

(Under the direction of Professor Reginaldo Barros - UFRPE)

ABSTRACT

Plants produce a wide variety of metabolites that are linked to defense mechanisms. These organic compounds may exhibit a potential insecticide and have become an important alternative to the use of insecticides. The chemical defense mechanism of plants also includes the production of proteins. The objective of this study was to investigate the effect of cladodes extract of *Opuntia ficus-indica* (forage palm) on the biology (survival, fertility and oviposition behavior) of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) and determine if lectin active principle of the extract. Extracts of cladodes were evaluated on the activity of digestive enzymes; structural organization and intestinal histochemistry of *P. xylostella* larvae are described. The results showed that *O. ficus indica* extract contains lectins (specific hemagglutinating activity: 178), and secondary metabolites such as flavonoids, cinnamic derivatives, terpenes, steroids and reducing sugars. The viability of *P. xylostella* eggs (33%) was significantly reduced ( $F = 11.34$ ,  $P < 0.001$ ) by the cladode extract at 7.2% (m / v) when compared to the control group (95%). When first-instar larvae were treated

with the extract at 7.2%, the results showed a significant reduction ( $F_{4,45} = 11.32$ ;  $P < 0.0001$ ) of the percentage of larvae (53.00%) that reached the pupal phase in relation to the control (80.00%). OfiL did not modify the viability of larvae and pupae. However, lectin and cladode extract caused inhibition of protease activity in larval gut, epithelial disorganization, and increased expression of neutral carbohydrates and proteins.

**KEY WORDS:** Diamondback moth, botanical insecticides, vegetable protein, prickly pear cactus.

EFEITO DO EXTRATO E DA LECTINA DE CLADÓDIOS DE *Opuntia ficus-indica* (L.) MILL  
(CACTACEAE) NA BIOLOGIA E FISIOLOGIA DIGESTIVA DE *Plutella xylostella* (L.)  
(LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE)

por

ELAINE CRISTINA BATISTA FERREIRA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Entomologia Agrícola.

RECIFE - PE

Fevereiro – 2018

EFEITO DO EXTRATO E DA LECTINA DE CLADÓDIOS DE *Opuntia ficus-indica* (L.) MILL  
(CACTACEAE) NA BIOLOGIA E FISIOLOGIA DIGESTIVA DE *Plutella xylostella* (L.)  
(LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE)

por

ELAINE CRISTINA BATISTA FERREIRA

Comitê de Orientação:

Reginaldo Barros - UFRPE

Emmanuel Viana Pontual - UFRPE

EFEITO DO EXTRATO E DA LECTINA DE CLADÓDIOS DE *Opuntia ficus-indica* (L.) MILL  
(CACTACEAE) NA BIOLOGIA E FISIOLOGIA DIGESTIVA DE *Plutella xylostella* (L.)  
(LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE)

por

ELAINE CRISTINA BATISTA FERREIRA

Orientador: \_\_\_\_\_  
Reginaldo Barros – UFRPE

Examinadores: \_\_\_\_\_  
Emmanuel Viana Pontual – UFRPE

\_\_\_\_\_  
Manoel Guedes Correa Gondim Junior – UFRPE

\_\_\_\_\_  
Glaucilane dos Santos Cruz – PNP/CAPE

\_\_\_\_\_  
Thiago Henrique Napoleão – UFPE

## DEDICATÓRIA

A Deus, por todas as bênçãos recebidas.

A minha família e ao meu esposo Moisés Freitas por todo afeto e confiança desde sempre.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural de Pernambuco pela oportunidade de realizar o curso de pós-graduação em Entomologia Agrícola.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola (PPGEA) pela contribuição em minha formação.

Ao meu orientador Professor Dr. Reginaldo Barros, pelo acolhimento, conselhos e incentivo. Muito obrigada!

Ao meu Co-orientador Professor Dr. Emmanuel Pontual pela contribuição muito valiosa na realização deste trabalho, por toda paciência, gentileza e incentivo. Obrigada por tudo.

A minha Família, em especial minha mãe Adelize Batista, que sempre me apoiou em todas minhas decisões, obrigada por todo amor, cuidado e confiança.

Ao meu esposo Moisés, obrigada por me incentivar, ser tão companheiro e carinhoso, tornando meus dias mais suaves.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola da UFRPE pelos ensinamentos proporcionados.

Ao Laboratório de Biologia de Insetos do Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola da UFRPE, onde trabalhei durante a maior parte do meu Doutorado.

Ao Laboratório de Bioquímica de Proteínas do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco, em especial aos professores Thiago Napoleão, Patricia

Paiva e a Doutoranda Thamara Vasconcelos pela rica contribuição neste trabalho. Muito obrigada pela disponibilidade e apoio!

Ao laboratório de Fisiologia de insetos da UFRPE, coordenado pela professora Valéria Wanderley Teixeira, obrigada por todo o suporte! Muito obrigada Nane Santos e Hilton Nobre pela valiosa contribuição na análise histológica do intestino de *Plutella xylostella*, o que enriqueceu muito este trabalho.

Ao Dr. Raul Porfírio de Almeida, meu primeiro orientador, obrigada por me incentivar a crescer como profissional e como ser humano. Trabalhar como você foi uma experiência muito enriquecedora em minha vida.

Ao pesquisador Dr. Fábio Aquino, com o qual tive oportunidade de trabalhar na graduação. Obrigada por todo incentivo.

Às minhas amigas e companheiras de “colunas” Franciele e Isabella pelo grande apoio na realização deste trabalho, obrigada pela parceria, companheirismo e paciência. Tenho certeza que durante esse período foi firmada uma linda amizade.

Agradeço aos funcionários do departamento de Fitossanidade, Marcelo e Romildo Nunes! Em especial, a Zilândia Mota por toda disponibilidade e gentileza.

Às amizades cultivadas na UFRPE ao longo de toda minha pós- graduação, em especial a Amélia, Cecília, Cynara, Daniel, Amandinha, Liliane, Girleide, Andrezo, Guilherme, Antônio, Wagner, Débora, Wel, Erasmo, Camila.

Às minhas grandes amigas desde o início da pós-graduação, Francieli Marcelino, Kamilla Dutra e Mauricéa Fidélis, obrigada por todo afeto e companheirismo.

A Vaneska Barbosa, obrigada pela amizade, por todo incentivo nos momentos de desânimo, por ser tão divertida, companheira e pela ajuda na estatística!

Às grandes amizades que cultivei durante o período da graduação na UEPB e estágio na Embrapa Algodão: Gabriela Pimentel, Silvia Ramos, Romero Silva, Suziane Gonçalves, Dayane Dias, Aninha Calazans, Daniela Viana, Jacilane Fernandes, Eduardo Vasconcellos e Airton Belo. Apesar da distância nunca esqueço vocês.

A todos muito obrigada!

## SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS .....	ix
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO .....	1
<i>Plutella xylostella</i> .....	1
Inseticidas Botânicos .....	4
Lectinas .....	6
LITERATURA CITADA .....	8
2 EXTRATO DE CLADÓDIOS DE <i>Opuntia- fícus-indica</i> (L.) MILL (CACTACEAE): UM AGENTE EMBRIOCIDA, LARVICIDA E DETERRENTE ALIMENTAR E DE OVIPOSIÇÃO PARA <i>Plutella xylostella</i> (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) .....	16
RESUMO .....	17
ABSTRACT .....	18
INTRODUÇÃO .....	19
MATERIAL E MÉTODOS .....	20
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	25
LITERATURA CITADA .....	29

3	EXTRATOS DE CLADÓDIOS DE <i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) MILL INTERFEREM NA ATIVIDADE DE ENZIMAS DIGESTIVAS E ALTERAM A ESTRUTURA E HISTOQUÍMICA DO INTESTINO MÉDIO DE LARVAS DE <i>Plutella xylostella</i> (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) PLUTELLIDAE).....	39
	RESUMO .....	40
	ABSTRACT .....	41
	INTRODUÇÃO .....	42
	MATERIAL E MÉTODOS .....	44
	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	48
	LITERATURA CITADA.....	54
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	69

# CAPÍTULO 1

## INTRODUÇÃO

### *Plutella xylostella*

*Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), popularmente conhecida como traça-das-crúciferas ou traça-das-brássicas, pode ser encontrada em mais de 80 países, sendo considerado o Lepidoptera mais distribuído no mundo (Shelton 2004, Grzywacz *et al.* 2010, Furlong *et al.* 2013). De acordo com Monnerat *et al.* (2004), essa espécie pode ter origem na região do Mediterrâneo, onde surgiram também as principais espécies de brássicas cultivadas. O ciclo de vida de *P. xylostella* é de cerca 14 dias e pode variar de acordo com as condições climáticas e quanto à disponibilidade e o tipo de alimento; sua população pode aumentar até 60 vezes entre gerações (De Bortoli *et al.* 2013, Vacari *et al.* 2012).

Os ovos da *P. xylostella* são amarelos, pequenos, medindo menos de 1 mm de diâmetro; cada fêmea oviposita em média 200 ovos, o número de ovos por fêmea e a viabilidade diminui após o 3º dia (Thuler, 2009). A fase larval compreende quatro ínstaes, atingindo cerca de 10 mm de comprimento, decorrido 7 a 10 dias da eclosão, em seguida se inicia a formação do casulo e posteriormente a fase de pupa (De Bortoli 2009). A pupa é do tipo obtecta, com coloração verde nos primeiros dias e tornando-se marrom quando se aproxima a emergência dos adultos (Thuler 2009). Os adultos são microlepidópteros de coloração parda, com aproximadamente 1 cm de comprimento, possuem hábito noturno e durante o dia se escondem nas folhagens. O dimorfismo sexual pode ser observado através de uma mancha amarelo clara no quinto segmento abdominal de larvas de terceiro e quarto instar, caracterizada pelas gônadas dos machos (Talekar & Shelton 1993, Morais & Barros 2003). Nos adultos, o dimorfismo sexual é visto na parte ventral dos

insetos, no final do abdômen, tendo os machos uma mancha escura e alongada, enquanto as fêmeas, duas manchas circulares escuras (Castelo Branco 1997).

No Brasil, *P. xylostella* encontra-se distribuída em todas as regiões, sendo um dos principais fatores limitantes na produção de brássicas devido aos danos diretos, ocasionando perdas de mais de 90% nos campos de produção de couve flor, repolho, couve brócolis, couve manteiga, couve de bruxelas, couve rábano, couve chinesa, rúcula, rabanete, nabo e agrião (Al-Shehbaz 1984, Barros *et al.* 1993, Castelo Branco *et al.* 2001, Medeiros *et al.* 2003, Filgueira 2008, Marchioro & Foerster 2014). O ataque às plantas ocorre da seguinte forma: larvas neonatas ou recém eclodidas penetram no tecido foliar para se alimentarem do parênquima, construindo galerias. Após dois dias, as larvas abandonam essas galerias e passam a alimentar-se da epiderme, perfurando as folhas, depreciando-as e inutilizando-as para a comercialização (Castelo Branco *et al.* 1997, Gallo *et al.* 2002, Imenes *et al.* 2002). Em brócolis e couve-flor, as larvas se alimentam também das inflorescências (Medeiros 2004).

Estima-se que a nível mundial, os custos do controle desta praga situam-se em torno de US\$ 4 bilhões anuais (Zalucki *et al.* 2012). Os principais métodos utilizados para o controle de *P. xylostella* incluem: rotação de culturas (Castelo Branco *et al.* 2003), armadilhas luminosas (Cardoso *et al.* 2010), reguladores de crescimento (De Bortoli *et al.* 2008), cultivares resistentes (Barros & Vendramim 1999, Boiça Júnior *et al.* 2015), feromônios (Imenes *et al.* 2002), inseticidas botânicos (Medeiros *et al.* 2005, Jesus *et al.* 2011, Kumari & Kaushik 2016), controle químico (Silva-Torres *et al.* 2010, Lima Neto & Siqueira 2017) e emprego de agentes de controle biológico como os parasitóides, predadores e microrganismos entomopatogênicos (Santos Jr. *et al.* 2006, Zago *et al.* 2010, De Bortoli *et al.* 2011, De Medeiros *et al.* 2013).

O controle químico é a principal estratégia para redução populacional de *P. xylostella*, sendo realizadas de 15 a 20 aplicações de inseticidas por ciclo da cultura no sudeste brasileiro (De

Bortoli *et al.* 2013). No estado de Pernambuco são realizadas até quatro aplicações por semana, independente da presença da praga no campo (Oliveira *et al.* 2011). Essa prática tem contribuído para a seleção de populações resistentes a inseticidas sintéticos, sobretudo às classes dos piretróides, organofosforados e carbamatos (Yu & Nguyen 1992), bem como inseticidas relativamente novos, tais como Espinosade (Lima Neto *et al.* 2016), Clorantraniliprole (Wang & Wu 2012, Ribeiro *et al.* 2013) e Clorfenapir (Lima Neto & Siqueira 2017) e inclusive inseticidas naturais como as toxinas produzidas pela bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (Shelton *et al.* 2007) e esta característica a que mais contribui para esta praga seja considerada como uma das mais pesquisadas em diversas partes do mundo (Monnerat *et al.* 2004, Castelo Branco *et al.* 2003, De Bortoli *et al.* 2013).

Alternativas de controle com o uso de inseticidas botânicos tem se mostrado viáveis (Corrêa & Salgado 2011, Isman & Grieneise 2014) e potencialmente promissores (Rondelli *et al.* 2011, Cruz *et al.* 2015, Deletre *et al.* 2016, De Andrade Dutra *et al.* 2016), pois podem ser mais seletivos, menos danosos ao ambiente e mais eficientes (Magalhães *et al.* 2014). Os inseticidas botânicos são compostos resultantes do metabolismo das plantas que podem sintetizar mais de 200.000 compostos através de várias vias metabólicas (Dixon & Strack 2003). Esses compostos podem atuar: reduzindo o consumo da dieta (efeito deterrente ou repelente de alimentação), inibindo o crescimento, causando deformações, reduzindo a fecundidade, causando mortalidade ou repelindo sítios de oviposição (Onody, 2009, Kumari & Kaushik 2016). Segundo Deletre *et al.* (2016), esses efeitos anulam os mecanismos de atração do inseto ao hospedeiro, impedindo a capacidade da praga localizar e/ ou reconhecer o seu hospedeiro, o que os torna alternativas promissoras quando comparados aos compostos sintéticos.

## **Inseticidas Botânicos**

Um dos maiores desafios enfrentados pelo setor agrícola é a produção de alimentos de maneira sustentável e a maximização dessa produção. Contudo, o uso cada vez mais frequente de inseticidas botânicos tem sido a saída pelos produtores para maximizar a produção de alimentos (Godfray & Garnett 2014). Estima-se atualmente que 2,5 milhões de toneladas de inseticidas são utilizados anualmente na atividade agrícola (FAO, 2012), com o agravante, de acordo com Koul *et al.* (2004), que menos de 1% de inseticidas aplicados nas culturas atingem a praga alvo, podendo o elevado percentual restante contaminar o solo, a água, o ar e os alimentos, o que leva a intoxicação de espécies não alvo, inclusive o homem, frequentemente de forma imperceptível. Anualmente, cerca de vinte mil pessoas morrem devido ao uso direto de agrotóxicos e cerca de 75 % desses óbitos acontecem em países em desenvolvimento (Koul *et al.* 2004, Darko & Akoto 2008, Armah, 2011).

Existem mais de 2.000 espécies de plantas que possuem propriedades inseticidas descritas e as famílias botânicas que mais têm sido pesquisadas são Meliaceae, Euphorbiaceae, Annonaceae, Apiaceae, Asteraceae, Fabaceae, Lamiaceae e Solanaceae (Garcez *et al.* 2013). De acordo com Champagne *et al.* (1992), extratos e compostos isolados a partir de diferentes tecidos de espécies dessas famílias têm mostrado efeito sobre o desenvolvimento e comportamento de insetos, atuando como reguladores de crescimento, fagodeterrentes e tóxicos. Pesquisas relacionadas a inseticidas botânicos e seus efeitos estão sendo realizadas com maior frequência (Deletre *et al.* 2016). As substâncias químicas presentes nas plantas são constituídas por dois grupos: metabólitos primários e metabólitos secundários. Os metabólitos primários como proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos são substâncias essenciais para as atividades metabólicas, encontradas em todas as células vegetais e possuem função estrutural e são responsáveis pela síntese de substâncias essenciais para a manutenção da vida, (Pereira & Cardoso, 2012). Em relação às proteínas, algumas

das classes mais conhecidas envolvidas no mecanismo de defesa de plantas contra insetos são as lectinas, proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs), inibidores de enzimas proteolíticas e quitinases (Carlini & Grossi-De-Sá 2002, Van Den Bergh *et al.* 2002). Já os metabólitos secundários, não apresentam função direta nas atividades vitais (crescimento, desenvolvimento e reprodução), são classificados como flavonoides, terpenoides, alcaloides, esteroides, taninos, saponinas e rotenóides (Fernandes, 2011) e podem provocar efeitos diversos nos insetos como deterrência na alimentação e oviposição, além de depressão da sua função imune e danos ao sistema digestivo e reprodutivo (Haviola *et al.* 2007, Procópio *et al.* 2015, Soares *et al.* 2015, Diop *et al.* 2016, Cruz *et al.* 2017).

O Brasil apresenta enorme riqueza botânica, com 56 mil espécies de plantas que podem ser avaliadas com o objetivo de descobrir novos inseticidas botânicos (Maciel *et al.* 2010). A palma forrageira, *Opuntia ficus-indica* (Mill) possui origem no México e vem sendo cultivada em regiões áridas e semi-áridas do Nordeste brasileiro por estar adaptada às condições climáticas da região e apresentar aspecto fisiológico especial quanto à absorção, aproveitamento e perda de água, suportando prolongados períodos de estiagem e podendo alcançar produtividade de até 40 toneladas de matéria seca por hectare por colheita (Santos *et al.* 2006). Essa planta apresenta uma modificação caulinar típica de plantas xerófilas, de clima árido ou semi-árido, que são os cladódios, os quais apresenta forma de raquete e coloração verde quando sadios (Schultz 1943).

*Opuntia ficus-indica* está presente em todos os continentes e é utilizada pela população para diversas finalidades que incluem a alimentação de animais ruminantes ou humana, a produção de medicamentos, cosméticos e corantes, conservação e recuperação de solos, produção de biogás, cercas vivas, paisagismo, além de uma infinidade de outros usos (Leite 2006). A maior área de cultivo de palma forrageira no Nordeste se concentra no agreste e sertão dos estados de Alagoas e Pernambuco (Leite 2006). É conhecida por ser uma fonte importante de compostos bioativos,

como betalaínas, polifenóis, carotenóides, vitamina C e sais minerais (Utkarsha *et al.* 2010, Cayupan *et al.* 2011). Estudos realizados por Ginestra *et al.* (2009) também descreveram a presença de compostos fenólicos, mais propriamente flavonoides, nos cladódios de *O. ficus-indica*.

### **Lectinas**

Existem muitas proteínas envolvidas nos mecanismos de defesa das plantas contra patógenos e herbívoros ou cuja síntese pode ser modulada em resposta às condições ambientais (Kant *et al.* 2015). As lectinas são proteínas de origem não imunológica e que têm a capacidade de interagir com carboidratos livres ou conjugados de forma reversível e específica (Correia *at al.* 2008), encontradas nos mais diversos grupos de organismos como algas, plantas, bactérias, vírus, fungos, animais vertebrados e invertebrados (Silva & Silva 2000, Wang *et al.* 2009). Nas plantas já foram identificadas em diversas famílias botânicas como Cactaceae (Santana *et al.* 2009), Fabaceae (López & Santos 2015), Liliaceae (Fitches *et al.* 2008) Moringaceae (Oliveira *et al.* 2017), Polygonaceae (Zibae *et al.* 2014), Anacardiaceae (Lima *et al.* 2017), Euphorbiaceae (Peumans *et al.* 2003) e podem ser isoladas de diversas partes da planta como cascas, cladódios, flores, folhas, rizomas, raízes e sementes (Paiva *et al.* 2011). Isso reforça que lectinas têm um papel biológico fundamental nas plantas, porque estão presentes em vários tecidos e espécies (Tagliari *et al.* 2004).

Devido ao potencial inseticida dessas proteínas, estudos tem se intensificado com insetos de diversas ordens, de importância agrícola, médica e urbana: Lepidoptera (Zibae *et al.* 2015, De Oliveira *et al.* 2017, Rahimi *et al.* 2018), Coleoptera (Napoleão *et al.* 2013, Li-Byarlay *et al.* 2016), Hemiptera (Fitches *et al.* 2008, Roy *et al.* 2014), Blattodea (Napoleão *et al.* 2011, Lima *et al.* 2017), Diptera (Napoleão *et al.* 2012, Agra-Neto *et al.* 2014) e Neuroptera (Li & Romeis 2009). Seus efeitos podem atingir insetos em diversos estágios de vida como larvas (Napoleão *et*

*al.* 2012, Zibae *et al.* 2014), ninfas (Bandyopadhyay *et al.* 2001), pupas (Kaur *et al.* 2009) e adultos (Sauvion *et al.* 2004) ou interferir no seu comportamento de oviposição (Santos *et al.* 2012).

Dentre os efeitos deletérios causados pela lectina, destacam-se os impactos na nutrição e alimentação dos insetos (Bolognesi, 2002). Ao serem ingeridas, as lectinas podem atuar no intestino médio (mesêntero), ligando-se a quitina ou proteínas glicosiladas contendo resíduos de *N*-acetilglicosamina e sobre a borda em escova das células epiteliais presentes na membrana peritrófica, levando à intoxicação (Peumans & Van Damme, 1995, Sauvion *et al.* 2004; Michiels *et al.* 2010). Outro efeito tóxico das lectinas é através da ligação a enzimas digestivas (Lima *et al.* 2017).

Em estudos anteriores realizados com a espécie vegetal *Moringa oleifera* (Moringaceae) foi reportado que uma lectina isolada das sementes induziu alterações morfológicas no intestino de larvas de quarto instar de *Aedes aegypti* (Linneu) (Diptera: Culicidae), promovendo assim a mortalidade (Coelho *et al.* 2009). O extrato de folhas de *Myracrodruon urundeuva* (Allemão) (Anacardiaceae) foi tóxico quando ingerido por adultos de *Sitophilus zeamais* (Motsch) (Coleoptera: Curculionidae). Os autores sugeriram que essa toxicidade pode estar ligada à inibição de enzimas digestivas dos insetos (Napoleão *et al.* 2013). Macedo *et al.* (2003) investigaram a lectina das folhas de *Bauhinia monandra* (Kurz.) (Leguminosae: Caesalpinioideae) quanto ao efeito sobre os insetos praga de grãos armazenados *Efestia kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae), *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera: Bruchidae) e *Zabrotes subfasciatus* (Bohemann) (Coleoptera: Bruchidae) e verificaram que a dieta artificial contendo a lectina a 1% diminuiu o peso de larvas de *Z. subfasciatus* e *C. maculatus* em 40% em relação ao controle, enquanto concentrações de 0,5 e 0,4% causaram 20 e 50% de redução da massa dos insetos, respectivamente.

O isolamento e caracterização das lectinas em plantas da Caatinga ainda têm sido pouco realizados, apesar do potencial bioquímico dessas espécies como reportado por Arcoverde *et al.* (2014). Assim, a presente Tese teve como objetivos investigar o efeito do extrato de cladódios de *O. ficus-indica* (palma forrageira) sobre a biologia (sobrevivência, fertilidade e comportamento de oviposição) de *P. xylostella* e determinar se a lectina isolada a partir dela está envolvida nas atividades detectadas. Adicionalmente, o efeito das preparações de cladódios sobre a organização estrutural do intestino, histoquímica e atividade de enzimas digestivas de larvas de *P. xylostella* é também descrito.

### Literatura Citada

- Al-Shehbaz, I.A. 1984.** The tribes of Cruciferae (Brassicaceae) in the southeastern United States. J. Arnold Arbor. 65: 343-373.
- Arcoverde, J.H.V., A.D.S. Carvalho, F.P. A. Neves, B.P. Dionízio, P., E.V. Pontual, P.M.G Paiva & M.D.G.C. Cunha. 2014.** Screening of Caatinga plants as sources of lectins and trypsin inhibitors. Nat. Prod. Res. 28:1297-1301.
- Armah, F.A. 2011.** Assessment of pesticide residues in vegetables at the farm gate: cabbage (*Brassica oleracea*) cultivation in Cape Coast, Ghana. Res. J. Environ. Toxicol. 5: 202.
- Bandyopadhyay S. & A.S. Roy. 2001.** Binding of garlic (*Allium sativum*) leaf lectin to the gut receptors of homopteran pests is correlated to its insecticidal activity. Pl. Sci. 161: 1025-1033.
- Barros, R., I.B. Alberto Júnior, A.J. Oliveira, A.C.F. Souza & V. Lopes. 1993.** Controle químico da traça das crucíferas, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) em repolho. An. Soc. Entomol. Bras. 22: 463-469.
- Barros, R & J. D. Vendramim. 1999.** Efeito de cultivares de repolho, utilizadas para criação de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), no desenvolvimento de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). An. Soc. Entomol. Brasil 28: 469 –476.
- Boiça junior, A.L., A.L. Torres, B.H.S. Souza, A.G. Silva, R. Barros. 2015.** Combination of resistant cultivars, botanical insecticides, and biological control for *Plutella xylostella* management on cabbage. Afr. J. Agric. Res. 10: 588-595.

- Bolognesi, R. 2002.** Síntese, degradação e funções da membrana peritrófica dos insetos. Tese de Doutorado, USP, São Paulo, 172 p.
- Cardoso, M.O., A. M.S.R. Pamplona & M. Michereff Filho. 2010.** Recomendações técnicas para o controle de lepidópteros-pragas em couve e repolho no Amazonas. Manaus, Embrapa Amazônia Ocidental, 15p. (Circular Técnica 35).
- Carlini, C.R & M.F. Grossi-de-Sá. 2002.** Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 40: 1515-1539.
- Castelo Branco, M., F.H. França & G.L. Villas Boas. 1997.** Traça-das-crucíferas (*Plutella xylostella*). Brasília, Embrapa Hortaliças (Comunicado Técnico 4), 4p.
- Castelo Branco, M & F.H. França. 2001.** Traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae), p. 86-89, In E.F. Vilela, R.A. Zucchi & F. Cantor (eds.), Histórico e impacto de pragas introduzidas no Brasil. Ribeirão Preto, Holos Editora, 173p.
- Castelo Branco, M., F.H. França, L.A. Pontes & P.S.T. Amaral. 2003.** Avaliação da suscetibilidade a inseticidas em populações da traça-das-crucíferas de algumas áreas do Brasil. *Hortic. Bras.* 21: 549-552.
- Cayupan, Y., M. Ochoa & M. Nazareno. 2011.** Health-promoting substances and antioxidant properties of *Opuntia sp.* fruits. Changes in bioactive-compound contents during ripening process. *Food Chem.* 126: 514-519.
- Champagne, D.E., O.Koul, M.B.Isman, G.G.E. Scudder & G.H.N. Towers. 1992.** Biological activity of limonoids from the Rutales. *Phytochemistry* 31: 377-394.
- Coelho, J.S., N.D.L Santos, T.H. Napoleão, F.S. Gomes, R.S. Ferreira, R.B. Zingali., L.C.B.B. Coelho, S.P. Leite, D.M.A.F. Navarro & P.M.G. Paiva. 2009.** Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. *Chemosphere* 77: 934-938.
- Corrêa, J.C.R & H.R.N. Salgado. 2011.** Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. *Rev. Bras. Pl. Med.* 500-506.
- Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B & Paiva, P.M.G. 2008.** Lectins, carbohydrate recognition molecules: Are they toxic? *Recent Trend. Toxicol.* 37: 47- 59.
- Cruz, G. D. S., V. W.Teixeira, J. V. Oliveira, A.A.C. Teixeira, A.C. Araújo, T.J.D.S Alves & M.O. Breda. 2015.** Alteraciones Histológicas e Histoquímicas Provocadas por el Aceite Esencial de Clavo de Olor en las Gónadas de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Int. J. Morphol.* 33: 1393-1400.
- Darko, G.O & C.O. Akoto. 2008.** Persistent organochlorine pesticide residues in fish, sediments and water from Lake Bosomtwi. *Chemosphere* 72: 21–24.

- De Andrade Dutra, K., J.V. Oliveira, D.M.D.A. F. Navarro & J.P.O Santos. 2016.** Control of *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) in *Vigna unguiculata* (L.) WALP. with essential oils from four Citrus spp. plants. J. Stored Prod. Res. 68: 25-32.
- Deletre, E., B. Schatz, D. Bourguet, F.Chandre, L.Williams, A. Ratnadass & T. Martin. 2016.** Prospects for repellent in pest control: current developments and future challenges. Chemoecology. 26: 127-142.
- Bortoli, S.A. 2009.** Criação de insetos: da base a biofábrica. Jaboticabal: edição própria. 223p.
- Bortoli, S.A., R.T. Thuler & B. S. Lopes. 2008.** Efeito de lufenuron e azadiractina sobre adultos de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). Científica 34: 53-58.
- Bortoli, S.A., R.A. Polanczyk, A.M. Vacari, C.P. De Bortoli & R.T. Duarte. 2013.** *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae): Tactics for integrated pest management in Brassicaceae. Weed and Pest Control-Conventional and New Challenges. Rijeka: InTech. 31-51. In S. Soloneski & M. Larramendy (eds.). Weed and pest control - conventional and new challenges. Rijeka, Croatia, InTech, 205p.
- Medeiros, F.H.V., G. Silva & R. Barros. 2013.** Efeito de bactérias sobre a biologia da traça das crucíferas (*Plutella xylostella*) em repolho (*Brassica oleraceae* Var. Capitata). An. Acad. Pernambucana Ciên. Agron. 2: 204-212.
- Dixon R.A & D. Strack. 2003.** Phytochemistry meets genome analysis, and beyond. Phytochemistry 62: 815–16.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2012.** Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#home>> Acesso em 21 de Novembro de 2016.
- Fernandes, G.S. 2011.** Prospecção nutricional e bioativa de sementes de dez espécies vegetais da Caatinga. Tese de Doutorado, UFC, Fortaleza, 331 p.
- Filgueira, F.A.R. 2008.** Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3.ed. Viçosa, Editora UFV, 402 p.
- Fitches, E., J. Philip, G. Hinchliffe, L. Vercruysse, N. Chougule & J.A. Gatehouse. 2008.** An evaluation of garlic lectin as an alternative carrier domain for insecticidal fusion proteins. Insect Sci. 15: 483–495.
- Furlong, M.J., D.J. Wright & L.M. Dossall. 2013.** Diamondback moth ecology and management: problems, progress, and prospects. Annu. Rev. Entomol. 58: 517-541.
- Gallo, D., O. Nakano, S. Silveira Neto, R.P.L. Carvalho, G.C. de Batista, E. Berti Filho, J.R.P. Parra, R.A. Zucchi, S.B. Alves & J.D. Vendramim. 2002.** Manual de Entomologia agrícola. 2 ed. São Paulo, Agronômica Ceres, 649p.

- Garcez, W.S., F.R. Garcez, L.M.G.E. Silva & U.C. Sarmento. 2013.** Substâncias de origem vegetal com atividade larvicida contra *Aedes aegypti*. Rev. Virtual Quim. 5: 363-393.
- Ginestra, G., M.L. Parker, R.N. Bennett, J. Robertson & G. Mandalari. 2009.** Anatomical, Chemical, and biochemical characterization of cladodes from prickly pear *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. J. Agric. Food Chem. 57: 10323- 10330.
- Godfray, H.C.J & T. Garnett. 2014.** Food security and sustainable intensification. Phil. Trans. R. Soc. B. 369 (1639), 20120273.
- Grzywacz, D.A., A.R. Rossbach, D. Russell, R. Srinivasan & A.M. Shelton. 2010.** Current control methods for diamondback moth and prospects for improved management with lepidopteran-resistant Bt vegetables brassicas in Asia and Africa. Crop Prot. 29: 68-79.
- Haviola, S., L. Kapari, V. Ossipov, M.J. Rantala, T. Ruuhola & E. Haukioja. 2007.** Foliar phenolics are differently associated with *Epirrita autumnata* growth and immunocompetence. J. Chem. Ecol. 33: 1013–1023.
- Imenes, S.D.L., T.B. Campos, S.M. Rodrigues Netto & E.C. Bergmann. 2002.** Avaliação da atratividade de feromônio sexual sintético da traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), em cultivo orgânico de repolho. Arq. Inst. Biol. 69:81-84.
- Isman, M.B & M.L. Grieneisen. 2014.** Botanical insecticide research: many publications, limited useful data. Trends Pl. Sci. 19:140-145.
- Kant, M. R., W. Jonckheere, B. Knecht, F. Lemos, J. Liu, B.C.J. Schimmel, C.A. Villarroel, L.M.S. Ataíde, W. Dermauw, J.J. Glas, M. Egas, A. Janssen, T. Van Leeuwen, T. Schuurink, Sabelis & J.M. Alba. 2015.** Mechanisms and ecological consequences of plant defence induction and suppression in herbivore communities. Ann. Bot. 115: 1015-1051.
- Kaur, M., K. Singh, P.J. Rup, S.S. Kamboj & J. Singh. 2009.** Anti-insect potential of lectins from *Arisaema* species towards *Bactrocera cucurbitae*. J. Environ. Biol. 30: 1019-1023
- Koul, O., G.S. Dhaliwal & G.W. Curperus. 2004.** Integrated Pest Management: Potential, Constraints and Challenges. Wallingford, UK, CABI Publishing, 336p.
- Kumari, A & N. Kaushik. 2016.** Oviposition deterrents in herbivorous insects and their potential use in integrated pest management. Indian J. Exp. Biol. 54: 163–174
- Leite, M.L.V. 2006.** Palma Forrageira (*Opuntia ficus indica* e *Nopalea cochenilifera*) Universidade Federal da Paraíba – UFPB, Centro de Ciências Agrárias – CCA, Grupo de Pesquisa Lavoura Xerófila – GPLX, Areia-PB. 6p.
- Li-Byarlay, H., B.R. Pittendrigh & L.L. Murdock. 2016.** Plant Defense Inhibitors Affect the Structures of Midgut Cells in *Drosophila melanogaster* and *Callosobruchus maculatus*. Int. J. Trop Insect Sci. 8: 28-59.

- Lima Neto, J.E., M.H. Amaral, H.A. Siqueira, R. Barros & P.A. Silva. 2016.** Resistance monitoring of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) to risk-reduced insecticides and cross resistance to spinetoram. *Phytoparasitica* 44: 631-640.
- Lima Neto, J.E. & Siqueira, H.A.A.D. 2017.** Selection of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) to Chlorfenapyr Resistance: Heritability and the number of genes involved. *Rev Caatinga*. 30: 1067-1072.
- López, R.E.S & B.C. Santos. 2015.** *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae). ARCA-Repositório Institucional da Fio Cruz. *Revista Fitos*, [S.l.], 9:217-232.
- Maciel, M.V., S.M. Morais, C.M.L. Bevilaqua & S.S.A. Amóra. 2010.** Extratos vegetais usados no controle de dípteros vetores de zoonoses. *Rev. Bras. Pl. Med.* 12: 105-112.
- Magalhães, G.O., A.M. Vacari, V.L. Laurentis, S.A. De Bortoli & R.A. Polanczyk. 2014.** Interactions of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides and the predatory stink bug *Podisus nigrispinus* to control *Plutella xylostella*. *J. Appl. Entomol.* 139: 123-133.
- Marchioro, C.A & Foerster, L.A. 2014.** Preference-performance linkage in the diamondback moth, *Plutella xylostella*, and implications for its management. *J. Insect Sci.*14: 1-14.
- Medeiros, P.T., J.M.C.S. Dias, R.G. Monnerat & N.R. Souza. 2003.** Instalação e manutenção de criação massal da traça-das-crucíferas *Plutella xylostella*. Brasília, Embrapa Hortaliças 4p. (Circular Técnica, 29).
- Medeiros, C.A.M. 2004.** Efeito inseticida de extratos vegetais aquosos sobre *Ascia monuste orseis* (Latreille) em couve (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.). Dissertação (Mestrado) - UNESP, Jaboticabal, 83 p.
- Michiels, K., E.J.M. Van Damme & G. Smagghe. 2010.** Plant-insect interactions: what can we learn from plant lectins? *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 73: 193–212.
- Monnerat, R.G., S.C.M. Leal-Bertioli, D.J. Bertioli, T.M Butt & D. Bordat. 2004.** Caracterização de populações geograficamente distintas da traça-das-crucíferas por susceptibilidade ao *Bacillus thuringiensis* Berliner e RAPD-PCR. *Hortic. Bras.* 22: 607-609.
- Morais F.M & R. Barros. 2003.** Dimorfismo sexual em Traça-das-crucíferas *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) alimentadas em couve (*Brassica oleracea*). *Hortic. Bras.* 21:2
- Napoleão, T.H., F.S. Gomes, T.A. Lima, N.D Santos, R.A. Sá, A.C. Albuquerque & P.M.Paiva. 2011.** Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms. *Int. Biodeterior.* 65: 52-59.
- Napoleão, T.H., E.V. Pontual, T.A. Lima, N.D.L. Santos, R.A. Sá, L.C.B.B. Coelho., D.M.A.F. Navarro & P.M.G. Paiva. 2012.** Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. *Parasitol. Res.* 110: 609–616.

- Napoleão, T.H., B. R. Belmonte, E.V. Pontual, L.P. Albuquerque, R.A. Sá, L. Paiva & P.M.G. Paiva. 2013.** Deleterious effects of *Myracrodruon urundeuva* leaf extract and lectin on the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae). J. Stored. Prod. Res. 54: 26-33.
- Oliveira, A.C., H.A.A. Siqueira, J.V. Oliveira, J.E. Silva & M. Michereff Filho. 2011.** Resistance of Brazilian diamondback moth populations to insecticides. Sci. Agric. 68: 154-159.
- Oliveira, C.F.R., M.C. Moura, T.H. Napoleão, P.M.G. Paiva, L.C.B.B Coelho & M.L.R. Macedo. 2017.** A chitin-binding lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) impairs the digestive physiology of the Mediterranean flour larvae, *Anagasta kuehniella*. Pestic. Biochem. Physiol. 142: 67-76
- Onody, H.C. 2009.** Estudo da fauna de Hymenoptera parasitoides associados a hortas orgânicas e da utilização de extratos vegetais no controle de *Plutella xylostella* (Lepidoptera, Plutellidae). Tese de Doutorado, UFSCar, 142p
- Paiva, P.M.G., G.M.S. Santana, I.F.A.C. Souza, L.P. Albuquerque, A.C. Agra-Neto, A.C. Albuquerque, L.A. Luz, T.H. Napoleão & L.C.B.B. Coelho. 2011.** Effect of lectins from *Opuntia ficus indica* cladodes and *Moringa oleifera* seeds on survival of *Nasutitermes corniger*. Int. Biodeterior. Biodegradation 65 : 982-989.
- Pereira, R.J. & M.G. Cardoso. 2012.** Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. J. Biotec. Biodiv. 3: 146-152.
- Peumans, W.J & E.J.M. Van Damme. 1996.** Prevalence, biological activity and genetic manipulation of lectins in foods. Trends Food Sci. Technol. 7: 132-138.
- Procópio, T.F., K.M. Fernandes, E.V. Pontual, R.M. Ximenes, R.C. Oliveira, S.C. de Santana & T.H. Napoleão. 2015.** *Schinus terebinthifolius* Leaf Extract Causes Midgut Damage, Interfering with Survival and Development of *Aedes aegypti* Larvae. PLoS ONE 10: e0126612.
- Rahimi, V., J. Hajizadeh, A. Zibae & J.J. Sendi. 2018.** Toxicity and physiological effects of an extracted lectin from *Polygonum persicaria* L. on *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). Physiol. Mol. Pl. Pathol. 101: 38-44.
- Rondelli, V. M., D. Pratisoli, R.A. Polanczyk, E.J. Marques, G.M. Sturm & M.O. Tiburcio. 2011.** Associação do óleo de mamona com *Beauveria bassiana* no controle da traça-das-crucíferas. Pesq. Agropec. Bras. 46: 212-214.
- Roy, A., S. Gupta, D. Hess, K.P. Das & S. Das. 2014.** Binding of insecticidal lectin *Colocasia esculenta* tuber agglutinin (CEA) to midgut receptors of *Bemisia tabaci* and *Lipaphis erysimi* provides clues to its insecticidal potential. J. Proteomics 14: 1646-1659.

- Ribeiro, L.M.S., V. Wanderley-Teixeira, H.N. Ferreira, Á.A.C. Teixeira & H.A.A. Siqueira. 2013.** Fitness costs associated with field-evolved resistance to chlorantraniliprole in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). Bull. Entomol. Res. 104: 88-96.
- Santana, G.M.S., L.P. Albuquerque, D.A. Simões, L.C.B.B. Coelho, P.M.G. Paiva & N.B. Gusmão. 2009.** Isolation of lectin from *Opuntia ficus-indica* cladodes. Acta Hortic. 811: 281-286.
- Santos, D.C., I. Farias & M.A. Lira. 2006.** Manejo e utilização da palma forrageira (*Opuntia e Nopalea*) em Pernambuco. Recife, Instituto Agrônômico de Pernambuco, 48p.
- Santos, N.D., Lima, K.S. Moura, T.H. Napoleão, G.K.N. Santos, L.C.B.B. Coelho, D.M.D.A.F. Navarro & P.M.G. Paiva. 2012.** Oviposition-stimulant and ovicidal activities of *Moringa oleifera* lectin on *Aedes aegypti*. PLoS ONE. 9: e44840.
- Sauvion, N., H. Charles, G. Febvay & Y. Rahbé. 2004 .** Effects of jackbean lectin (ConA) on the feeding behavior and kinetics of intoxication of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. Entomol. Exp. Appl. 110: 31–44.
- Schultz, R.A. 1943.** Introdução ao estudo da botânica sistemática. 2 ed., Porto Alegre, O Globo, 562p.
- Shelton, A.M & B.A. Nault. 2004.** Dead-end trap cropping: a technique to improve management of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). Crop Prot. 23: 497-503.
- Shelton, A.M. 2007.** Considerations on the use of transgenic crops for insect control. J. Develop. Stud. 43: 890–900.
- Silva, M.R & M.A.A.P. Silva. 2000.** Fatores antinutricionais: inibidores de proteases e lectinas. Braz. J. Nutrition 13: 3-9.
- Silva-Torres, C.S.A., I.V.A.F. Pontes, J.B. Torres, R. Barros. 2010.** New records of natural enemies of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) in Pernambuco, Brazil. Neotrop. Entomol. 39: 835-838.
- Tagliari, M.S., N. Knaak & L.M. Fiuza. 2004.** Plantas inseticidas: interações e compostos. Pesq. Agropec. Gaúcha 10: 101-111.
- Talekar, N.S. & A.M. Shelton. 1993.** Biology, ecology, and management of the diamondback moth. Annu. Rev. Entomol. 38: 275-301.
- Thuler, R.T. 2009.** Criação de *Plutella xylostella*, p. 58-68. In S.A. Bortoli (ed.), Criação de insetos: da base à biofábrica. Jaboticabal, Edição Própria, 189p.

- Utkarsha, U., S. Shedbalkar, V. Adki, P. Jadhav & A.B. Vishwas. 2010.** *Opuntia* and Other Cacti: Applications and Biotechnological Insights. Trop. Pl. Biol. 3: 136-150
- Vacari, A.M., S.A. De Bortoli & J.B. Torres. 2012.** Relationship between predation by *Podisus nigrispinus* and developmental phase and density of its prey, *Plutella xylostella*. Entomol. Exp. Appl. 145: 30-37.
- Van Den Bergh, K.P.B., P. Proost, J. Van Damme, J. Coosemans, E.J.M. Van Damme & W.J. Peumans. 2002.** Five disulfide bridges stabilize a heveintype antimicrobial peptide from the bark of spindle tree (*Euonymus europaeus* L.). FEBS Lett. 530: 181-185.
- Wang, X.W., X.W. Zhang, W.T. Xu, X.F. Zhao & J.X. Wang. 2009.** A novel C-type lectin (*Fc-Lec4*) facilitates the clearance of *Vibrio anguillarum* in vivo in Chinese white shrimp. Develop. Comp. Immunol. 33: 1039-1047.
- Yu, S.J & S.N. Nguyen. 1992.** Detection of biochemical characterization of insecticide resistance in the diamondback moth. Pestic. Biochem. Physiol. 44: 74-81.
- Zago, H.B., R. Barros, J.B. Torres & D. Pratissoli. 2010.** Egg distribution of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) and the parasitism by *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Neotrop. Entomol. 39: 241-247.
- Zalucki, M.P., R. A. Shabbir, D. Silva, L. Adamson & M.J. Furlong. 2012.** Estimating the economic cost of one of the world's major insect pests, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae): just how long is a piece of string? J. Econ. Entomol. 105:1115-1129.
- Zibae, A., Z. Alborzi, A. Karimi-Malati & M. Salimi. 2014.** Effects of a lectin from *Polygonum persicaria* L. on *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera: Pieridae). J. Pl. Prot. 54: 250-257.

## CAPÍTULO 2

EXTRATO DE CLADÓDIOS DE *Opuntia- ficus-indica* (L.) MILL (CACTACEAE): UM AGENTE EMBRIOCIDA, LARVICIDA E DETERRENTE ALIMENTAR E DE OVIPOSIÇÃO PARA *Plutella xylostella* (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE)<sup>1</sup>

ELAINE C. B. FERREIRA<sup>2</sup>

<sup>2</sup>Departamento de Agronomia, Área de Fitossanidade, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, 52171-900, Brasil.

---

<sup>1</sup>Ferreira, E.C.B. Extrato de cladódios de *Opuntia- ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae): um agente embriocida, larvicida e deterrente alimentar e de oviposição para *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). A ser submetido.

RESUMO - O controle químico ainda é a principal estratégia para redução populacional da traça-das-brássicas, *Plutella xylostella* (L.), uma praga de importância mundial. Este trabalho descreve a caracterização do extrato de cladódios de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill quanto à presença de lectinas e de metabólitos secundários e quanto ao efeito na biologia (sobrevivência, fertilidade e comportamento de oviposição) de *P. xylostella*. O extrato de cladódios contém lectinas (atividade hemaglutinante específica: 178) e compostos secundários como flavonoides, derivados cinâmicos, terpenos, esteroides e açúcares redutores. A viabilidade dos ovos de *P. xylostella* (33%) foi reduzida pelo extrato de cladódios a 7,2% (m/v) quando comparada ao grupo controle (95%). Quando larvas de primeiro instar foram tratadas com o extrato de cladódios, os resultados revelaram uma redução do percentual de larvas (53,00%) que alcançaram a fase de pupa em relação ao controle (80,00%), mas nenhuma alteração significativa foi detectada na viabilidade de pupas e na fertilidade dos adultos. O extrato a 7,2% (m/v) mostrou efeito fagodeterrente (índice de preferência < 1) e todos os extratos inibiram a oviposição. Portanto, cladódios de *O. ficus-indica* constituem uma fonte promissora de compostos tóxicos para ovos e larvas de *P. xylostella* e constitui um agente deterrente alimentar e de oviposição.

PALAVRAS-CHAVE: Traça-das-crucíferas, inseticida natural, palma forrageira

CLADODIUM EXTRACT OF *Opuntia-ficus indica* (L.) MILL (CACTACEAE): AN  
EMBRIOCIDA AGENT, LARVICIDE AND FOOD AND OVIPOSITION DETERMINATION  
FOR *Plutella xylostella* (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE)

ABSTRACT- Chemical control is still the main strategy for population reduction of the moth, *Plutella xylostella* (L.), a pest of worldwide importance. This work describes the characterization of cladodium extract of *Opuntia ficus-indica* (L.) (Mill) for the presence of lectins and secondary metabolites and the effect on biology (survival, fertility and oviposition behavior) of *P. xylostella*. The cladodium extract contains lectins (specific hemagglutinating activity: 178), flavonoids, cinnamic derivatives, terpenes, steroids and reducing sugars. The viability of the eggs of *P. xylostella* (33%) was reduced by the cladodes extract to 7.2% (m/v) when compared to the control group (95%). When first-instar larvae were treated with cladodium extract, the results revealed a reduction in the percentage of larvae (53.00%) that reached the pupa phase in relation to the control (80.00%), but no significant alteration was observed detected in the viability of pupae and in the fertility of adults. The extract at 7.2% (m/v) showed phosphatidic effect (preference index <1) and all extracts inhibited oviposition. Therefore, cladode of *O. ficus-indica* is a promising source of toxic compounds for eggs and larvae of *P. xylostella* and constitutes a detergent food and oviposition agent.

KEYWORDS: Diamondback moth, natural insecticide, prickly pear cactus

## Introdução

A família Brassicaceae apresenta grande importância econômica e compreende cerca de 3.350 espécies que incluem 14 hortaliças, dentre as quais merecem destaque: o repolho *Brassica oleracea* (L.) var. capitata, a couve-flor *B. oleracea* (L.) var. botrytis, a couve folha *B. oleracea* (L.) var. acephala, o brócolis *B. oleracea* (L.) var. italica e a mostarda *B. juncea* (L.) (Al-Shehbaz 1984, Figueira 2008). As hortaliças, brássicas ou crucíferas, como são também conhecidas, contribuem com mais de US\$ 26 bilhões para a economia mundial (FAOSTAT, 2012).

A mariposa *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae), conhecida popularmente como traça-das-crucíferas ou traça-das-brássicas é uma praga cosmopolita e especialista em brássicas. Apresenta elevado número de gerações por ano aliado ao alto potencial de dano nos hospedeiros, principalmente nas regiões de clima tropical como o Brasil, pois o ciclo de vida está associado diretamente a fatores ambientais (Talekar & Shelton 1993, Pereira *et al.* 2007) e está presente onde quer que existam suas plantas hospedeiras, sendo considerada a espécie mais distribuída dentre os Lepidoptera (Shelton & Nault 2004).

*P. xylostella* começa a se alimentar da planta hospedeira a partir do primeiro instar larval nas quais fazem minas; no segundo instar as larvas saem das minas e se alimentam de toda planta (Castelo Branco *et al.* 2003). A injúria é mais intensa quando atinge terceiro instar, onde causam severas injúrias nas folhas, ocasionando danos na produção que variam de 58-100%, o que tem inviabilizado economicamente o cultivo dessa cultura (Barros *et al.* 1993). O controle químico é a principal forma de controle dessa praga (Sparks & Nauem 2015), embora sua utilização indiscriminada, além de contaminar o ambiente, tendo causado resistência de populações de insetos aos produtos empregados.

A resistência de artrópodes a inseticidas tem sido um dos maiores problemas da produção agrícola (Whalon *et al.* 2008). A resistência de *P. xylostella* tem sido relatada cerca de 95

compostos (APRD 2017), incluindo carbamatos, piretróides, organofosforados e inseticidas relativamente novos, tais como Espinosade (Lima Neto *et al.* 2016), Clorantraniliprole (Wang & Wu 2012, Ribeiro *et al.* 2013) e Clorfenapir (Lima Neto & Siqueira 2017). Essa praga foi o primeiro inseto a desenvolver resistência a *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (Tabashnik *et al.* 1990). Esses relatos têm impulsionado a busca por novas opções para o manejo de *P. xylostella*.

Produtos naturais extraídos de plantas constituem uma fonte de substâncias bioativas, sendo um forte aliado a outros métodos para controle de insetos, apresentando maior grau de biodegradabilidade, são menos tóxicos para espécies não alvo, e, por tanto, podem reduzir os efeitos negativos ocasionados pela aplicação descontrolada de inseticidas organossintéticos (Torres *et al.* 2006). Os metabólitos secundários, como flavonoides, polifenóis, taninos, alcaloides, glicosídeos cardiotônicos, saponinas, antraquinonas, terpenos e esteroides são encontrados em plantas e apresentam propriedades biológicas (Pereira *et al.* 2012, War *et al.* 2012). Esses metabólitos podem atuar na biologia e fisiologia de insetos de várias ordens (França *et al.* 2009, Breda *et al.* 2012, Da Silva *et al.* 2016, Cruz *et al.* 2017).

Até o momento não se tem registro de investigações visando avaliar o efeito do uso da palma *Opuntia ficus indica* Mill (Cactaceae) na biologia de *P. xylostella*. Este trabalho descreve a caracterização do extrato de cladódios de *O. ficus-indica* quanto à presença de lectinas e de metabólitos secundários, e quanto ao efeito na sobrevivência, fertilidade e comportamento de oviposição de *P. xylostella*.

## **Material e Métodos**

**Criação de *Plutella xylostella*.** Os insetos utilizados neste estudo foram provenientes de uma população susceptível mantida no Laboratório de Biologia de Insetos e Resistência de Plantas, do

Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), sendo estas mantidas de acordo com métodos descritos por Barros e Vendramim (1999).

**Obtenção do Extrato de Cladódios de *Opuntia ficus-indica*.** Cladódios de *O. ficus-indica* var. “orelha de elefante” provenientes de plantio da Estação Experimental do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) em Arco Verde, Pernambuco, foram transferidos para o laboratório onde foram secos ao ar livre (25° C) e então triturados. A “farinha” obtida (10 g) foi homogeneizada por 16 h em NaCl 0,15 M (50 ml). Após filtração e centrifugação (4.000 g. 15 min), o sobrenadante correspondeu ao extrato bruto.

**Caracterização Química do Extrato de Cladódios de *Opuntia ficus-indica*.** O extrato de cladódios foi analisado quanto à presença de lectinas de acordo com Napoleão *et al.* (2012). Este ensaio foi realizado em placas de microtitulação, utilizando eritrócitos de coelho glutarizados (Bing *et al.* 1967) e consistiu na avaliação da capacidade do extrato de cladódios em causar hemaglutinação. A atividade hemaglutinante foi definida como o inverso da maior diluição do extrato capaz de promover total aglutinação. A atividade hemaglutinante específica correspondeu à razão entre o título e a concentração da proteína (mg/mL), a qual foi determinada de acordo com Lowry *et al.* (1951), utilizando-se uma curva padrão (0 a 500 µg/ml) de albumina sérica bovina. O Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPE aprovou o método de coleta dos eritrócitos (processo 23076.033782/2015-70).

A avaliação da composição fitoquímica do extrato de *O. ficus indica* foi realizada no Núcleo de Desenvolvimento Analítico e Tecnológico de Fitoterápicos, situado no Departamento de Ciências Farmacêuticas-UFPE. A análise foi feita por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), sendo as amostras diluídas com 2 mL de metanol e levadas ao ultrassom durante 10 minutos para completa solubilização. Todos os padrões (Tabela 1) foram utilizados na concentração de 1 mg/mL. A amostra e os padrões foram aplicados de forma manual em placas cromatográficas de

sílica gel 60-F<sub>254</sub> (Macherey-Nagel®, Germany). As placas foram desenvolvidas em cubas após saturação com a fase móvel. A cuba foi saturada durante 15 minutos, aproximadamente, à temperatura ambiente (25°C). As bandas foram aplicadas com largura de 5 mm e com uma distância entre elas e das bordas das placas de 5mm. O tamanho da largura e do comprimento das placas cromatográficas foram de 5 cm. As amostras foram aplicadas a 5 mm da origem e com término 5 mm do final da placa.

Após a eluição das placas as mesmas foram secas à temperatura ambiente, observadas sob luz ultravioleta de 254 e 365 nm e luz visível e em seguida foram digitalizadas. Na sequência foram reveladas com reagentes específicos para cada metabólito. As bandas obtidas foram comparadas às bandas dos padrões correspondentes.

**Ação Embriocida do Extrato de Cladódios de *Opuntia ficus-indica*.** Para obtenção dos ovos de *P. xylostella* foram confeccionadas gaiolas plásticas e dentro destas gaiolas colocou-se cerca de 30 pupas e como substrato de oviposição foi oferecido discos de papel filtro, após a emergência e cópula dos adultos a postura presente no papel filtro foi retirada, e com a ajuda de uma lupa quantificou-se cerca de 10 ovos. Estes papeis contendo os ovos foram recortados e mergulhados por cerca de 30 segundos nos seguintes tratamentos: extrato de cladódios a 7,2% (m/v) dialisado ou não e a 3,6% (m/v), NaCl 0,15 M e água destilada (solução controle). Cada tratamento foi constituído por dez repetições. Após serem tratados os papeis contendo os ovos foram transferidos para placas de Petri (5 cm de diâmetro), à temperatura  $25 \pm 1$  ° C,  $70 \pm 10$  % de umidade relativa e fotoperíodo de 12 h. Realizara-se avaliações diárias a fim de quantificar a viabilidade desses ovos através da observação e quantificação do número de larvas eclodidas, as quais foram retiradas das placas ao final de cada avaliação.

**Efeito do Extrato de Cladódios no Desenvolvimento de *Plutella xylostella*.** Folhas frescas de couve manteiga (*Brassica oleracea*) (variedade acephala) foram cortadas em discos de 6 cm de

diâmetro. Posteriormente, estes discos foram imersos por 30 segundos em 10 ml de extrato de cladódios a 7,2% (m/v) dialisado ou não e a 3,6% (m/v), NaCl 0,15 M ou água destilada (solução controle). Após os discos serem tratados os mesmos foram secos em temperatura ambiente durante 40 minutos, colocados em placas de petri (9 cm) e oferecidos às larvas recém-eclodidas. Para cada tratamento foram utilizadas 100 larvas distribuídas em 10 repetições. As avaliações foram feitas a cada 24 h após a montagem do experimento, onde as larvas foram continuamente mantidas alimentadas com folhas de couve não tratadas, essas, trocadas diariamente, registrando-se o número total de larvas vivas e mortas, as larvas que empupavam foram individualizadas em placas de microtitulação (96 poços) para avaliação da duração e viabilidade dessas pupas. Após a emergência dos adultos, foram selecionados 10 casais viáveis de cada tratamento, para avaliação da oviposição os quais foram confinados em copos descartáveis, cobertos com plástico filme. Diariamente os adultos eram retirados, confinados em tubos, os ovos eram contados e os adultos eram novamente confinados em outro copo. A contagem dos ovos foi realizada por três dias consecutivos. O experimento foi conduzido a  $25 \pm 1$  ° C,  $60 \pm 10$  % de umidade relativa e fotoperíodo de 12 h.

**Prefência para Alimentação de *Plutella xylostella* em Folhas Tratadas com Extrato de *Opuntia ficus-indica*.** A preferência de alimentação foi avaliada por meio de consumo foliar, mediante experimento com chance de escolha realizado entre substrato tratado com o extrato de cladódios a 7,2% (m/v) dialisado ou não e a 3,6% (m/v), NaCl 0,15 M ou água destilada (solução controle). Quinze placas de Petri (15 cm) foram forradas com papel filtro umedecido e foram colocados dois discos foliares (tratado x controle) (6cm de diâmetro) de couve manteiga de forma equidistantes. Após o tratamento dos discos foliares, 10 larvas de terceiro instar de *P. xylostella* foram colocadas no centro de cada placa. Após 24 h os discos foram submetidos a um aparelho

medidor de área foliar, modelo CI-202 (Bio Science) para determinar a área foliar consumida pelas larvas. A área consumida foi calculada pela diferença entre a área fornecida e a área restante.

O efeito produzido pelos extratos foi avaliado utilizando o índice de preferência alimentar descrito por Kogan e Goeden (1970), através da fórmula:  $IP = (2 \times T)/(C + T)$ , onde IP = índice de preferência; T = área consumida no disco de folha tratado; C = área consumida no disco de folha controle. Sendo classificado como fagoestimulante se o índice for  $>1$ , neutro = 1 e fagodeterrente  $< 1$ . Para as quais, procedeu à análise de variância e posterior teste de médias Tukey com 5% de probabilidade de erro.

**Preferência para Oviposição de *Plutella xylostella* em Folhas de Couve Tratadas com Extratos de Cladódios de *Opuntia fícus-indica*.** Os ensaios de preferência para oviposição, com chance de escolha, foram realizados em gaiolas medindo 14 cm de diâmetro e 8 cm de altura. Em cada gaiola foram dispostos dois discos foliares de couve manteiga medindo 6 cm de diâmetro, tratados com 10 mL do extrato de cladódios a 7,2% (m/ v) dialisado ou não e a 3,6% (m/ v), NaCl 0,15 M ou água destilada (solução controle). Após o tratamento dos discos, dois casais de *P. xylostella* foram liberados no interior de cada gaiola. Com o auxílio de uma lupa (Bel Photonics WF 10), foi realizada a contagem do número de ovos após 24 e 48 h da liberação dos adultos. Ao término da primeira contagem, um novo disco foliar foi novamente tratado e colocado na gaiola.

**Análise Estatística.** Os resultados referentes aos efeitos embiocida, desenvolvimento e área foliar média consumida foram submetidos a análise de variância (ANOVA, procedimento GLM) e posteriormente as médias dos tratamentos foram comparadas através do teste de Tukey HSD ( $P < 0,05$ ), utilizando o Proc ANOVA (SAS Institute 2002). Os dados referentes à preferência alimentar foram avaliados através do índice de preferência (Kogan & Goeden 1970). Os dados de preferência para oviposição foram submetidos ao teste de  $\chi^2$  ( $P < 0,05$ ), utilizando o Proc FREQ do SAS (SAS Institute 2002).

## Resultados e Discussão

**Caracterização Química do Extrato de Cladódios *Opuntia ficus-indica*.** O ensaio de atividade hemaglutinante revelou que o extrato de cladódios contém lectinas (atividade hemaglutinante específica: 178). Já a análise fitoquímica indicou a presença de flavonoides, derivados cinâmicos, terpenos, esteroides, açúcares redutores. Resultados previamente reportados por Feboli *et al.* (2015) mostraram a presença de alcaloides, taninos, flavonoides e saponinas em cladódios e frutos de *O. ficus-indica*. Adicionalmente, metabólitos secundários são produzidos em resposta às condições ambientais e, devido a isso, coletas realizadas em diferentes localidades e épocas do ano acarretam em diferenças no padrão de expressão desses compostos (De Oliveira *et al.* 2015). A detecção da atividade de lectina e metabólitos secundários têm sido relatados como potenciais agentes inseticidas (Marangoni *et al.* 2012, Oliveira *et al.* 2017, Cruz *et al.* 2017, Souza *et al.* 2018). Esse fato, aliado à grande importância de *P. xylostella* como praga agrícola, estimulou as avaliações com o extrato de cladódios descrito a seguir.

**Ação Embriocida do Extrato de Cladódios de *Opuntia ficus-indica*.** O tratamento com o extrato de cladódios a 7,2% não dialisado reduziu a viabilidade dos ovos de *P. xylostella*, resultando na eclosão de apenas cerca de 33,00% (Figura 1). A análise estatística revelou que este dado diferiu significativamente ( $F = 11,34$ ;  $P < 0,0001$ ) da eclosão dos ovos registrada nos grupos tratados com o extrato dialisado (74%), com NaCl 0,15 M (85,00%) e com a solução controle (95%). Todavia, o resultado do tratamento com o extrato a 7,2% não diferiu daquele com o extrato a 3,6% (55% de eclosão). O propósito realizar a dialise do extrato foi avaliar se o NaCl possui ação sobre os insetos.

Uma vez que ao ser dialisado o extrato de cladódios perdeu sua atividade, e que a solução de NaCl 0,15 M não interferiu na viabilidade dos ovos, é possível concluir que o efeito embriocida ocorreu devido aos componentes de baixa massa molecular, que saíram na diálise

presentes no extrato e que a presença do sal na solução é requerida para esta atividade. Tem sido reportado que a presença de sal em solução pode causar alteração a conformação, solubilidade e atividade de proteínas. Para o nosso conhecimento, este é o primeiro relato de efeito embriocida de preparações de *O. ficus-indica* para insetos. Contudo, foi previamente reportado que o extrato etanólico de cladódios de *O. ficus-indica* e suas frações aquosas, em acetato de etila e hexano apresentaram efeito embriocida contra nematoides gastrointestinais de ovinos, com inibição de eclosão dos ovos acima de 90% (Feboli, 2016).

**Efeito do Extrato de Cladódios no Desenvolvimento de *Plutella xylostella*.** Quando larvas recém-eclodidas foram tratadas com o extrato de cladódios a 7,2% não dialisado, a viabilidade de larvas (percentual de larvas que chegaram à fase de pupa) foi de 53,00% (Tabela 2), significativamente ( $F_{4, 45} = 11,32$ ;  $P < 0,0001$ ) menor que a viabilidade detectada nos grupos tratados com o extrato de cladódios a 3,6% ou 7,2% dialisado, com NaCl 0,15 M ou com a solução controle (70,00%, 78,00%, 74,00% e 80,00%, respectivamente). Similar ao que foi detectado para o efeito embriocida, os resultados com o extrato dialisado e com a solução de NaCl 0,15 M revelam que a redução na viabilidade das larvas ocorreu devido à ação dos componentes do extrato e não pela ação do sal. A ação do extrato de cladódios sobre as larvas de *P. xylostella* é um dado muito interessante, uma vez que nessa fase são causados danos severos à cultura das brássicas, devido à alimentação voraz das larvas principalmente de terceiro instar (Castelo Branco *et al.* 2001).

Embora um efeito larvicida tenha sido detectado para o extrato de cladódios, foi observado que aquelas larvas que chegaram à fase de pupa não foram afetadas pelo tratamento com o extrato (Tabela 2), uma vez que este não houve alteração significativa ( $F_{4,45} = 0,66$ ;  $P = 0,6202$ ) na viabilidade das pupas (percentual de adultos que emergiram) em relação ao controle. Após a emergência de insetos adultos, foram formados casais para cada tratamento com o objetivo de

investigar se a ingestão do extrato de cladódios pelas larvas recém-eclodidas havia sido capaz de afetar a fertilidade dos insetos. Contudo, não foram detectadas diferenças ( $F_{4, 45} = 0,60$ ;  $P = 0,6666$ ) significativas com relação ao número de ovos depositados entre os tratamentos, mesmo que uma maior taxa de oviposição tenha sido registrada para o grupo controle.

Os inseticidas neemix e neemexel, derivados da planta *Azadirachta indica* (A. Juss) afetaram os parâmetros nutricionais e causaram redução no peso das pupas e atraso no desenvolvimento de *P. xylostella* (Ahmad *et al.* 2012). Bandeira *et al.* (2013) reportaram que extratos etanólicos de flores e frutos de *Muntingia calabura* (Linneu) foram tóxicos para larvas de *P. xylostella* no primeiro instar ( $CL_{50}$  de 0,61  $\mu\text{g/mL}$  e 1,63  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente).

**Prefência para Alimentação de *Plutella xylostella* em Folhas Tratadas com Extrato de *Opuntia ficus-indica*.** O consumo das folhas de couve pelas larvas de *P. xylostella* no tratamento com o extrato de cladódios a 7,2% diferiu significativamente ( $F_{1, 28} = 16,66$ ;  $P = 0,0003$ ) do grupo controle na qual a área foliar consumida pelas larvas foi cerca de duas vezes maior, caracterizando um efeito fagodeterrente para o extrato (Tabela 3). Um resultado semelhante ( $F_{1, 28} = 18,91$ ;  $P = 0,0002$ ) foi registrado para o grupo tratado com o extrato dialisado em relação ao seu controle (NaCl 0,15 M), indicando mais uma vez que o efeito detectado reflete a ação dos componentes do extrato, e não do NaCl presente na solução. Os valores obtidos para o índice Kogan & Goeden (1970) ratificam que o extrato de cladódios constitui um agente fagodeterrente, uma vez que foram obtidos índices menores que 1 tanto para o extrato não dialisado quanto para o extrato após diálise (Tabela 3).

Segundo Deletre *et al.* (2016), a interrupção na alimentação ocorre após o inseto ter entrado em contato com o fagodeterrente ou a curto prazo após sua ingestão e, de um ponto de vista econômico e biológico, a utilização de compostos contendo este efeito para proteção de culturas pode ser interessante por reduzir ou parar o comportamento de alimentação dos insetos,

resultando na diminuição dos prejuízos ocasionados, mesmo que não haja um controle populacional efetivo.

O efeito deterrente do extrato de cladódios pode ter ocorrido devido à presença dos metabólitos secundários ou da atividade de lectina detectados na caracterização química. Efeito tóxico de preparações contendo flavonoides, derivados cinâmicos, terpenos e esteroides contra insetos têm sido relatado (Procópio *et al.* 2015, Diop *et al.* 2016, Cruz *et al.* 2017). Fonseca *et al.* (2018), reportaram que extratos metanólicos de folhas e cascas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) (Fabaceae) contendo taninos, saponinas, esteroides, terpenos, alcaloides e flavonoides apresentaram efeitos na alimentação e oviposição em larvas de *P. xylostella*. Extratos metanólico e aquoso de *Duguetia furfuraceae* (St. Hil.) (Annonaceae) e *Annona coriácea* (Mart.) (Annonaceae), respectivamente, também apresentaram efeito fagodeterrente para *P. xylostella* provavelmente devido à presença de flavonoides, alcaloides, acetogeninas de anonáceas e terpenos (Isman, 2006).

**Preferência para Oviposição de *Plutella xylostella* em Folhas de Couve Tratadas com Extratos de Cladódios de *Opuntia ficus-indica*.** O tratamento dos sítios de oviposição com o extrato de cladódios a 7,2% não dialisado reduziu significativamente ( $\chi^2= 226,66$ ; GL = 1; P <0,0001) o número de ovos depositados 24 h após o confinamento dos casais em relação ao controle (NaCl 0,15 M). Resultado semelhante foi registrado para o extrato de cladódios a 3,6% ( $\chi^2=31,68$ ; GL = 1; P <0,0001) e para o extrato a 7,2% dialisado ( $\chi^2=17,72$ ; GL = 1; P <0,0001). Os menores percentuais de oviposição foram observados nos discos tratados com o extrato a 7,2% não dialisado (16,57%), seguido do extrato a 3,6% (36,69 %) e 7,2% dialisado (39,45%). Estes dados revelam que o extrato de cladódios apresenta atividade inibidora de oviposição para *P. xylostella* e, similar aos resultados descritos acima, indica que o efeito deterrente de oviposição reflete a ação dos componentes do extrato. Os resultados indicam ainda que para esta atividade,

embora a presença de NaCl não seja indispensável, o efeito parece potencializado quando o sal está presente na solução. Adicionalmente, após 48 horas do início do teste, os tratamentos com os extratos de cladódios a 7,2% não dialisado ( $\chi^2= 172,45$ ; GL = 1; P <0,0001) ou dialisado ( $\chi^2=4,65$ ; GL = 1; P = 0,0310), e a 3,6% ( $\chi^2=7,29$ ; d.f = 1; P = 0,0065) ainda apresentaram menor número de ovos em relação aos respectivos controles (Figura 2).

Efeito deterrente de oviposição tem sido relatado para outros extratos vegetais sobre insetos praga, sobretudo Lepidoptera, incluindo *Neoleucinodes elegantalis* (Guen) (Crambidae) (França *et al.* 2009), *Spodoptera frugiperda* (Fabricius) (Noctuidae) (Arivoli & Tennyson, 2013), inclusive *P. xylostella* (Charleston *et al.* 2005, Basukriadi & Wilkins 2014, Souza *et al.* 2016). Em um estudo realizado por Kodjo *et al.* (2011), o extrato de *Ricinus communis* (L.) (Euphorbiaceae) também reduziu a oviposição pelas fêmeas de *P. xylostella*.

Em conclusão, os resultados descritos neste trabalho indicam que os extratos de cladódios de *O. ficus-indica* como um novo inseticida botânico eficaz para controle de populações de *P. xylostella* por ser tóxico para os estágios de ovo e larva. Apresentando ainda, a ação fagodeterrente afeta aspectos biológicos, como reprodução, pois em holometábolos a ingestão de nutrientes na fase imatura está diretamente relacionada ao sucesso reprodutivo e a menor concentração do extrato já apresentou esse efeito. Assim como também foi afetada a preferência de oviposição. Em adição, a utilização do extrato de cladódios para proteção das folhas de brássicas pode ser interessante devido aos efeitos deterrentes de alimentação e de oviposição aqui reportados.

### Literatura Citada

**Ahmad, N., M.S. Ansari & F.Hasan. 2012.** Effects of neem based insecticides on *Plutella xylostella* (Linn.). Crop Prot. 34: 18–24.

- Al-Shehbaz, I.A. 1984.** The tribes of Cruciferae (Brassicaceae) in the southeastern United States. *J. Arnold Arbor.* 65: 343–373.
- APRD. (Arthropod Pesticide Resistance Database). 2017.** Disponível em: <<https://www.pesticideresistance.org/index.php>> Acesso em 10 de Out. 2017.
- Arivoli, S & S. Tennyson. 2013.** Tennyson Screening of plant extracts for oviposition activity against *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Int. J. Pl. Environ. Sci.* 1: 20-24.
- Bandeira, G. N., C.A.G. Camara, M.M. Moraes, R. Barros, S. Muhammad & Y. Akhtar. 2013.** Insecticidal activity of *Muntingia calabura* extracts against larvae and pupae of diamondback, *Plutella xylostella* (Lepidoptera, Plutellidae). *J. King Saud. Univ. Sci.* 25: 83-89.
- Barros, R., I.B. Alberto Júnior, A.J. Oliveira, A.C.F. Souza & V. Lopes. 1993.** Controle químico da traça das crucíferas, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) em repolho. *An. Soc. Entomol. Bras.* 22: 463-469.
- Barros, R. & J. D. Vendramim. 1999.** Efeito de cultivares de repolho, utilizadas para criação de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), no desenvolvimento de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *An. Soc. Entomol. Bras.* 28: 469-476.
- Basukriadi, A & R.M. Wilkins. 2014.** Oviposition deterrent activities of *Pachyrhizus erosus* seed extract and other natural products on *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Insec Sci.* 14: 244.
- Breda, M.O., J.V. Oliveira, E.J. Marques, R.G. Ferreira & M.F. Santana. 2012.** Inseticidas botânicos aplicados sobre *Aphis gossypii* e seu predador *Cycloneda sanguinea* em algodão-colorido. *Pesqu. Agropec. Bras.* 46: 1424-1431.
- Castelo Branco, M & F.H. França. 2001.** Traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae), p. 86-89. In E.F. Vilela, R.A. Zucchi & F. Cantor (eds.), *Histórico e impacto de pragas introduzidas no Brasil*. Ribeirão Preto, Holos Editora, 173p.
- Castelo Branco, M., F.H. França, L.A. Pontes & P.S.T. Amaral. 2003.** Avaliação da suscetibilidade a inseticidas em populações da traça-das-crucíferas de algumas áreas do Brasil. *Hortic. Bras.* 21: 549-552.
- Couto, I. F., M.L. Fuchs, F.F. Pereira, M. Mauad, S.P. Scalon, D.M. Dresch & R.M. Mussury. 2016.** Feeding preference of *Plutella xylostella* for leaves treated with plant extracts. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 88: 1781-1789.
- Charleston, D.S., R. Kfir, L.E.M. Vet & M. Dicke. 2005.** Behavioural responses of diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) to extracts derived from *Melia azedarach* and *Azadirachta indica*. *Bull. Entomol. Res.* 95: 457-465.
- Cruz, G.S., V. Wanderley-Teixeira, J.V. Oliveira, C.G. D’assunção, F.M. Cunha, A.A.C. Teixeira, C.A. Guedes, K.A. Dutra, D.R.S. Barbosa & M.O. Breda. 2017.** Effect of trans-

anethole, limonene and your combination in nutritional componentes and their reflection on reproductive parameters and testicular apoptosis in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Chem. Biol. Interact. 263: 74-80.

**Oliveira, A.R.M.F., C.N. Jezler, R.A. Oliveira & L.C. B. Costa. 2015.** Influência da idade da planta na produção de óleo essencial de alevante. Rev. Ceres 59: 241-245.

**Silva, W.A., J.V. Oliveira, D.R.S Barbosa, M.O. Breda & A.B.E. Filno. 2016.** Bioactivity of vegetable powders on biological parameters of *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) (Coleoptera: Chrysomelidae, Bruchinae) in *Vigna unguiculata*. J. Food Agric. Sci. 86: 128-132.

**Deletre, E., B. Schatz, D. Bourguet, F.Chandre, L.Williams, A. Ratnadass & T. Martin. 2016.** Prospects for repellent in pest control: current developments and future challenges. Chemoecology 26: 127-142.

**Diop, M., A. Sène, A. Samb & S. Gueye. 2016.** Comparison of the Insecticidal Activities of Three Plants against Two Devastating Insects: *Callosobruchus maculatus* and *Sitophilus zeamais*. Op. A. Lib. J. 3:1-12.

**França, S. M., J.V. Oliveira, C.M. Oliveira, M.C. Picanço & A.P. Lôbo. 2009.** Efeitos ovicida e repelente de inseticidas botânicos e sintéticos em *Neoleucinodes elegantalis* (Guenée) (Lepidoptera: Crambidae). Bol. Sanid. Veg. Plagas 35: 649-656.

**FAOSTAT – Food and Agriculture Organization of the United Nations: Statistic. 2011.** Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acessado em Abril de 2017.

**Feboli, A., A.C. Laurentiz, S.C. Soares, J.G. Augusto, L.A. Anjos, L.G. Magalhães & R.S. Laurentiz. 2016.** Ovicidal and larvicidal activity of extracts of *Opuntia ficus-indica* against gastrointestinal nematodes of naturally infected sheep. Rev. Vet. Parasitol. 226: 65-68.

**Feboli, A. 2015.** Estudos fitoquímicos e a avaliação do potencial anti-helmintico da *Opuntia ficus indica*. Tese de Doutorado, UNESP, Ilha solteira, 421p.

**Fonseca, J., I.F.S. Couto, R.M. Silva, C.A.G. Fioratti, F. F., Pereira, M. Mauad & R.M. Mussury. 2018.** Efeito de extratos metanólicos de *Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville na alimentação e reprodução de *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae). Interciencia 43: 182-187.

**Isman, M.B. 2006.** Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. Annu. Rev. Entomol. 51: 45-46.

**Isman, M.B & M.L. Grieneisen. 2014.** Botanical insecticide research: many publications, limited useful data. Trends Pl. Sci. 19:140-145.

**Kodjo, T.A., M. Gbenonchi, A. Sadate, A. Komi, G. Yaovi, M. Dieudonne & S. Komla. 2011.** Bio-insecticidal effects of plant extracts and oil emulsions of *Ricinus communis* L.

- (Malpighiales: Euphorbiaceae) on the diamondback, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) under laboratory and semi-field conditions. J. Appl. Biosci. 43: 2899–2914.
- Kogan, M & R.D. Goeden. 1970.** The host-plant range of *Lema trilineata daturaphila* (Coleoptera: Chrysomelidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 63:1175-1180.
- Koul, O., S.Walia & G.S.Dhaliwal. 2008.** Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints. Biopestic Inter. 4: 63–84.
- Lima Neto, J.E., M.H. Amaral, H.A. Siqueira, R. Barros & P.A. Silva. 2016.** Resistance monitoring of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) to risk-reduced insecticides and cross resistance to spinetoram. Phytoparasitica 44: 631-640.
- Lima Neto, J.E. & Siqueira, H.A.A.D. 2017.** Selection of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) to Chlorfenapyr Resistance: Heritability and the number of genes involved. Rev. Caatinga 30: 1067-1072.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr & R.J. Randall. 1951.** Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265–275.
- Marangoni, C., F.N. Moura & F.R.M. Garcia. 2012.** Utilização de óleos essenciais e extratos de plantas no controle de insetos. Quím. Nova 36: 1391-1394.
- Napoleão, T.H., E.V. Pontual, T.A. Lima, N.D.L. Santos, R.A. Sá, L.C.B.B. Coelho, D.M.A.F Navarro & P.M.G. Paiva. 2012.** Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. Parasitol. Res. 110: 609-616.
- Oliveira, C.F.R., de M.C. Moura, T.H. Napoleão, P.M.G. Paiva, L.C.B.B Coelho & M.L.R. Macedo. 2017.** A chitin-binding lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) impairs the digestive physiology of the Mediterranean flour larvae, *Anagasta kuehniella*. Pestic. Biochem. Physiol. 142: 67-76.
- Pereira, F. F., R. Barros, D.Pratissoli, C.L.T. Pereira, U.R. Vianna & J.C. Zanuncio. 2007.** Capacidade de parasitismo de *Trichogramma exiguum* Pinto & Platner, 1978 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em ovos de *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) em diferentes temperaturas. Ciênc. Rural 37: 297-303.
- Pereira, J.R & G.C. Cardoso. 2012.** Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidants. J. Biotech. 3: 146-152.
- Procópio, T.F., K.M. Fernandes, E.V. Pontual, R.M. Ximenes, R.C. Oliveira, S.C. de Santana & T.H. Napoleão. 2015.** *Schinus terebinthifolius* Leaf Extract Causes Midgut Damage, Interfering with Survival and Development of *Aedes aegypti* Larvae. PLoS ONE 10: (e0126612)

- Ribeiro, L.M.S., V. Wanderley-Teixeira, H.N. Ferreira, Á.A.C. Teixeira & H.A.A. Siqueira. 2013.** Fitness costs associated with field-evolved resistance to chlorantraniliprole in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Bull. Entomol. Res.* 104: 88-96.
- Shelton, A.M. & B.A. Nault. 2004.** Dead-end trap cropping: a technique to improve management of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Crop Prot.* 23: 497-503.
- Sparks, T.C & Nauen, R. 2015.** IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pestic. Biochem. Physiol.* 121: 122-128.
- Souza, F. L., A.R.L. Hoffmann, A. Massaroli, L.M. Turchen & M.J.B. Pereira. 2016.** Efeito ovicida e deterrência de oviposição provocados por extratos de *Annona mucosa* sobre traças-crucíferas. *Cad. Agroecol.* 10: 3
- Souza, C.S., T.F. Procópio, B.R. Belmonte, P.M.G. Paiva, L.P. Albuquerque, E.V. Pontual & T.H. Napoleão. 2018.** Effects of *Opuntia ficus-indica* lectin on feeding, survival, and gut enzymes of maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Appl. Biol. Chem.* 61: 337–343.
- Tabashnik, B.E., N.L. Cushing, N. Finson & M.W. Johnson. 1990.** Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 83: 1671-1676.
- Talekar N.S & A.M. Shelton. 1993.** Biology, ecology, and management of the diamondback moth. *Annu. Rev. Entomol.* 38: 275-301.
- Torres, A., A.L.B. Júnior, C.A.M. Medeiros & R. Barros. 2006.** Efeito de extratos aquosos de *Azadirachta indica*, *Melia azedarach* e *Aspidosperma pyrifolium* no desenvolvimento e oviposição de *Plutella xylostella*. *Bragantia* 65: 447-457.
- Wang, X. & Y. Wu. 2012.** High Levels of resistance to chlorantraniliprole evolved in Field populations of *Plutella xylostella*. *J. Econ. Entomol.* 105: 1019-1023.
- Whalon, M.E., D. Mota-Sanchez & R.M. Hollingworth. 2008.** Analysis of global pesticide resistance in arthropods, p. 5-31. In M.E. Whalon, D. Mota-Sanchez & R.M. Hollingworth (eds.), *Global pesticide resistance in arthropods*. Cambridge, CAB International, 208p.

Tabela 1. Sistemas de desenvolvimento e reveladores utilizados para análise de metabólitos secundários no extrato de cladódios de *Opuntia ficus-indica* por cromatografia em camada delgada.

Classe de metabólito	Ausência ou presença	Sistema <sup>1</sup>	Revelador	Padrão
Polifenóis (Taninos Hidrolisáveis)	Ausente	90:5:5	NEU + PEG	Ácido gálico
Taninos condensados	Ausente	90:5:5	Vanilina clorídrica	Catequina
Flavonoides	Presente	90:5:5	NEU + PEG	Quercetina e Rutina
Derivados Cinâmicos	Presente	90:5:5	NEU + PEG	Ácido Cafeico e Clorogênico
Terpenos e Esteroides	Presente	70:30	Lieberman-Burchard + $\Delta$	$\beta$ -Sitosterol
Cumarinas	Ausente	50:50:50	KOH + $\Delta$	Cumarina
Saponinas	Ausente	100:11:11:26	Lieberman-Burchard + $\Delta$ Timol +	Escina
Açúcares redutores	Presente	50:20:10:10	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10% + $\Delta$	D-frutose
Alcaloides	Ausente	50:6,75:5	Dragendorf	Nitrato de pilocarpine
Antraquinonas	Ausente	50:6,75:5	HNO <sub>3</sub> + KOH10%	Senosídeo A

<sup>1</sup>Sistema: 90:5:5 – Acetato de etila: ácido fórmico: água; 70:30 – Tolueno: acetato; 50:50:50 – Éter etílico: acetato de etila: ácido acético 10% (saturação); 100:11:11:26 - Acetato de etila: ácido acético: ácido fórmico: água; 50:20:10:10 - Acetato de etila: ácido acético: ácido fórmico: água; 50:6,75:5 - Acetato de etila: metanol: água.

Tabela 2. Efeito do extrato de cladódios de *Opuntia ficus-indica* na biologia (sobrevivência, desenvolvimento e fertilidade) de *P. xylostella*.

Tratamentos	Viabilidade de larvas <sup>1</sup> (%) <sup>2</sup>	N <sup>3</sup>	Viabilidade de pupas <sup>1</sup> (%) <sup>4</sup>	N <sup>5</sup>	Número de ovos <sup>1</sup> depositados <sup>6</sup>	N <sup>7</sup>
Controle	80,0 ± 2,58 a	100	96,0 ± 2,61 a	80	73,1 ± 8,60 a	10
Não dialisado						
7,2%	53,0 ± 3,00 b	100	90,4 ± 3,62 a	53	61,7 ± 9,44 a	10
3,6%	70,0 ± 3,65 a	100	95,7 ± 3,05 a	70	72,2 ± 7,13 a	10
Dialisado						
7,2%	78,0 ± 2,90 a	100	93,9 ± 2,00 a	78	60,7 ± 6,72 a	10
NaCl 0,15 M	74,0 ± 3,71 a	100	94,2 ± 2,55 a	74	67,3 ± 6,40 a	10

<sup>1</sup>Médias (± DP) seguidas de letras diferentes, na coluna, representam diferenças significativas entre os tratamentos, determinadas pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). Temp.:  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , UR  $70 \pm 10\%$  e 12h de fotofase. A concentração percentual do extrato reflete a massa de extrato em gramas presente a cada 100 mL de solução. <sup>2</sup>Porcentagem de larvas que alcançaram a fase de pupa. <sup>3</sup>Quantidade inicial de larvas. <sup>4</sup>Porcentagem de pupas que alcançaram a fase adulta. <sup>5</sup>Quantidade de pupas oriundas das larvas tratadas. <sup>6</sup>fertilidade dos adultos provenientes das larvas submetidas aos tratamentos. <sup>7</sup>Quantidade de casais formados a partir dos adultos provenientes das larvas tratadas. Solução controle: água destilada.

Tabela 3. Área foliar média consumida e preferência alimentar de larvas de *Plutella xylostella* no terceiro ínstar com chance de escolha entre discos de folhas de couve tratados com o extrato de *Opuntia ficus-indica* dialisado ou não e soluções controle (água destilada e NaCl 0,15 M, respectivamente).

Grupos	Área foliar consumida $\pm$ EP <sup>1</sup>		IP $\pm$ EP <sup>2</sup>	Classificação <sup>3</sup>
	Controle	Tratado		
Extrato de cladódios dialisado	4,2 $\pm$ 1,39 A	2,2 $\pm$ 0,29 B	0,67 $\pm$ 0,06	Fagodeterrente
Extrato de cladódios	4,5 $\pm$ 1,76 A	2,2 $\pm$ 0,33 B	0,64 $\pm$ 0,05	Fagodeterrente

<sup>1</sup>Média de área foliar consumida em cm<sup>2</sup>. <sup>2</sup>Índice de Preferência. <sup>3</sup>Classificação: IP=1 indica efeito neutro; IP>1 indica efeito fagoestimulante; IP<1 indica efeito fagodeterrente. <sup>5</sup> Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey. Os resultados foram obtidos 24 horas após as larvas terem sido liberadas nas placas contendo os discos de couve tratados. O extrato de cladódios foi investigado na concentração de 7,2% (m/ v).

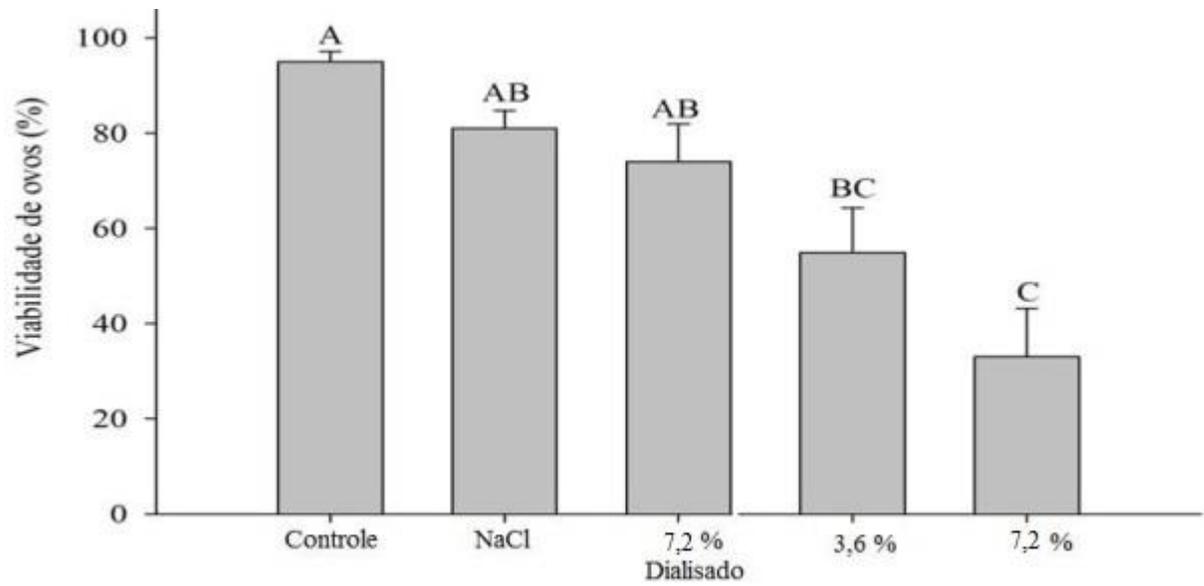


Figura 1. Efeito embriocida do extrato de cladódios de *Opuntia ficus-indica* contra *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). Temp.:  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , UR  $70 \pm 10\%$  e 12h de fotofase. Letras diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos, determinadas pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

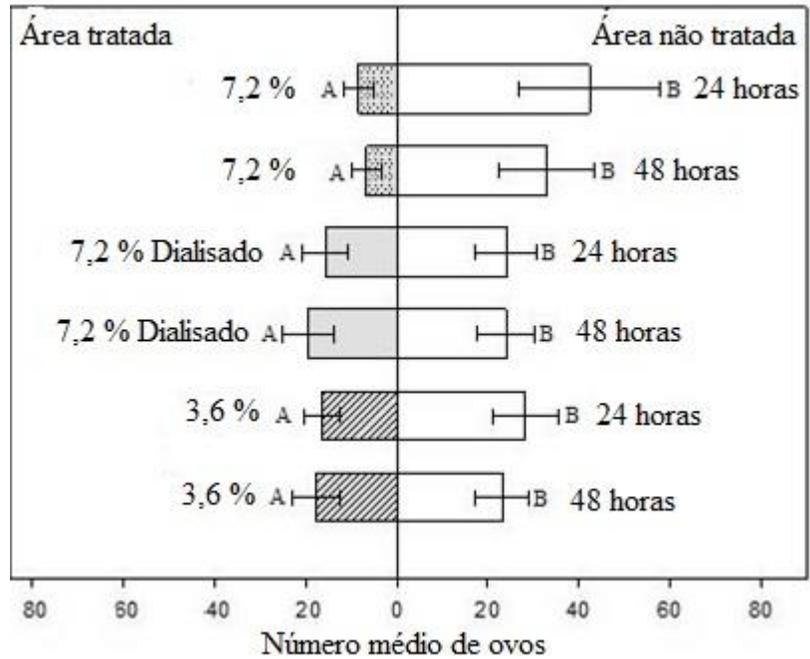


Figura 2. Preferência para oviposição de *Plutella xylostella* em folhas de couve tratadas com extratos de cladódios de *Opuntia ficus-indica*. Comparação de área tratada e não tratada. Temp.  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , UR  $70 \pm 10\%$  e 12h de fotofase. Houve diferença significativa pelo teste de Qui-Quadrado ( $P \leq 0,05$ ).

### CAPÍTULO 3

EXTRATOS DE CLADÓDIOS DE *Opuntia fícus-indica* (L.) MILL INTERFEREM NA ATIVIDADE DE ENZIMAS DIGESTIVAS E ALTERAM A ESTRUTURA E HISTOQUÍMICA DO INTESTINO MÉDIO DE LARVAS DE *Plutella xylostella* (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE)<sup>1</sup>

ELAINE C.B. FERREIRA<sup>2</sup>

<sup>2</sup>Departamento de Agronomia, Área de Fitossanidade, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, 52171-900, Brasil.

---

<sup>1</sup>Ferreira, E.C.B. Extratos de cladódios de *Opuntia fícus-indica* (L.) Mill interferem na atividade de enzimas digestivas e alteram a estrutura e histoquímica do intestino médio de larvas de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). A ser submetido.

RESUMO - O principal método de controle da traça das crucíferas *Plutella xylostella* tem sido a utilização de agentes químicos sintéticos o que tem despertado o interesse científico por inseticidas de origem botânica, incluindo as lectinas, que possuem ação tóxica para muitos organismos, inclusive insetos. O objetivo desse trabalho foi analisar a atividade do extrato e da lectina isolada (OfiL) de cladódios de *Opuntia ficus-indica* (palma forrageira) sobre enzimas digestivas como protease, tripsina e amilase (extrato e lectina), viabilidade de larvas e pupas (lectina), análise histológica e histoquímica do intestino médio de larvas (extrato). Para o isolamento da lectina, o extrato foi submetido à coluna de quitina. A OfiL não foi capaz de interferir na viabilidade de larvas e de pupas, contudo, nos ensaios envolvendo a atividade de enzimas digestivas, tanto o extrato e a lectina causaram inibição da atividade de protease no intestino das larvas. Em relação à análise histológica e histoquímica, foi observado que a ingestão do extrato de cladódios pelas larvas de terceiro ínstar, causou alterações no intestino médio, incluindo o desaparecimento da membrana peritrófica, células caliciformes aumentadas, desorganização do epitélio, indução da produção de esferites no citoplasma das células colunares e expressão aumentada de carboidratos neutros e proteínas. Em conclusão, a toxicidade do extrato de cladódios para larvas de *P. xylostella* pode envolver danos à digestão de proteínas e alterações na morfologia e fisiologia do intestino médio. Investigações futuras utilizando maiores concentrações de OfiL são necessárias para indicar se essa lectina constitui um princípio ativo do extrato.

PALAVRAS-CHAVE: Inseticida natural, traça-das-brássicas, proteases, organização estrutural, palma forrageira

EFFECTS OF CLADODIUM EXTRACTS OF *Opuntia ficus-indica* (L.) MILL ON THE  
ACTIVITY OF DIGESTIVE ENZYMES, STRUCTURE AND HISTOCHEMISTRY IN THE  
MIDGUT *Plutella xylostella* (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE)

ABSTRACT –The major control method the diamondback moth *Plutella xylostella* has been the use of synthetic insecticides what has promoted the interest for alternative materials such as botanical insecticides, including lectins that have a toxic action against insects. This study analyzed the activity of extract and lectin isolated from *Opuntia ficus-indica* (prickly pear cactus) cladodes on digestive enzymes such as protease, trypsin and amylase (extract and lectin), viability of larvae and pupae (lectin), histological and histochemical analysis of the midgut of larvae (extract). For the isolation of the lectin, the extract was subjected to the chitin column. OfiL was not able to interfere in the viability of larvae and pupae. However, in the tests involving the activity of digestive enzymes, both the extract and the lectin caused inhibition of the protease activity in the intestine of the larvae. In relation to the histological and histochemical analysis, it was observed that the ingestion of the cladodium extract by third instar larvae caused changes in the midgut, including disappearance of the peritrophic membrane, increased goblet cells, epithelial disorganization, spherical cytoplasm of columnar cells and increased expression of neutral carbohydrates and proteins. In conclusion, the toxicity of the cladodium extract to *P. xylostella* larvae may involve damage to protein digestion and changes in midgut morphology and physiology. Further investigations using higher concentrations of OfiL are required to indicate whether this lectin is an active ingredient in the extract.

KEYWORDS: Natural insecticide, brassica moth, proteases, structural organization, prickly pear cactus

## Introdução

*Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) é a principal praga na cultura das brássicas (Furlong *et al.* 2013) e os danos ocasionados por essa espécie levam a uma perda anual global avaliada em US \$ 2,7 bilhões (Zalucki *et al.* 2012). O principal método de controle desta praga tem sido a utilização de agentes químicos sintéticos (De Bortoli *et al.* 2013) acarretando em um custo estimado entre US \$ 1,3 bilhão e US \$ 2,3 bilhões anuais (Zalucki *et al.* 2012). De acordo com IRAC-BR (2016) o uso elevado de inseticidas sintéticos acarretou na seleção de populações de *P. xylostella* resistentes a mais de 80 princípios ativos. Este cenário tem estimulado o interesse científico por inseticidas naturais, em especial aqueles extraídos de plantas (Reddy *et al.* 2015, Deletre *et al.* 2016).

As plantas sintetizam uma vasta diversidade de metabólitos, que estão ligados a mecanismos de defesa. Estas substâncias podem apresentar potencial inseticida, e tem se tornado uma alternativa para o controle de pragas. Esses metabólitos dividem-se em três grupos: terpenos (monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanóides), compostos fenólicos (ácidos fenólicos, quinonas, fenilpropanoides, cumarinas, flavonoides, taninos, lignina) e compostos nitrogenados (alcaloides, betalaínas, glicosídeos cianogênicos e glucosinolatos) (Viegas Junior, 2003, War *et al.* 2012, Marangoni *et al.* 2013). Estes são produzidos constitutivamente ou em resposta ao dano na planta e podem afetar a alimentação, crescimento, comportamento e sobrevivência dos insetos (War *et al.* 2012). Essas substâncias também podem alterar a função imune e causam danos histológicos e histoquímicos ao sistema digestivo e reprodutivo destes organismos (Guedes, 2015, Procópio *et al.* 2015, Cruz *et al.* 2017). Esses compostos podem ser empregados na forma de pó, óleo e extrato (Corrêa & Salgado 2011).

Os mecanismos de defesa química das plantas também inclui a produção de proteínas (Qin, 2010, Mithöfer & Boland 2012), incluindo as lectinas, que possuem habilidade de se ligar a mono

ou oligossacarídeos e glicoconjugados, sendo extraídas de várias partes da planta como: cerne, cladódios, raízes, rizoma, folhas, flores, sementes e néctar (Napoleão *et al.* 2011, Paiva *et al.* 2011, Souza *et al.* 2011, Santana *et al.* 2012, Procópio *et al.* 2015, Pontual *et al.* 2012, Oliveira *et al.* 2017, Van Damme *et al.* 1998). Vastos são os relatos da atividade das lectinas, as quais podem ser tóxicas para fungos, bactérias, células tumorais ou insetos de diversas ordens, incluindo Coleoptera, Lepidoptera, Diptera, Hemiptera e Isoptera (Blattodea) (Santana *et al.* 2009, Lam & NG 2011, Procópio *et al.* 2017).

As lectinas inseticidas podem se ligar à superfície das células epiteliais do sistema digestivo e à membrana peritrófica (Sauvion *et al.* 2004), ou ainda interagir com enzimas digestivas, inibindo ou estimulando sua atividade e promovendo desequilíbrio metabólico e prejudicando a biologia do inseto (Napoleão *et al.* 2012, Lima *et al.* 2017). A presença de uma lectina (OfiL) em cladódios de *Opuntia ficus-indica*, tóxica para cupins da espécie *Nasutitermes corniger* (Motsch) (Blattodea: Termitidae) foi previamente reportada (Paiva *et al.* 2011).

A dificuldade de controlar populações de *P. xylostella*, os danos econômicos causados por essa praga no cenário mundial e os relatos prévios do efeito inseticida para preparações de cladódios de *O. ficus-indica* estimularam as investigações descritas aqui. Este trabalho foi norteado pela hipótese de que OfiL pode ser princípio ativo da toxicidade para *P. xylostella* previamente detectada para o extrato de cladódios de *O. ficus-indica* (dados não publicados). Nesse sentido, este manuscrito descreve o efeito de OfiL sobre a viabilidade de largatas e de pupas de *P. xylostella* e fornece *insights* sobre os mecanismos de ação inseticida do extrato de cladódios através da investigação do seu efeito sobre as atividades de enzimas digestivas e a histologia e histoquímica do intestino médio das larvas.

## Material e métodos

**Criação de *Plutella xylostella*.** Os espécimes utilizados neste estudo foram provenientes de uma população susceptível mantida no Laboratório de Biologia de Insetos e Resistência de Plantas do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), sendo estas mantidas de acordo com métodos descritos por Barros e Vendramim (1999).

**Obtenção do Extrato de Cladódios de *Opuntia ficus-indica*.** Cladódios de *O. ficus-indica* foram coletados no Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA, Recife, Pernambuco), secos ao ar (25° C) e triturados. A farinha obtida (10 g) foi homogeneizada por 16 h em NaCl 0,15 M (50 ml). Após filtração e centrifugação (4.000 g. 15 min), o sobrenadante correspondeu ao extrato bruto que foi avaliado quanto à concentração de proteínas (Lowry *et al.* 1951) utilizando como padrão uma curva de albumina sérica bovina (0 a 500 µg/ml).

**Isolamento da Lectina de *O. ficus-indica* (OfiL).** OfiL foi isolada de acordo com o protocolo descrito por Santana *et al.* (2009). O extrato bruto (2 ml) foi aplicado em coluna de quitina (6,5 x 1,5 cm). Equilibrada com solução de NaCl a 0,15 M. A lectina foi eluída com ácido acético a 1,0 M. Em seguida, o pool de frações recuperadas contendo atividade hemaglutinante (OfiL) foi dialisado usando membrana seletiva para 3,5 kDa contra água destilada (5 h, 4° C), seguida por NaCl 0,15 M (1 h, 4° C) para completa eliminação do eluente.

**Efeito da Lectina de *Opuntia ficus-indica* na Viabilidade de Larvas e Pupas de *Plutella xylostella*.** Folhas frescas de couve manteiga (*Brassica oleracea*) (variedade acephala) foram cortadas em discos de 6 cm de diâmetro. Posteriormente, estes discos foram imersos por 30 segundos em 5 mL de solução contendo OfiL (0,5 mg/mL e 1,0 mg/mL) ou na solução controle (NaCl a 0,15 M). Após os discos serem tratados, os mesmos foram secos em temperatura ambiente durante 40 min. colocados em placas de petri (9 cm) e oferecidos às larvas recém-eclodidas (<15h) de *P. xylostella*. Para cada tratamento foram utilizadas 100 larvas distribuídas

em 10 repetições. O experimento foi conduzido a  $27 \pm 1$  ° C;  $70 \pm 10$  % de umidade relativa e fotoperíodo de 12 h. Após as primeiras 24 h, os discos de folhas de couve foram substituídos por discos não tratados, os quais foram trocados a cada 24 h devido à voracidade das larvas. O número total de larvas mortas foi registrado diariamente e aquelas que alcançaram a fase de pupa foram individualizadas em placas de microtitulação (96 poços) para acompanhar a emergência de adultos. Os resultados foram expressos como viabilidade de larvas (percentual de larvas que alcançaram a fase de pupa) e viabilidade dessas pupas (percentual de pupas que emergiram como adultos).

**Investigação do Efeito do Extrato de Cladódios e de OfiL Sobre a Atividade de Enzimas Digestivas de Larvas de *Plutella xylostella*.** Para cada teste enzimático foram utilizadas 120 larvas de *P. xylostella* no terceiro instar. Cada lagarta foi imobilizada por hipotermia (0° C) e decapitada usando uma agulha (8 mm de comprimento, 0,3 mm de calibre). Os intestinos foram dissecados puxando-se o último segmento abdominal e macerados em homogeneizador de tecidos, em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 contendo NaCl 0,15 M para determinação da atividade proteolítica total e de tripsina, ou em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,5 contendo NaCl 0,15 M, para os ensaios de atividade de  $\alpha$ -amilase. Em seguida, as misturas foram centrifugadas a 13000 rpm por 10 min e o sobrenadante coletado correspondeu ao extrato de intestino. Os testes foram realizados em triplicata.

**Atividade Proteolítica.** Para avaliação da atividade proteolítica foi usada azocaseína como substrato conforme Azeez *et al.* (2007). O extrato do intestino das larvas em tampão Tris-HCl 50 $\mu$ L (100 $\mu$ g) foi incubado com 50  $\mu$ L do extrato de cladódios (75-135-185 $\mu$ g), de OfiL (120-240-480  $\mu$ g) ou da solução controle (NaCl 0,15 M). Em seguida, foi adicionado 300  $\mu$ L de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,5, 50  $\mu$ L de azocaseína a 0,6% (p/v) e 100  $\mu$ L de solução de Triton X-100 1% (v/v). As amostras foram incubadas a 37°C na estufa por 3 horas e em seguida

foi adicionado 200 µL de solução de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (p/v). O branco foi realizado nas mesmas condições do teste, no entanto a adição de 200 µL de TCA foi realizada antes da adição do substrato. Após 30 minutos na geladeira as amostras foram centrifugadas (13000 rpm por 10 min) e a absorbância a 366 nm foi determinada em espectrofotômetro.

**Atividade de Tripsina.** O extrato do intestino das larvas em tampão Tris-HCl (30 µL, 63 µg) foi incubado por 15 min com 30 µL do extrato de cladódios (45-80-110 µg), OfiL (80-160-320 µg) ou solução controle (NaCl 0,15 M). Em seguida, foram adicionados 15 µL do substrato N- $\alpha$ -benzoil-DL-arginil- $\rho$ -nitroanilida (BAPNA) a 8 mM e o volume foi completado para 200 µL com tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0. Também foram preparados brancos das amostras, nos quais 15 µL do tampão Tris foram adicionados no lugar do substrato. Após 60 min, foi determinada a absorbância a 405 nm em leitor de microplacas. Uma unidade da atividade de tripsina foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 µmol de BAPNA por minuto.

**Atividade  $\alpha$ -amilase.** A investigação da atividade de  $\alpha$ -amilase foi conduzida de acordo com Bernfeld (1955). Uma alíquota (45 µg) do extrato de intestino das larvas em tampão acetato de sódio foi incubada com 50 µL de extrato de cladódios (90-180-360 µg), OfiL (120-240-480 µg) ou da solução controle (NaCl 0,15 M). Em seguida, acrescentou-se 400 µL de uma suspensão de amido a 1% (p/v) preparada em tampão acetato. O branco foi feito nas mesmas condições do teste, contudo, a suspensão de amido foi substituída por 400 µL de tampão acetato. As misturas foram incubadas a 50°C por 10 min. Em seguida, adicionou-se 500 µL de ácido dinitrosalicílico (DNS) e o ensaio foi aquecido a 100 °C por 10 min e imediatamente resfriado em gelo por 15 min. A absorbância a 540 nm foi determinada em leitor de microplacas, utilizando 200 µL de cada mistura. A curva padrão da glicose utilizada foi:  $Y = 0,0885x + 0,1452$ .

#### **Análise Histológica e Histoquímica do Intestino Médio das Larvas de *Plutella xylostella*.**

Larvas de *P. xylostella* no terceiro ínstar foram alimentadas com discos de couve manteiga

tratadas com o extrato de cladódios a 3,6 e 7,2% (m/v) ou com solução controle (NaCl 0,15 M). Após 24 ou 48 h de tratamento, as larvas (90, sendo 15 para cada tratamento, após 24 e 48 h) tiveram seus intestinos dissecados conforme descrito acima. Em seguida, os intestinos foram fixados em formol tamponado 10% por 24 h e posteriormente conservados em álcool 70%. O intestino médio foi clivado, desidratado em banhos crescentes de álcool etílico (70 - 100%) por 10 min cada, embebido em álcool+historesina (1:1) por 24 h, e posteriormente incluído em historesina Leica© pura por mais 24 h. Cortes com 5µm de espessura foram obtidos em micrótomo semiautomático Leica© RM 2035. Os cortes foram submetidos às técnicas de coloração pelo Azul de Toluidina para análise morfológica do tecido. Para análises histoquímicas foi utilizado Ácido Periódico de Schiff (P.A.S.) para detecção de polissacarídeos neutros, e Xylidine Ponceau para proteínas totais. A análise histológica e histoquímica foram realizadas utilizando-se um microscópio de luz da marca OLYMPUS BX-49, e fotografado em fotomicroscópio Leica© DM500 e OLYMPUS BX 51.

**Quantificação Média de Polissacarídeos Neutros e Proteínas Totais.** As imagens capturadas foram submetidas ao programa editor de imagens GIMP® 2.8 (GNU Image Manipulation Program, UNIX platforms) que converte imagens digitais para uma escala de cinza (preto e branco). Essa segmentação das cores permite a mensuração dos valores de pixels referentes à marcação selecionada no tecido (Solomon 2009). Os resultados dos teores de proteína e glicogênio foram submetidos a teste de normalidade e homogeneidade. Para cada tratamento utilizou-se 3 lâminas de indivíduos diferentes, sendo mensurados 4 campos de cada lâmina, totalizando 12 campos por grupo. A análise estatística foi realizada utilizando o programa SAS (SAS Institute 2002). Os dados assumiram normalidade, sendo, portanto, utilizado testes paramétricos. Para comparar três grupos foi usado o teste ANOVA one way, com post hoc de

Tukey e, quando se comparou apenas dois grupos foi utilizado o teste t, apresentando diferença significativa quando  $p < 0,05$ .

**Análise Estatística.** Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e posteriormente as médias dos tratamentos foram comparadas através do teste de Tukey ( $P < 0,5$ ).

## Resultados e Discussão

**Efeito de OfiL na Viabilidade de Larvas e Pupas de *Plutella xylostella*.** Não houve diferença significativa ( $F_{1,51} = 2,27$ ;  $P = 0,239$ ) entre a viabilidade das larvas tratadas com OfiL (0,5 mg/mL) ou 1,0 mg/mL) e aquela registrada para o grupo controle (Figura 1). A viabilidade das pupas (Figura 1) também não foi significativamente ( $F_{2,27} = 1,80$ ;  $P = 0,1846$ ) afetada pelo tratamento com OfiL. Entretanto, novamente a menor viabilidade de pupas foi detectada para o tratamento com OfiL a 1,0 mg/mL (84,00%), seguido do tratamento com OfiL a 0,5 mg/mL (91,00%) e do grupo controle (93,00%).

De acordo com Napoleão *et al.* (2012), as lectinas, além de afetar a sobrevivência dos insetos, podem acarretar em efeito subletais incluindo a perda de peso, atraso no desenvolvimento, infertilidade ou alteração nos parâmetros nutricionais. A ingestão da lectina de sementes *Moringa oleífera*, por exemplo, não alterou o desenvolvimento das larvas da traça da farinha *Ephestia (Anagasta) kuehniella*, mas causou redução no peso corporal em 50%, provavelmente devido à inibição da atividade de enzimas digestivas como  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glucosidases e tripsina (Oliveira *et al.* 2017). Em um estudo realizado por Oliveira *et al.* (2015), foram investigados os efeitos da lectina de *Dioclea violacea* (Fabaceae) sobre larvas de *Ephestia kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) sendo relatados o retardo no desenvolvimento, a diminuição da atividade de enzimas digestivas, e a ligação de lectina à membrana peritrófica das larvas.

**Efeito do Extrato de Cladódios e de OfiL Sobre a Atividade de Enzimas Digestivas de Larvas de *Plutella xylostella*.** O extrato de intestino das larvas de *P. xylostella* foi capaz de causar hidrólise da azocaseína, revelando atividade proteolítica total de 110 U/mg. Essa atividade foi significativamente reduzida quando em presença de OfiL e do extrato de cladódios (Figura 2).

Os extratos de intestino também foram capazes de catalisar a hidrólise do substrato BApNA, indicando a presença de atividade tripsina-símile (8,5 U/mg). A tripsina está presente de forma ubíqua no grupo dos insetos (Terra & Ferreira 1991), o que corrobora com a sua presença no intestino de *P. xylostella*. OfiL não foi capaz de afetar a atividade de tripsina nos extratos de intestino das larvas, contudo, quando em presença do extrato de cladódios (110 µg), uma inibição significativa ( $F_{6,14}$ ;  $P < 0.0099$ ) foi detectada (Figura 3). Atividade de  $\alpha$ -amilase (1,5 U/mg) também foi detectada no extrato de intestino, contudo esta não foi significativamente ( $F_{6,14}$ ;  $P < 0.4725$ ) afetada em presença de OfiL ou do extrato de cladódios (Figura 4).

A inibição de proteases, incluindo a tripsina é um resultado interessante, uma vez que no grupo dos Lepidoptera, essa classe de enzimas é responsável por grande parte dos processos digestivos e que é na fase de lagarta que o inseto mais se alimenta (Macedo *et al.* 2002, Macedo *et al.* 2011). Nesse sentido, a inibição de proteases intestinais pode reduzir a disponibilidade e a absorção de nutrientes, podendo eventualmente levar à morte por inanição. De acordo com McManus & Burgess (1995), o crescimento e o desenvolvimento de insetos podem ser retardados quando estes são submetidos a uma dieta que contenha inibidores específicos de proteases. Napoleão *et al.* (2013) reportaram que o extrato e a lectina das folhas *Myracrodruon urundeuva* (Allemão) (Anacardiaceae) foram capazes de causar desbalanço na atividade de enzimas digestivas de adultos de *Sitophilus zeamais* (Motsch.) (Coleoptera: Curculionidae).

**Análise Histológica e Histoquímica do Intestino Médio.** Os cortes histológicos do intestino médio de larvas de terceiro ínstar de *P. xylostella* revelam que o epitélio é do tipo simples apoiado em duas camadas de músculos, uma interna (disposta circularmente) e outra externa (disposta longitudinalmente) (Fig. 5A). Foram identificados três tipos de células: colunares, caliciformes e regenerativas. Nos dois períodos avaliados, 24 e 48 horas, o intestino médio das larvas do grupo controle apresentou um epitélio íntegro com presença de células colunares, com núcleos ovais e microvilosidades e células regenerativas na base do epitélio. A membrana peritrófica foi encontrada revestindo internamente o órgão, envolvendo o material digerido, o qual se mostra disposto no lúmen do órgão (Figs. 5A e 5B / 6 A e B).

O epitélio de larvas de *P. xylostella* quando tratadas com o extrato a 3,6 % no intervalo de 24 horas, mostrou-se alterado, com presença de esferites no citoplasma das células colunares e na região do lúmen, núcleo sendo expelido em direção ao lúmen e desaparecimento da membrana peritrófica (Figs. 5C e 5D). Em contrapartida, na concentração de 7,2 % do mesmo intervalo de tempo não houve quaisquer alterações histológicas na região, sendo identificadas apenas esferites no citoplasma das células colunares e na região do lúmen (Fig. 5F). No período de 48 horas, o epitélio das larvas expostas ao extrato a 3,6 % apresentou esferites no citoplasma das células colunares e aumento nas células caliciformes por todo o epitélio (Figs. 6C e 6D). Nos intestinos expostos ao extrato a 7,2 % foi observada a presença de células caliciformes aumentadas, esferites no citoplasma e no lúmen e desorganização do epitélio (Figs. 6E e 6F).

Nos insetos, o intestino é dividido em três regiões: o intestino anterior ou estomodeu, o intestino médio, ou mesêntero e o intestino posterior, ou proctodeu sendo o intestino médio principal sítio de digestão e absorção de nutrientes (Gullan & Cranston 2012). A morfologia do intestino médio de *P. xylostella* seguiu os padrões para a espécie como relatado por Ribeiro *et al.* (2013), onde evidenciaram-se as células colunares, caliciformes e regenerativas. Segundo

Pinheiro *et al.* (2010), no epitélio do intestino dos insetos há predominância de quatro tipos de células: células colunares, células caliciformes, células regenerativas e células endócrinas. No presente estudo, essas células predominaram ao longo do epitélio do intestino médio (mesêntero), com exceção das células endócrinas, mostrando aspectos morfológicos comuns em lepidópteros (Sousa *et al.* 2009, Ribeiro *et al.* 2013, Guedes, 2017). Essas células são consideradas responsáveis pela secreção de enzimas, absorção de água e alimento (colunares), transporte ativo de íons de potássio (caliciformes), renovação epitelial (regenerativas) e função endócrina (células endócrinas) (Chapman, 1998, Levy *et al.* 2004, Terra *et al.* 2006).

Os danos ao epitélio foram mais expressivos no tratamento com extrato a 3,6 % no período de 24 horas e este fato pode estar ligado ao efeito fagodeterrente previamente detectado (capítulo 2), uma vez que o inseto pode ter se alimentado menos das folhas tratadas com o extrato a 7,2 %, a qual apresenta maior concentração de metabólitos secundários (flavonoides, terpenos, esteroides e derivados cinâmicos). Porém, o aparecimento dos esferites ou esferocristais já no intervalo de 24 horas sugere uma resposta do inseto à presença de compostos tóxicos presentes no extrato. Os esferites estão associados à detoxificação celular, processo de transporte rápido de fluidos, excreção de íons, excreção de metais pesados, materiais orgânicos e inorgânicos (Cruz-Landim 2000, Pinheiro *et al.* 2008). Foram observados esferites nos intestinos tratados com os extratos nas duas concentrações e nos dois períodos avaliados.

O aumento mais acentuado das células caliciformes no intervalo de 48 horas de exposição ao extrato a 7,2 % pode estar ligado a esse maior período de exposição, que pode ter acarretado na ingestão das folhas tratadas devido à ausência de outra fonte de alimento durante muito tempo. Em um estudo realizado por Ribeiro *et al.* (2013), foi relatado que o inseticida a base de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) causou modificações na morfologia de células caliciformes do mesêntero em larvas de *P. xylostella*. Foi relatado por Cardoso *et al.* (2011) que óleo de nim causou alterações

em células caliciformes, colunares e regenerativas no mesêntero das larvas de *Dione junio junio* (Cramer) (Lepidoptera: Nymphalidae); os autores afirmam que a potencialidade deste inseticida botânico está ligada à riqueza de metabólitos secundários presentes na planta, principalmente terpenos e flavonoides. O geraniol e o citronelal são compostos terpenos com grande potencial inseticida, como mostram os trabalhos de Cruz *et al.* (2015) e Guedes (2007) e Silva *et al.* (2017), os quais relataram alterações histológicas no intestino médio de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae).

Procópio *et al.* (2015), avaliaram o efeito do extrato de *Schinus terebinthifolius* no intestino médio de *Aedes aegypti*, através de análises histológicas observou-se que o extrato (1,0%) interferiu na integridade da matriz peritrófica, desorganização do epitélio e ausência da borda em escova do intestino desses insetos. Segundo os autores, o efeito larvicida pode ser atribuído aos derivados do ácido cinâmico e flavonoides presentes no extrato. Em um trabalho realizado por Vishwanathreddy *et al.* (2014) foi relatado, através de análises histológica, histoquímica e imunohistoquímica, desorganização do epitélio e apoptose celular em larvas de *Spodoptera litura* (Fabricio) causadas pela lectina do fungo *Sclerotium rolfsii* Saac. A maior parte dos insetos possui uma estrutura no intestino médio, em forma de filme, chamada matrix peritrófica que é composta de quitina e proteínas (peritrofinas), dividindo o lúmen em dois compartimentos: o espaço endoperitrófico (local onde se encontra o alimento) e o espaço ectoperitrófico (espaço entre a membrana peritrófica e o epitélio do intestino médio) (Terra & Ferreira 2012).

A matriz peritrófica é importante para a fisiologia digestiva dos insetos, pois protege o epitélio do intestino médio da abrasão por partículas e alimentos ásperos, patógenos e toxinas (Tropak *et al.* 2016). A destruição da membrana peritrófica e alterações nas células do intestino médio revelam o potencial inseticida do extrato de *O.ficus-indica*. Costa *et al.* (2017), observaram que a membrana peritrófica do intestino médio de *Anthonomus grandis* Boh. (Coleoptera:

Curculionidae), também foi destruída quando exposto ao inseticida sintético lufenurom, sugerindo que o extrato de *O. ficus-indica* utilizado na presente pesquisa pode ser uma alternativa viável no controle de pragas.

Em relação ao estudo histoquímico, as células epiteliais do intestino médio das larvas de terceiro ínstar de *P. xylostella* apresentaram positividade ao ácido periódico de Schiff (P.A.S.), com maior intensidade nos grupos de 48 horas, detectando a presença de carboidratos neutros caracterizada pela presença de grânulos de glicogênio no citoplasma, dispostos aleatoriamente nas células (Figs. 7A-7D). Apesar disto, a quantificação em pixels revelou que a única mudança na quantidade de carboidratos neutros foi entre os tratamentos com 48 horas (Fig. 7E), no qual foi maior para o grupo tratado com extrato a 7,2 % quando comparado com o grupo controle. A histoquímica para proteínas totais também revelou marcação positiva ao corante Xylidine Ponceau para ambos os períodos avaliados (Figs. 8A-8D).

A quantificação média em pixels mostra que houve uma diminuição significativa do teor de proteínas no grupo tratado com extrato a 7,2 % no período de 24 horas e um aumento no período de 48 horas (Fig. 8E). Este dado é interessante, pois reforça a hipótese de que as larvas estariam rejeitando a ingestão do extrato de cladódios durante as primeiras 24 h, não sendo mais possível rejeitá-lo após 48 h de tratamento. Diante destes resultados sugerimos que o extrato de *O. ficus-indica* produziu alterações significativas nos perfis histoquímicos no intestino de *P. xylostella*, alterações que podem estar ligadas a algum processo fisiológico no qual o requerimento de carboidratos e proteínas necessitaram reduzir e elevar o nível, respectivamente.

De acordo com Guedes *et al.* (2006), para resistir à ação tóxica de um inseticida o aumento no metabolismo energético ocorre e o deslocamento de energia pode privar outros processos fisiológicos, prejudicando o desenvolvimento e/ou reprodução o inseto.

Os inseticidas botânicos podem causar alterações nos teores de lipídios, proteínas e carboidratos no organismo dos insetos, desencadeando desequilíbrios no metabolismo (Sharma *et al.* 2011). Segundo Souza *et al.* (2015), o sucesso reprodutivo dos insetos está relacionado aos nutrientes adquiridos na fase imatura, visto que os recursos nutricionais são adquiridos para garantir o crescimento e reprodução. Estudos relacionados a alterações a partir de diversos compostos botânicos têm sido realizados (Corrêa & Salgado, 2011, Hasheminia *et al.* 2011, Cruz *et al.* 2015, Silva *et al.* 2016). Um estudo realizado por Sharma *et al.* (2011) extratos de *Artemisia annua* (Linneu) (Asteraceae) e *Azadirachta indica* (Meliaceae) produziram alterações significativas nos teores de carboidratos, lipídeos e proteínas de larvas de *Anopheles stephensi* e *Culex quinquefasciatus*, os autores sugerem que essa elevação demonstra o estresse fisiológico induzido pelos constituintes dos extratos.

Em conclusão, a toxicidade do extrato de cladódios para larvas de *P. xylostella* pode ocasionar danos à digestão de proteínas e alterações na morfologia e fisiologia do intestino médio. Investigações futuras utilizando maiores concentrações de OfiL são necessárias para indicar se essa lectina constitui um princípio ativo do extrato.

### Literatura Citada

- Azeez, A., A.P. Sane, D. Bhatnagar & P. Nath. 2007.** Enhanced expression of serine proteases during floral senescence in *Gladiolus*. *Phytochemistry* 68: 1352-1357.
- Barros, R & J. D. Vendramim. 1999.** Efeito de cultivares de repolho, utilizadas para criação de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), no desenvolvimento de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *An. Soc. Entomol. Brasil* 28: 469 -476.
- Bernfeld, P. 1955.** Amylase alpha and beta. *Meth. Enzimol.* 1: 149-154.
- Chapman, R.F. 1998.** *The Insects: Structure and Function*. Cambridge, Cambridge University Press, 770p.

- Corrêa, J.C.R & H.R.N. Salgado. 2011.** Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. Rev. Bras. Pl. Med. 500-506.
- Cruz-Landim, C. 2000.** Localization of calcium and acid phosphatase in the Malpighian tubules of nurse workers of *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Bioscience J. 16: 87-99.
- Cruz, G. D. S., V. W. Teixeira, J. V. de Oliveira, A.A.C. Teixeira, A.C. Araújo, T.J.D.S Alves & M.O. Breda. 2015.** Alteraciones histológicas e histoquímicas provocadas por el aceite esencial de clavo de olor en las Gónadas de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Int. J. Morphol. 33: 1393-1400.
- Cruz, G.S., V. Wanderley-Teixeira, J.V. Oliveira, C.G. D'assunção, F.M. Cunha, A.A.C. Teixeira, C.A. Guedes, K.A. Dutra, D.R.S. Barbosa & M.O. Breda. 2017.** Effect of trans-anethole, limonene and your combination in nutritional componentes and their reflection on reproductive parameters and testicular apoptosis in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Chem. Biol. Interact. 263: 74-80.
- Bortoli, S.A., R.A. Polanczyk, A.M. Vacari, C.P. De Bortoli & R.T. Duarte. 2013.** *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae): Tactics for integrated pest management in Brassicaceae, p. 31-51. In S. Soloneski & M. Larramendy (eds.), Weed and Pest Control-Conventional and New Challenges. Rijeka, Croatia, InTech, 205p.
- Deletre, E., B. Schatz, D. Bourguet, F.Chandre, L.Williams, A. Ratnadass & T. Martin. 2016.** Prospects for repellent in pest control: current developments and future challenges. Chemoecology 26: 127-142.
- Furlong, M.J., D.J. Wright & L.M. Dossall. 2013.** Diamondback moth ecology and management: problems, progress, and prospects. Annu. Rev. Entomol. 58: 517-541.
- Guedes, C.A. 2017.** Efeitos de óleo essencial e compostos isolados sobre parâmetros histofisiológicos, histoquímicos, imunohistoquímico, nutricionais e embriológicos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Tese de Doutorado, UFRPE, Recife, 92p.
- Guedes, R.N.C., E. E. Oliveira, N.M.P. Guedes, B.Ribeiro & J. E Serrao. 2006.** Cost and mitigation of insecticide resistance in the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. Physiol. Entomol. 31: 30-38.
- Gullan, P.J & P.S. Cranston. 2012.** Os insetos: um resumo de entomologia. São Paulo, Roca, 494p.

- Hasheminia, S.M., J.J. Sendi, K.T. Jahromi & S.Moharramipour. 2011.** The effects of *Artemisia annua* L. and *Achillea millefolium* L. crude leaf extracts on the toxicity, development, feeding efficiency and chemical activities of small cabbage *Pieris rapae* L. (Lepidoptera: Pieridae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 99: 244-249.
- IRAC-BR. Comitê Brasileiro de Ação a resistência a inseticidas. 2016. Disponível em:** <<http://www.ira-br.org/#!/Traçadascrucíferas-consegue-detectar-a-presença-de-inseticidas-na-planta/csfb/56e9a0390cf2d686649c7abd>> acesso em 16 de Abril de 2017.
- Levy, S.M., M.F.A. Falleiros, F. Moscardi, E.A. Gregório & L.A. Toledo. 2004.** Morphological study of the hindgut in larvae of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotrop. Entomol.* 33: 427-431.
- Li, Y., M. Meissle & J. Romeis. 2010.** Use of maize pollen by adult *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) and fate of Cry proteins in Bt-transgenic varieties. *J. Insect Physiol.* 56: 157-163.
- Li, Y & J. Romeis. 2009.** Impact of snowdrop lectin (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA) on adults of the green lacewing, *Chrysoperla carnea*. *J. Insect Physiol.* 55: 136-143.
- Lima, T.A., K.M. Fernandes, A.P.S. Oliveira, L.P. Dornelles, G.F. Martins, T. H. Napoleão & P.M. Paiva. 2017.** Termiticidal lectins from *Myracrodruon urundeuva* (Anacardiaceae) cause midgut damage when ingested by *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae) workers. *Pest Manag. Sci.* 73: 991-998.
- Lowry, D.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr & R.J. Randal. 1951.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Macedo, M.L.R., M.G.M. Freire, J.C. Novello & S. Marangoni. 2002.** Talisia esculenta lectin and larval development of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Biochim. Biophys. Acta.* 1571: 83-88.
- Macedo, M.L.R., M D.G. M. Freire, O. L. Franco, L. Migliolo & C. F. R. de Oliveira. 2011.** Practical and theoretical characterization of *Inga laurina* Kunitz inhibitor on the control of *Homalinotus coriaceus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 158: 164-172.
- McManus, M.T. & E.P.J. Burgess. 1995.** Effects of the Soybean (Kunitz) Trypsin Inhibitor on the Growth and Digestive Proteases of Larvae of *Spodoptera litura*. *J. Ins. Physiol* 41: 731-738.
- Marangoni, C., N.F. Moura & F.R.M. Garcia. 2013.** Utilização de óleos essenciais e extratos de plantas no controle de insetos. *Rer. Ciên. Amb.* 6: 92-112.

- Mithofer, A. & W. Boland. 2012.** Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annual Annu, Rev, Pl, Biol.* 63: 431-450.
- Napoleão, T.H., E.V. Pontual, T.A. Lima, N.D.L. Santos, R.A. Sá, L.C.B.B. Coelho, D.M.A.F Navarro & P.M.G. Paiva. 2012.** Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. *Parasitol. Res.* 110: 609-616.
- Napoleão, T.H., B.R. Belmonte, E.V. Pontual, L.P.Albuquerque, R.A. Sá, L.M. Paiva, L.C.B.B. Coelho & P.M.G. Paiva. 2013.** Deleterious effects of *Myracrodruon urundeuva* leaf extract and lectin on the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae). *J. Stored Prod. Res.* 54: 26-33.
- Oliveira, C.T., D.Kunz, C.P. Silva & M.L.R. Macedo. 2015.** Entomotoxic properties of *Dioclea violacea* lectin and its effects on digestive enzymes of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera). *J. Insect Physiol.* 81: 81-89.
- Oliveira, C.F.R., de M.C. Moura, T.H. Napoleão, P.M.G. Paiva, L.C.B.B Coelho & M.L.R. Macedo. 2017.** A chitin-binding lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) impairs the digestive physiology of the Mediterranean flour larvae, *Anagasta kuehniella*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 142: 67-76.
- Paiva, P.M.G., G.M.S. Santana, I.F.A.C. Souza, L.P. Albuquerque, A.C. Agra-Neto, A.C. Albuquerque, L.A. Luz, T.H. Napoleão & L.C.B.B. Coelho. 2011.** Effect of lectins from *Opuntia ficus indica* cladodes and *Moringa oleifera* seeds on survival of *Nasutitermes corniger*. *Int. Biodeterior. Biodegr.* 65: 982-989.
- Pinheiro, D.O., H. Conte & E.A. Gregório. 2008.** Spherites in the midgut epithelial cells of the sugarcane borer parasitized by *Cotesia flavipes*. *Biocell* 32: 61-67.
- Pinheiro, D.O., M.D. Silva & E.A. Gregório. 2010.** Mitochondria in the midgut epithelial cells of sugarcane borer parasitized by *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891). *Braz. J. Biol.* 70: 163-169.
- Pontual, E.V., T.H. Napoleão, C.R.D. Assis, R.S. Bezerra, H.S. Xavier, D.M.D Navarro, L.C.B.B. Coelho & P.M.G. Paiva. 2012.** Effect of *Moringa oleifera* flower extract on larval trypsin and acethylcholinesterase activities in *Aedes aegypti*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 79: 135–152.
- Procópio, T.F., K.M. Fernandes, E.V. Pontual, R.M. Ximenes, R.C. Oliveira, S.C. de Santana & T.H. Napoleão. 2015.** *Schinus terebinthifolius* Leaf Extract Causes Midgut

Damage, Interfering with Survival and Development of *Aedes aegypti* Larvae. PLoS ONE 10: e0126612.

**Procópio, T.F., L.L S. Patriota, M.C. Moura, P.M Silva, A.P.S. Oliveira, L.V. N. Carvalho & M.G.R. Pitta. 2017.** CasuL: A new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. Int. J. Biol. Macromol. 98: 419-429.

**Qin, W. 2010.** Biological activity of the essential oil from the leaves of *Piper sarmentosum* Roxb. (Piperaceae) and its chemical constituents on *Brontispa longissima* (Gestro) (Coleoptera: Hispididae). Pestic. Biochem. Physiol. 96: 132-139.

**Reddy, S.G., S.K. Dolma. R.Koundal & B. Singh. 2015.** Chemical composition and insecticidal activities of essential oils against diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae). Nat. Prod. Res. 30: 1834-1838.

**Mcmanus, M.T & E.P.J. Burgess. 1995.** Effects of the Soybean (Kunitz) Trypsin Inhibitor on the Growth and Digestive Proteases of Larvae of *Spodoptera litura*. J. Insect Physiol.41: 731-738.

**Santana, G.M.S., L.P. Albuquerque, D.A. Simões, L.C.B.B. Coelho, P.M.G. Paiva & N.B. Gusmão. 2009.** Isolation of lectin from *Opuntia ficus-indica* cladodes. Acta Hortic. 811: 281-286.

**Santana, G.M.S., L.P. Albuquerque, T.H. Napoleão, S.R.Souza, L.C.B.B Coelho & P.M.G. Paiva. 2012.** Electrochemical potential of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin. Bioelectrochemistry 85: 56-60.

**Sauvion, N., C.Nardon, G. Febvay, A.M. Gatehouse & Y. Rahbé. 2004.** Binding of the insecticidal lectin Concanavalin A in pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris) and induced effects on the structure of midgut epithelial cells. J. Insect Physiol. 50: 1137-1150.

**Silva, C.T.S., V. Wanderley-Teixeira, F.M. Cunha, J.V. Oliveira, K.A. Dutra, D.M.A.F. Navarro & A.A.C. Teixeira. 2016.** Biochemical parameters of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) treated with citronella oil (*Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor) and its influence on reproduction. Acta Histochem. 118: 347-352.

**Solomon, R.W. 2009.** Free and open source software for manipulation of digital images. Am. J. Roentgenol.192: 330-334.

**Sousa, M.E.C., V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira, H.A.A. Siqueira, F.A.B. Santos & L.C. Alves. 2009.** Ultrastructure of the *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) midgut. Micron 40: 743-749.

- Souza, J.D., M.B.R Silva, A.C.C. Argolo, T.H. Napoleão, R.A. SÁ, M.T.S. Correia, P.M.G. Paiva, M.D.C. Silva & L.C.B.B. Coelho. 2011.** A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. *Int. Biodeterior. Biodegr.* 65: 696 -702.
- Souza, R.M., J.S. Rosa, L. Oliveira, A. Cunha & M. Fernandes-Ferreira. 2015.** Activities of Apiaceae essential oils and volatile compounds on hatchability, development, reproduction and nutrition of *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae). *Ind. Crop. Prod.* 63: 226–237
- Tagliari, M.S., N. Knaak & L.M. Fiuza. 2004.** Plantas inseticidas: interações e compostos. *Pesqu. Agropec. Gaúcha* 10: 101-111.
- Tellam, R.L & C. Eisemann. 2000.** Chitin is only a minor component of the peritrophic matrix from larvae of *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30: 1189-1201.
- Terra, W. R & C. Ferreira. 1991.** A digestão dos insetos. *Ciência Hoje.* 12: 28-38.
- Terra, W.R., R.H. Costa & C. Ferreira. 2006.** Plasmic membranes from insect midgut cells. *Ann. Braz. Acad. Sci.* 78: 255-269.
- Terra, W.R & Ferreira, C. 2012.** Biochemistry and molecular biology of digestion, p. 365-418. In L. I. Gilbert (ed.), *Insect Molecular Biology and Biochemistry*. San Diego: Academic Press, 574p.
- Toprak, U., M. Erlandson, D. Baldwin, S. Karcz, L.Wan & D.D. Hegedus. 2016.** Identification of the *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae) peritrophic matrix proteins and enzymes involved in peritrophic matrix chitin metabolism. *J. Insect Sci.* 23: 656-674.
- Viegas Júnior, C. 2003.** Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Quím. Nova* 26: 390-400.
- Vishwanathreddy, H., G.G. Bhat, S.R. Inamdar, R.K. Gudihal & B.M. Swamy. 2014.** *Sclerotium rolfsii* lectin exerts insecticidal activity on *Spodoptera litura* larvae by binding to membrane proteins of midgut epithelial cells and triggering caspase-3-dependent apoptosis. *Toxicon* 78: 47-57.

**War, A.R., M.G. Paulraj, T. Ahmad, A.A. Buhroo, B. Hussain, S. Ignacimuthu & H.C. Sharma. 2012.** Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Pl. Signal Behav.* 7: 1306-1320.

**Zalucki, M.P., A. Shabbir, R. Silva, D. Adamson, L. Shu-Sheng & M.J. Furlong. 2012.** Estimating the economic cost of one of the world's major insect pests, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae): just how long is a piece of string? *J. Econ. Entomol.* 105:1115-1129.

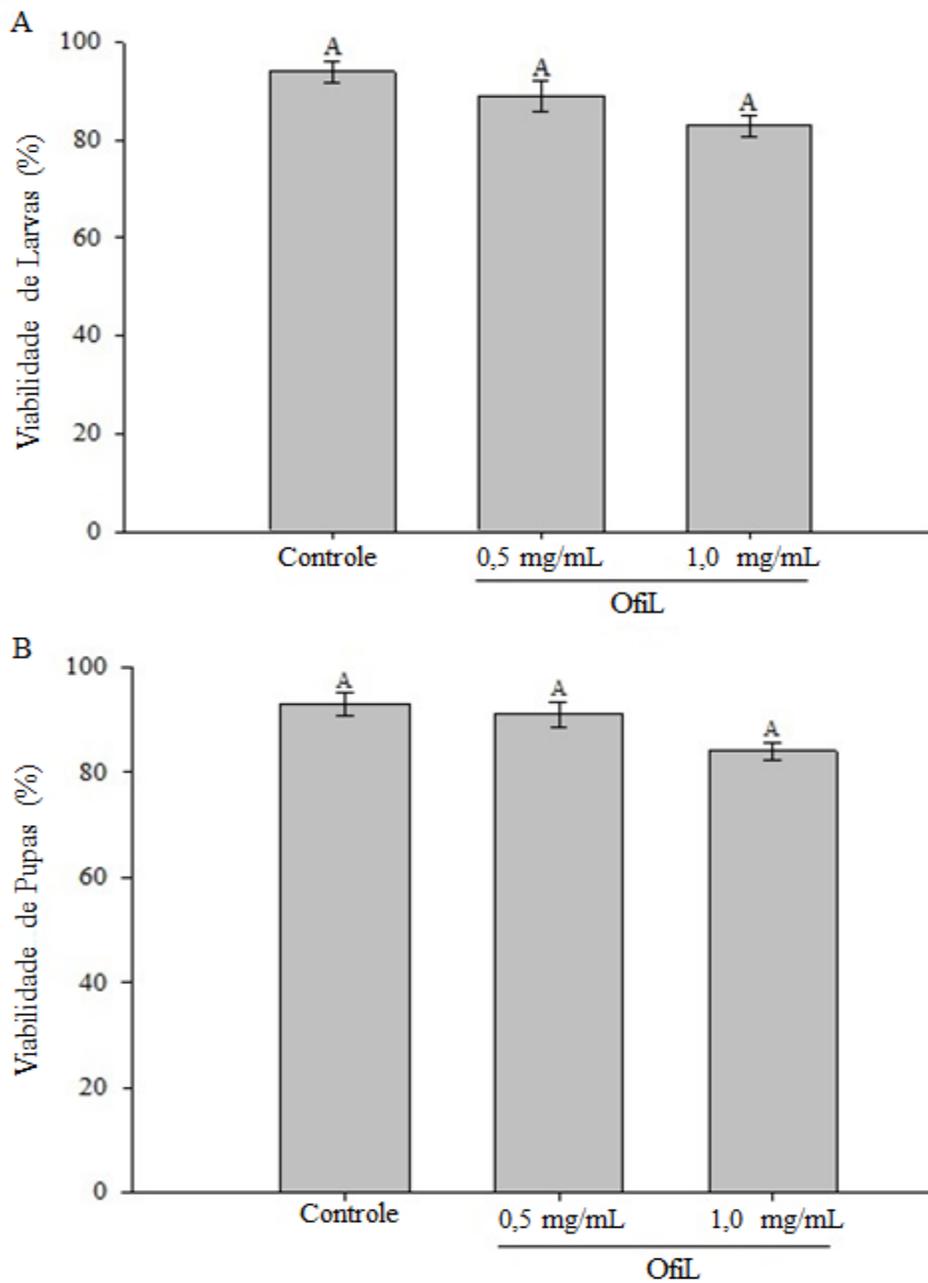


Figura 1. Viabilidade de larvas e pupas de *Plutella xylostella* tratadas com a lectina (OfiL) de cladódios de *Opuntia ficus-indica*. Temp.:  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , UR  $70 \pm 10\%$  e 12h de fotofase. Letras iguais indicam ausência de diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ) Temp.:  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , UR  $70 \pm 10\%$  e 12h de fotofase.

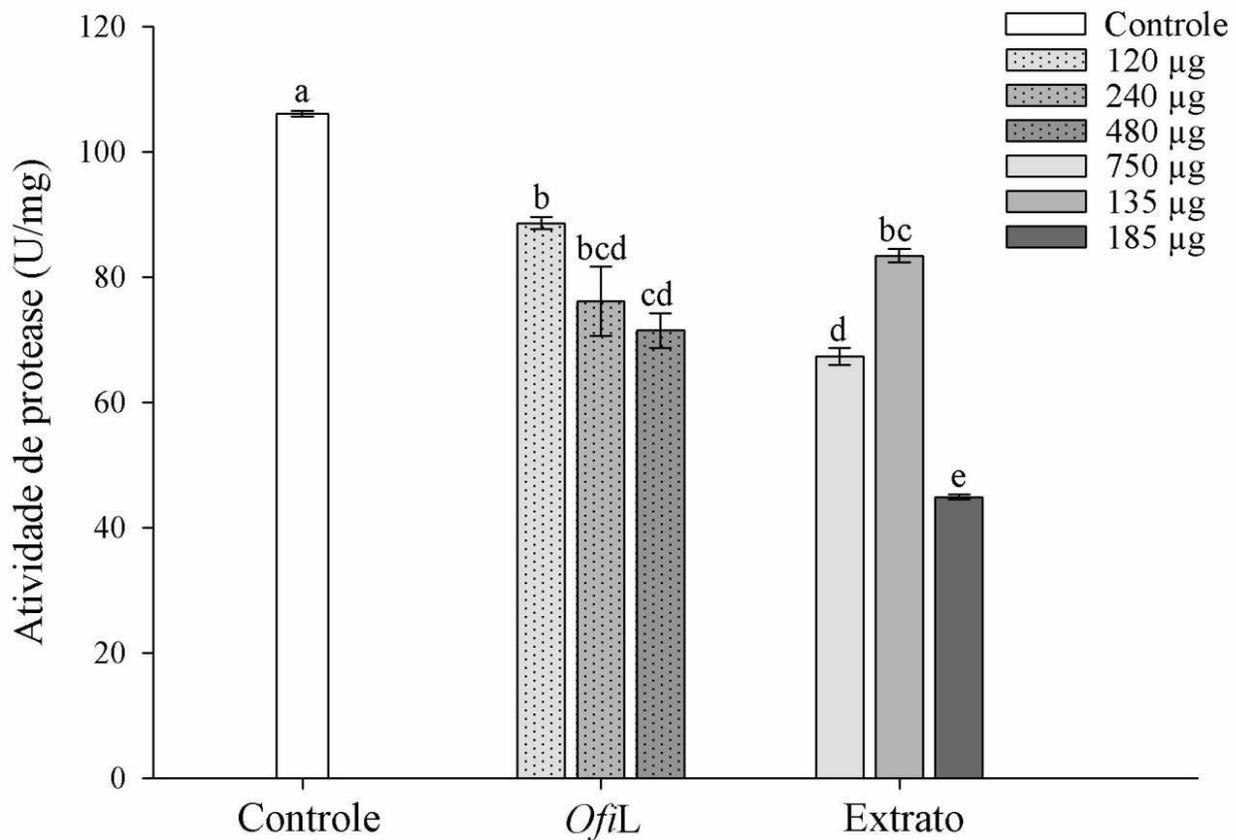


Figura 2. Efeito do extrato e da lectina (OfiL) de cladódios de *O. ficus-indica* sobre a atividade de protease do intestino de larvas *Plutella xylostella*.

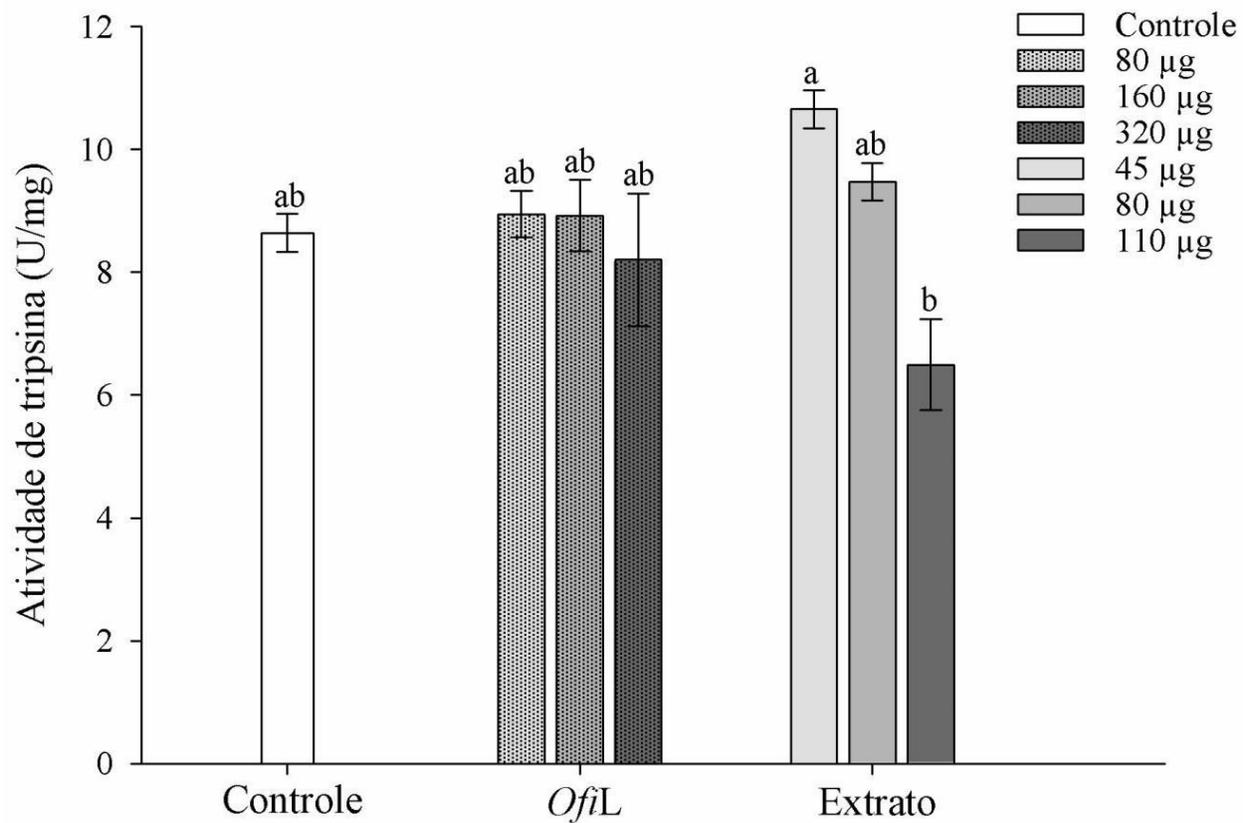


Figura 3. Efeito do extrato e da lectina (OfiL) de cladódios de *Opuntia ficus-indica* sobre a atividade de tripsina do intestino de larvas *Plutella xylostella*.

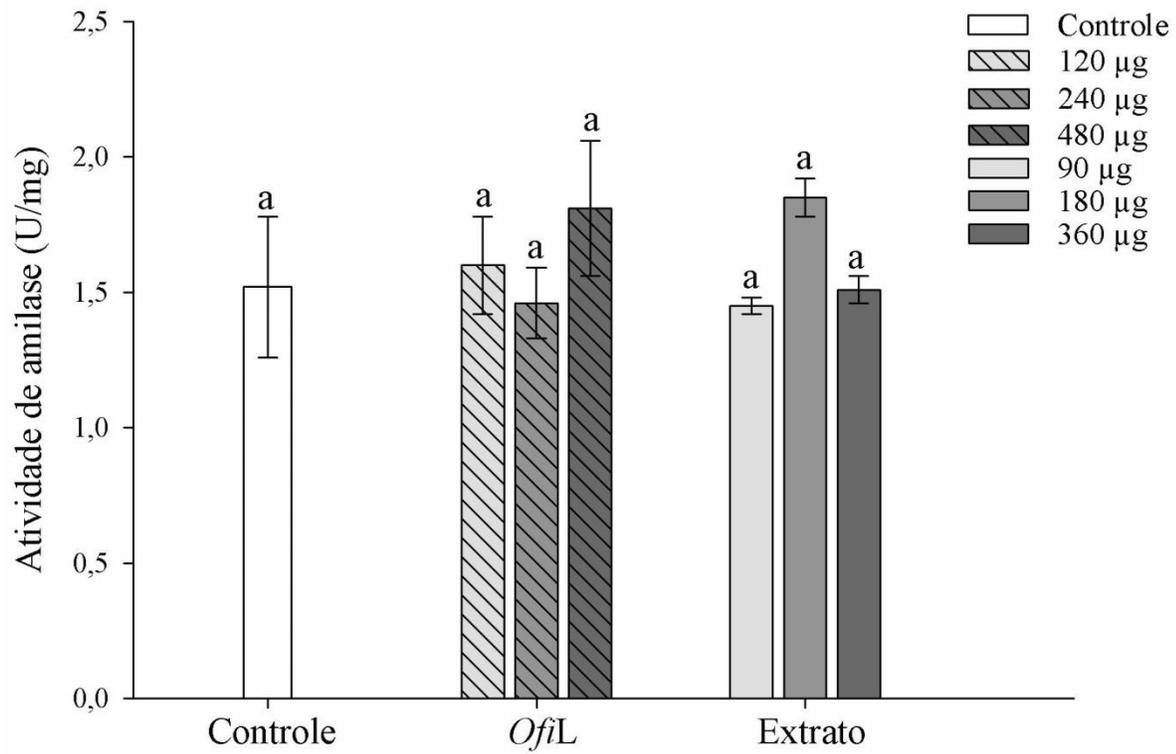


Figura 4. Efeito do extrato e da lectina (OfiL) de cladódios de *Opuntia fícus-indica* sobre a atividade de amilase do intestino de larvas *Plutella xylostella*.

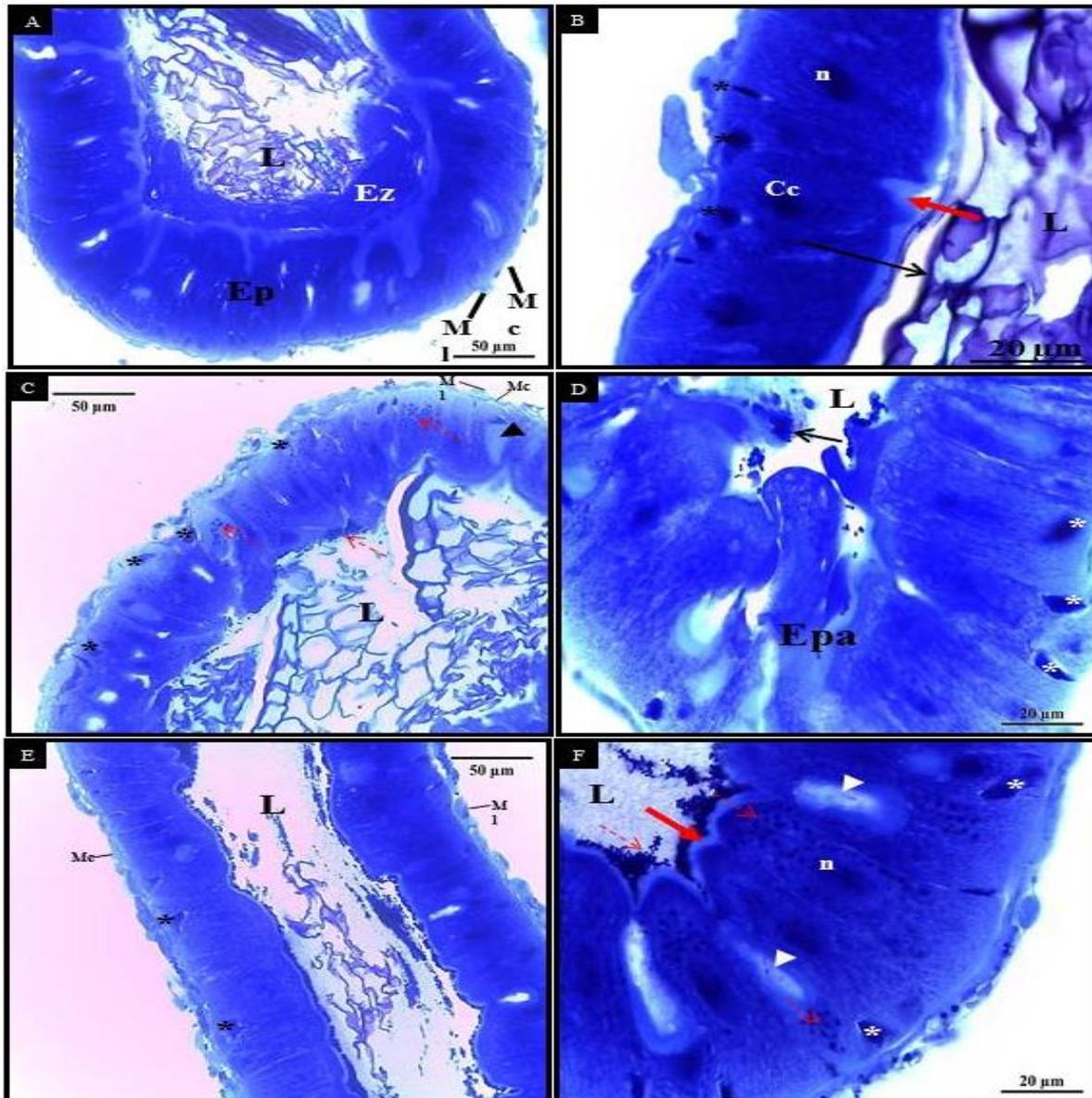


Figura 5. Corte transversal do intestino médio de larvas terceiro ínstar de *Plutella xylostella*. (A) e (B) controle com NaCl 0,15 M 24 horas. (C) e (D) tratamento com 3,6 % de extrato de *Opuntia ficus-indica* 24 horas. (E) e (F) tratamento com 7,2 % de extrato de *Opuntia ficus-indica* 24 horas. (A) epitélio íntegro. (B) células colunares (Cc) com núcleos ovais (n), microvilosidades (seta vermelha) e células regenerativas (asterisco) na base do epitélio, bem como a presença de membrana peritrófica (seta longa) e músculo longitudinal (MI) e músculo circular (Mc). (C) notar a presença de esferites no citoplasma das células colunares e na região do lúmen (seta tracejada vermelha). (D) observar núcleo sendo expelido em direção ao lúmen (seta curta), epitélio alterado (Epa) e desaparecimento da membrana peritrófica. (F) visualizar esferites presentes no citoplasma e no lúmen (seta tracejada vermelha) e células caliciformes (pontas de seta). Coloração Azul de Toluidina.

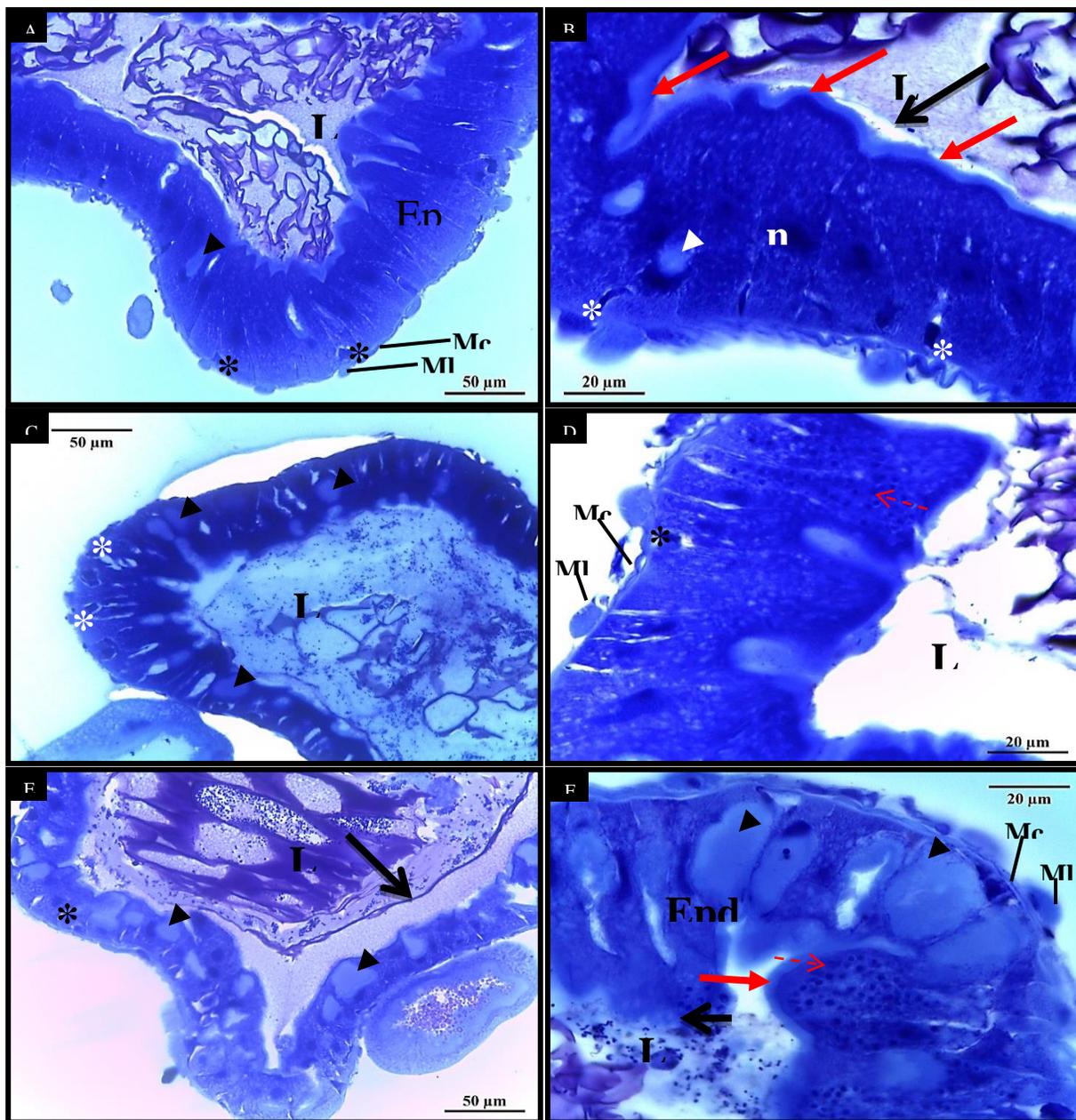


Figura 6. Corte transversal do intestino médio de larvas terceiro ínstar de *Plutella xylostella*. (A) e (B) controle com NaCl 0,15 M 48 horas. (C) e (D) tratamento com 3,6 % de extrato de *Opuntia ficus-indica* 48 horas. (E) e (F) tratamento com 7,2 % de extrato de *Opuntia ficus-indica* 48 horas. (A) epitélio íntegro. (B) visualizar microvilosidades (setas vermelhas), núcleo (n), células caliciformes (ponta de seta), células regenerativas (asterisco) e membrana peritrófica (seta longa). (C) verificar aumento das células caliciformes (ponta de seta). (D) presença de esferites (seta tracejada vermelha). (E) aumento das células caliciformes por todo o epitélio (Ponta de seta), presença da membrana peritrófica (seta longa). (F) desorganização do epitélio. Coloração Azul de Toluidina.

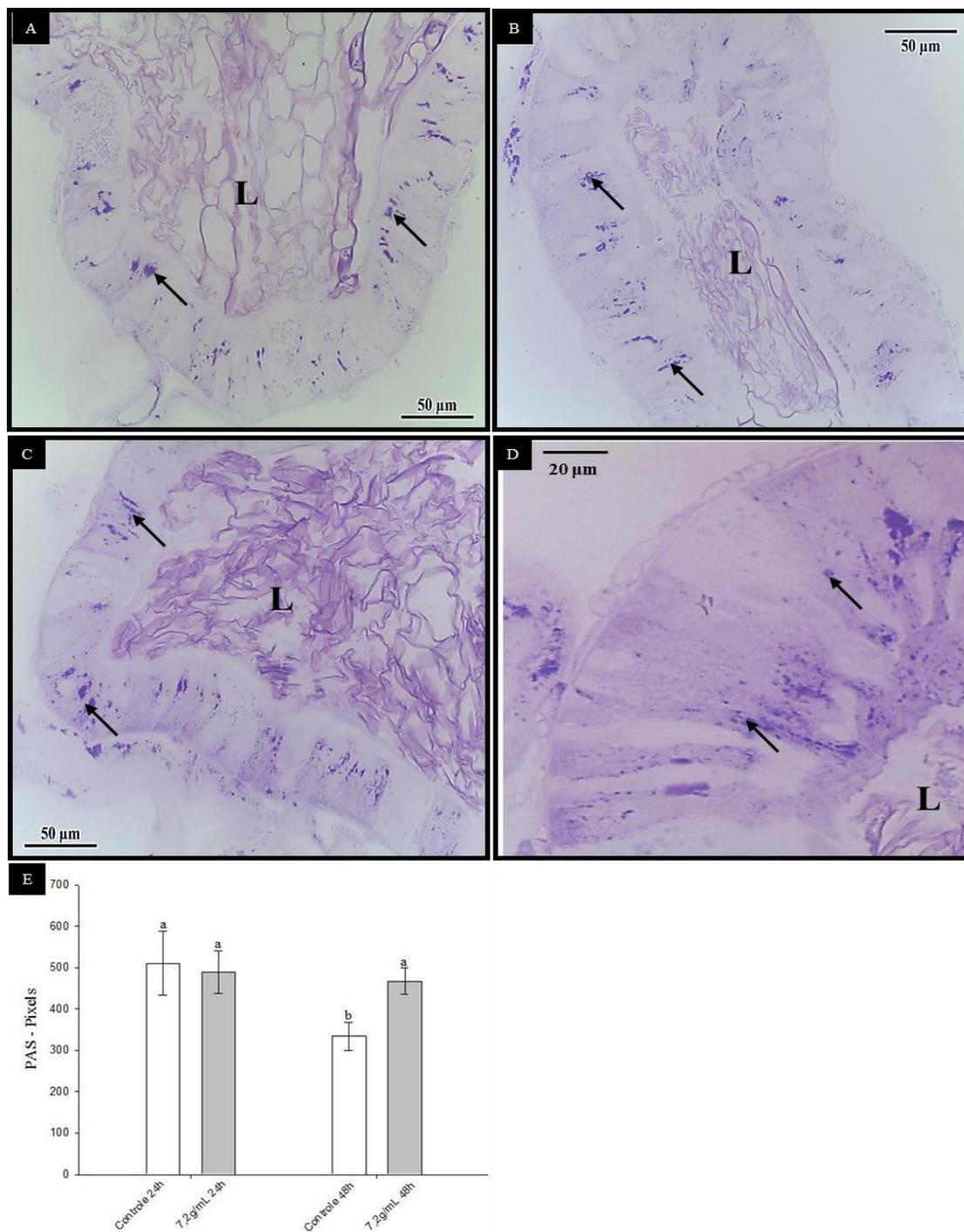


Figura 7. Histoquímica do intestino médio de larvas de terceiro ínstar de *Plutella xylostella* para carboidratos neutros. (A) controle com NaCl 24 horas. (B) tratado com 7,2 % de extrato de *Opuntia ficus-indica* 24 horas. (C) controle com NaCl 48 horas. (D) tratado com 7,2 % de extrato de *Opuntia ficus-indica* 48 horas. Coloração P.A.S. (E) quantidade média de pixels para carboidratos neutros. Barras seguidas de letras desiguais diferem significativamente pelo teste de Tukey a 0,05 de significância. Grânulos de glicogênio (Seta), Lúmen (L).

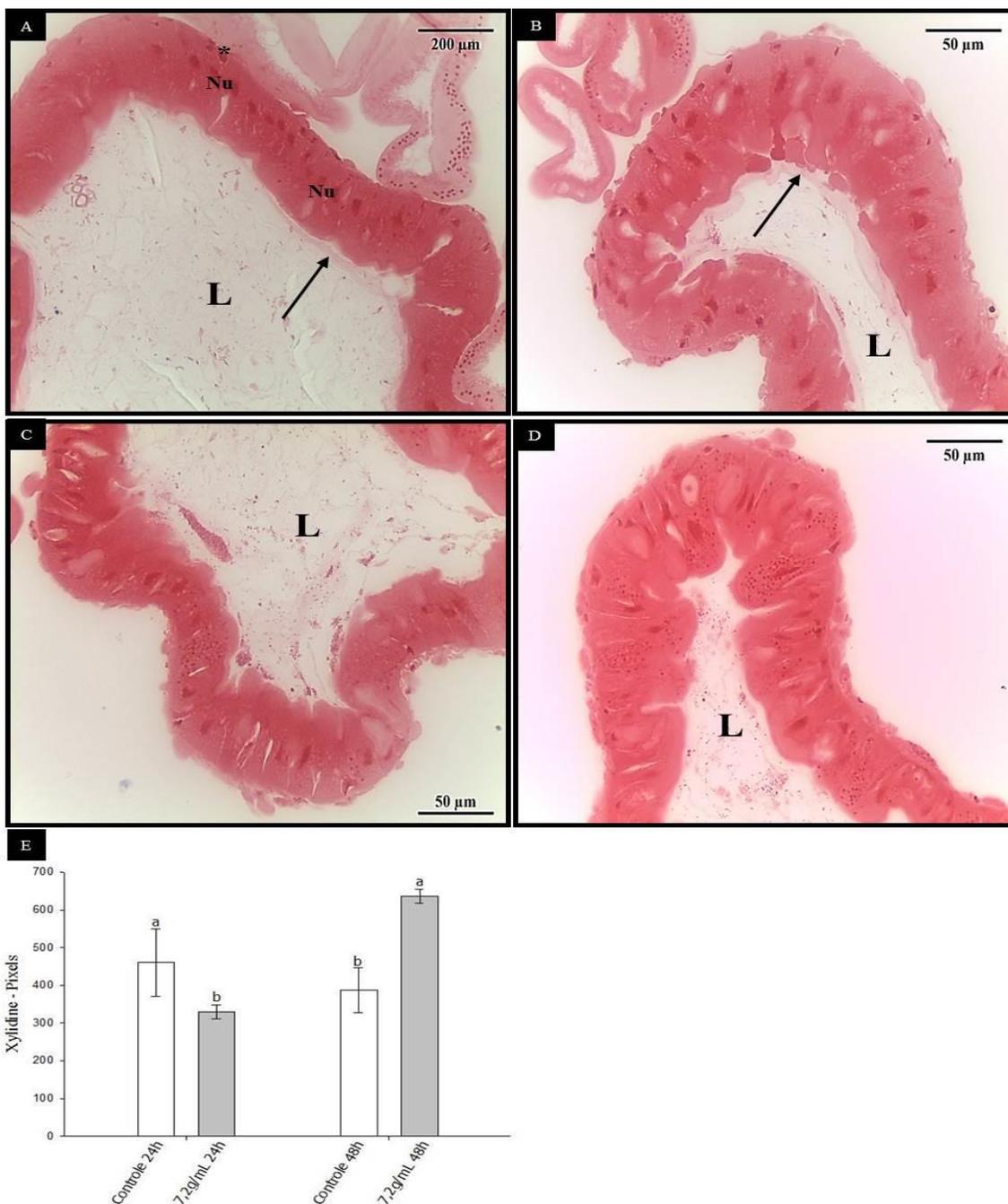


Figura 8. Histoquímica do intestino médio de larvas de terceiro ínstar de *Plutella xylostella* para proteínas totais. (A) controle com NaCl 0,15 M 24 horas. (B) tratado com 7,2 % de extrato de *Opuntia ficus-indica* 24 horas. (C) controle com NaCl 48 horas. (D) tratado com 7,2 % de extrato de *Opuntia ficus-indica* 48 horas. Coloração Xylidine Ponceau. (E) quantidade média de pixels para proteínas. Barras seguidas de letras desiguais diferem significativamente pelo teste de Tukey a 0,05 de significância, para o tempo de 24h e Kruskal-Wallis a 0,05 de significância para o de 48h. Membrana peritrófica (Seta), Lúmen (L).

## CAPÍTULO 4

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta Tese foi motivada pela necessidade de realizar o controle da praga *Plutella xylostella* de uma forma menos impactante para o ambiente e que venha a contribuir para a redução da seleção de insetos resistentes. Inicialmente foi realizada uma caracterização química do extrato, onde foram detectados compostos pertencentes a classes de moléculas inseticidas (lectinas e metabólitos secundários). Nesse sentido, foram procedidas investigações que revelaram o potencial inseticida do extrato de cladódios sobre *P. xylostella* por afetar a viabilidade de ovos e reduzir a viabilidade de larvas. Ainda, o extrato de cladódios mostrou serem um promissor agente fagodeterrente e deterrente de oviposição. Quando os experimentos foram conduzidos com a lectina isolada, não foi possível apontá-la como princípio ativo na atividade inseticida do extrato. Contudo, mesmo que a lectina e o extrato de cladódios tenham causado inibição da atividade de proteases totais, a inibição da atividade de tripsina apenas pelo extrato sugere que outras moléculas presentes no extrato podem estar auxiliando na sua atividade inseticida. Aqui nós mostramos que o extrato de cladódios foi capaz de alterar a microestrutura do intestino médio das larvas e estimular uma resposta imunológica que deixa clara a ação tóxica do extrato. Esta Tese contribui, portanto com o painel de compostos inseticidas naturais por apresentar um novo bioproduto com efeito tóxico sobre uma importante praga agrícola. Adicionalmente, nossos resultados são importantes, pois estudos abordando mecanismos de ação ainda são escassos em nossa área. Experimentos futuros são necessários para mostrar o efeito do extrato em condições de campo e indicar seu(s) princípio(s) ativo(s).