



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**HADRIELLE KARINA BORGES NEVES**

**BIOPROSPECÇÃO DE INSETOS RESISTENTES AO ECDISTERÓIDE 20-  
HIDROXIECDISONA**

**BELÉM/PA**  
**2012**



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**HADRIELLE KARINA BORGES NEVES**

**BIOPROSPECÇÃO DE INSETOS RESISTENTES AO ECDISTERÓIDE 20-  
HIDROXIECDISONA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Agronomia da Universidade Federal Rural da Amazônia, como  
requisito para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Reginaldo Alves Festucci Buselli

**BELÉM/PA**  
**2012**

---

Neves, Hadrielle Karina Borges

Bioprospecção de insetos resistentes ao ecdisteróide 20-hidroxiecdisona. / Hadrielle Karina Borges Neves. Belém, PA, 2012.

69 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2012.

Orientador: Reginaldo Alves Festucci Buselli

1. Ecdisteróide (ECD) 2. 20-hidroxiecdisona (20E) 3. *Omiodes indicata* (Fabricius, 1775) 4. *Pfaffia glomerata*. I. Festucci Buselli, Reginaldo Alves, orient. II. Título

CDD – 572.8

---



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

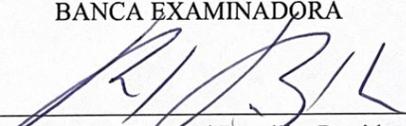
HADRIELLE KARINA BORGES NEVES

BIOPROSPECÇÃO DE INSETOS RESISTENTES AO ECDISTERÓIDE 20-  
HIDROXIECDISONA

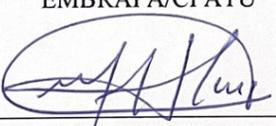
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal Rural da Amazônia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

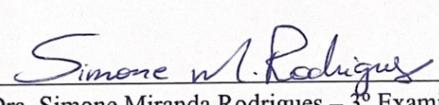
Aprovada em dezembro de 2012

BANCA EXAMINADORA

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Reginaldo Alves Festucci Buseffi – Presidente/Orientador  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Maria do Socorro Padilha de Oliveira – 1º Examinadora  
EMBRAPA/CPATU

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Wilson José de Mello e Silva Maia – 2º Examinador  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Simone Miranda Rodrigues – 3º Examinador  
EMBRAPA/CPATU

\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Gisele Barata da Silva – Suplente  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

## **DEDICATÓRIA**

*A Deus pelas suas bênçãos a mim concedidas, aos meus pais, Maria do Socorro e Ronaldo Duarte Neves pelo incentivo, amor e dedicação, à Thaíssa pela ajuda imprescindível em todas as etapas deste trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus por sua misericórdia, bênçãos e promessas cumpridas em minha vida.

Aos meus pais Maria do Socorro e Ronaldo Duarte Neves por todo o amor, carinho, incentivo e amparo nos momentos difíceis.

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), pelo incentivo.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela bolsa de estudos concedida.

Ao meu Orientador Prof. Dr. Reginaldo Alves Festucci Buselli, pelo tempo investido em meu aprendizado, pela orientação e apoio à minha continuação no mestrado em um momento decisivo de minha vida.

Aos meus Co-Orientadores Prof. Dr. Hugo Alves Pinheiro e Prof. Dr. Wagner Campos Otoni (UFV) pela co-orientação.

Aos pesquisadores da Embrapa Amazônia Oriental, Walkimário Lemos e Alessandra Boari pela utilização de seus Laboratórios, equipamentos e ensinamentos, e aos estagiários Leandro e Mayara.

À professora Telma Batista, pela concessão do uso do Laboratório de Controle Biológico de Insetos da UFRA para a execução do experimento. Aos meus familiares, Rosângela, Paulo, Thais, Tamires, Kátia, Cinthia, Adriana, Sérgio, Lucas, Larissa e Antônio Augusto, pelo carinho e torcida em todos os momentos.

Às amigas e co-orientadas Thaíssa de Paula, Deborah Pires, Ana Karla, Tássia e Mariely pela ajuda imprescindível na execução deste projeto.

Às amigas e colegas de Bioquímica Ana Carolina e Francisca Chagas pelos momentos de alegria e descontração nas horas de estudo.

A Monyck Lopes e Rafael Guedes, pela amizade incondicional ao tempo, distância e situações.

Aos professores Roberto Cezar e Iris Lettiere, pelos ensinamentos e conselhos na vida pessoal e profissional.

Aos colegas de Pós-graduação Fabrícia Moraes, Juliana Rodrigues, Gerson Diego, Renata Lima, Fábio Júnior, Kilma, Yngrid Rodrigues, Marcos Paulo, pelos momentos de descontração na sala de estudos.

À todos que indiretamente ajudaram na realização deste trabalho, sintam-se eternamente agradecidos!

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

E - Ecdisona

ECD - Ecdisteróide

20E - 20-hidroxiecdisona

PE - Fitoecdisteróide

ZE - Zooecdisteróide

## LISTA DE TABELAS

### 3.4 RESULTADOS

- Tabela 1.** Ovoposição de mariposas de *O. indicata* em ambiente natural, alimentadas com solução de mel a 5% .....46
- Tabela 2.** Área, Peso Foliar diário e Digestibilidade em Lagartas de *O. indicata* .....51
- Tabela 3.** Taxa de mortalidade de lagartas de *O. indicata* alimentadas com *P. glomerata*.....53
- Tabela 4.** Médias e desvios padrão para onze caracteres mensurados em machos e fêmeas de *O.indicata*.....60
- Tabela 5.** Ciclo biológico da espécie de *O. indicata* alimentadas com folhas de *P. glomerata* na fase larval e solução de mel a 5% para os insetos adultos.....61

## LISTA DE FIGURAS

### 2 REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1.** Representação estrutural dos ecdisteróides ecdisona (A) e 20-hidroxiecdisona (B).....20
- Figura 2.** Estrutura dos ecdisteróides (EDCs) apresentando cadeia lateral C<sub>27</sub>, C<sub>28</sub>, e C<sub>29</sub>.....20
- Figura 3.** Correlações entre o desenvolvimento e pulsos de 20E em *Drosophila melanogaster*.....22
- Figura 4.** Biossíntese de ecdisona e 20-hidroxiecdisona em espinafre.....22
- Figura 5.** Biossíntese e metabolismo de zooecdisteróides.....24

### 3.4 RESULTADOS

- Figura 1.** Ovo de *O. indicata*.....44
- Figura 2.** Médias para altura, diâmetro central, diâmetro inferior e diâmetro superior de ovos de *O. indicata* (N=30) alimentadas com *P. glomerata* .....45
- Figura 3.** Lagartas de *O. indicata* .....47
- Figura 4.** Comprimento corporal, em milímetros, de lagartas do primeiro ao sexto instar de *O. indicata* .....49
- Figura 5.** Largura torácica, em milímetros, de lagartas do primeiro ao sexto instar de *O. indicata* .....49
- Figura 6.** Peso médio das lagartas de *O. indicata* em cada instar da fase imatura alimentadas à base de *P. glomerata* .....50

<b>Figura 7.</b> Cápsulas cefálicas dos seis instares de <i>Omiodes indicata</i> .....	51
<b>Figura 8.</b> Comprimento médio da cápsula cefálica de lagartas do primeiro ao sexto instar alimentadas à base de folhas de <i>P.glomerata</i> .....	52
<b>Figura 9.</b> Largura média da cápsula cefálica das lagartas do primeiro ao sexto instar alimentadas à base de folhas de <i>P.glomerata</i> .....	53
<b>Figura 10.</b> Vista dorsal (A) e ventral (B) de pupa de <i>O. indicata</i> alimentadas com folhas de <i>P. glomerata</i> .....	54
<b>Figura 11.</b> Ilustração do dimorfismo sexual de <i>O. indicata</i> .....	56
<b>Figura 12.</b> Tamanho das Pupas Masculinas e Femininas de <i>O. indicata</i> .....	57
<b>Figura 13.</b> Peso das pupas femininas e masculinas em gramas de <i>O. indicata</i> .....	57
<b>Figura 14.</b> Insetos adultos de <i>O. indicata</i> .....	58
<b>Figura 15.</b> Ilustração das medidas que foram obtidas do inseto adulto.....	59

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	12
<b>ABSTRACT</b> .....	13
<b>1 CONTEXTUALIZAÇÃO</b> .....	14
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	16
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
2.1 Ginseng Brasileiro ( <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng) Pedersen) .....	19
2.2 Os ecdisteróides .....	20
2.3 Função dos ecdisteróides em plantas e insetos .....	21
2.4 Biossíntese de fitoecdisteróides .....	22
2.5 Biossíntese de zooecdisteróides .....	23
2.6 Mecanismo de ação de 20-hidroxiecdisona em insetos .....	25
2.7 Aplicação biotecnológica dos ecdisteróides .....	25
2.8 Resistência de insetos à fitoecdisteróides .....	26
2.9 Bioprospecção .....	26
2.10 Considerações finais .....	27
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	28
<b>3 CAPÍTULO 01 – BIOPROSPECÇÃO DE INSETOS RESISTENTES AO ECDISTERÓIDE 20-HIDROXIECDISONA</b> .....	37
<b>3.1 INTRODUÇÃO</b> .....	37
<b>3.2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	38
3.2.1 Local de execução dos experimentos .....	39
3.2.2 Produção das mudas de <i>P. glomerata</i> para alimentação dos insetos .....	39
3.2.3 Coleta e criação dos insetos .....	39
3.2.4 Identificação dos insetos .....	39

3.2.5 Obtenção da população massal dos insetos .....	40
3.2.6 Avaliações Realizadas .....	40
Biologia do inseto.....	40
Ovoposição.....	40
Ovos.....	41
Número de instares.....	41
Cápsula Cefálica.....	41
Crescimento das lagartas.....	41
Peso.....	42
Tamanho dos insetos adultos .....	42
Longevidade .....	42
Digestibilidade .....	42
Fotos dos instares das lagartas e pupas .....	43
Sexagem .....	43
3.2.7 Estatística .....	43
<b>3.3 RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
3.3.1 Identificação do inseto .....	43
3.3.2 Ovos .....	44
3.3.2.1 Tamanho médio dos ovos .....	44
3.3.2.2 Ovoposição .....	45
3.3.3 Lagartas .....	46
3.3.3.1 Descrição .....	47
3.3.3.2 Crescimento .....	48

3.3.3.3	Peso .....	49
3.3.3.4	Digestibilidade .....	50
3.3.3.5	Cápsula cefálica .....	51
3.3.3.6	Tamanho da cápsula cefálica .....	52
3.3.3.7	Mortalidade .....	53
3.3.4	Pupa .....	54
3.3.4.1	Sexagem .....	54
3.3.4.2	Tamanho da pupa .....	55
3.3.4.3	Peso .....	57
3.3.5	Adultos .....	58
3.3.5.1	Tamanho dos adultos .....	58
3.3.6	Ciclo Biológico do Inseto .....	60
<b>3.4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>61</b>
<b>3.5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>65</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>66</b>

## RESUMO

*Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen é uma espécie da família Amaranthaceae encontrada na América do Sul, inclusive no Brasil. Em suas raízes foram detectadas o ecdisteróide 20-hidroxicdisona (20E). Os ecdisteróides (ECDs) são hormônios esteróides encontrados em artrópodes (zooecdisteróides, ZE), em algumas espécies de plantas (fitoecdisteróides, PE) e em alguns fungos (micoecdisteróides, ME). Em insetos, o ZE 20E está envolvido em diversos processos (embriogênese, desenvolvimento larval, metamorfose e muda) iniciados ou controlados por pulsos específicos de 20E. Em plantas, o PE 20E atua como agente protetor contra o ataque de insetos não adaptados a 20E. Com o objetivo de identificar insetos resistentes ao PE 20E, insetos presentes na floresta Amazônica que naturalmente se alimentam de *P. glomerata*, foram coletados, isolados e identificados. Conhecida como lagarta enroladeira das folhas, a espécie *Omiodes indicata* (Fabricius 1775) é uma praga de leguminosas como o feijoeiro e a soja, foi encontrada se alimentando de folhas desta espécie. Para se confirmar a sua resistência a 20E, foi realizada a caracterização biológica deste inseto alimentado somente com plantas de *P. glomerata*. Os seguintes caracteres foram mensurados: tamanho (comprimento e largura) e peso da lagarta, pupa e cápsula cefálica, número de instares, tempo de permanência em cada instar da lagarta e pupa, envergadura do inseto adulto, tempo de ovoposição, número de ovos por fêmea, digestibilidade e a sexagem. A análise dos dados obtidos neste trabalho permitiu concluir que o ECD 20E provocou alterações no desenvolvimento das lagartas da espécie *O. indicata*, como maior tamanho dos ovos, aumento no número de instares apresentando seis estádios, maior tamanho corporal, presença de cápsulas cefálicas e peso significativo a partir do quinto instar quando comparados a lagartas alimentadas com folhas de soja, baixa taxa de mortalidade (somente no primeiro, quinto e sexto instar). A espécie *Omiodes indicata* (Fabricius 1775) apresenta resistência a 20E, apresentando assim potencial aplicabilidade biotecnológica.

**Palavras-chave:** Ecdisona (E), 20-hidroxicdisona (20E), *Omiodes indicata*, *Pfaffia glomerata*.

## ABSTRACT

*Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen is a species of the Amaranthaceae family found in South America, including Brazil. The ecdysteroid 20-hydroxyecdysone (20E) has been detected in its roots. Ecdysteroids (ECDs) are steroid hormones found in arthropods (zooecdysteroids, ZE), in some plant species (phytoecdysteroids, PE) and in some fungi (mycoecdysteroids, ME). In insects, ZE 20E is involved in several processes (embryogenesis, larval development, metamorphosis and molting) initiated or controlled by specific pulses of 20E. In plants, PE 20E acts as a protective agent against the attack of insects not adapted to 20E. With the objective to identify insects resistant to PE 20E, insects present in the Amazon rainforest that naturally feed on *P. glomerata* were collected, isolated and identified. Known as the leaf-rolling caterpillar, the species *Omiodes indicata* (Fabricius 1775) is a pest of legumes such as beans and soybeans, and was found feeding on the leaves of this species. To confirm its resistance to 20E, biological characterization of this insect fed only on *P. glomerata* plants was performed. The following traits were measured: size (length and width) and weight of the caterpillar, pupa and head capsule, number of instars, time spent in each instar of the caterpillar and pupa, wingspan of the adult insect, time of oviposition, number of eggs per female, digestibility and sexing. The analysis of the data obtained in this study allowed us to conclude that ECD 20E caused changes in the development of caterpillars of the species *O. indicata*, such as larger egg size, an increase in the number of instars with six stages, larger body size, presence of cephalic capsules and significant weight from the fifth instar when compared to caterpillars fed with soybean leaves, low mortality rate (only in the first, fifth and sixth instar). The species *Omiodes indicata* (Fabricius 1775) is resistant to 20E, thus presenting potential biotechnological applicability.

**Keywords:** Ecdysone (E), 20-hidroxiectidisona (20E), *Omiodes indicata*, *Pfaffia glomerata*.

## 1 CONTEXTUALIZAÇÃO

Ecdisteróide é um termo utilizado para definir uma classe de hormônios esteróides, que são encontrados em artrópodes e atuam sobre a ecdise. Os ecdisteróides encontrados em animais são classificados como zooecdisteróides (ZEs), enquanto os encontrados em vegetais são classificados como fitoecdisteróides (PEs), já em casos mais raros podem ser encontrados em determinadas espécies de fungos, sendo classificados neste caso como microecdisteróides (MEs) (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008a; SPLINDER et al., 2009). Diversas estruturas de ecdisteróides foram identificadas e estão disponíveis no Ecdybase (<http://www.ecdybase.org>), onde há catalogadas cerca de 300 estruturas diferentes isoladas tanto de plantas como de artrópodes, principalmente em insetos (LAFONT & DINAN et al., 2003; BOO et al., 2010).

Os zooecdisteróides tem um papel fundamental em todos os estágios durante o ciclo vital dos insetos, pois controlam muitos processos fisiológicos tais como o processo de muda, chamado de ecdise, morte programada de células, síntese de cutícula, desenvolvimento embrionário, pupação e sobre a reprodução durante o estágio adulto (THUMMEL & CHORY, 2002; UHLIK et al., 2008). Já os fitoecdisteróides agem como metabólitos secundários na defesa contra predadores herbívoros e seus níveis podem chegar a 3% do peso seco da planta (GALBRAITH & HORN, 1966; STAAL, 1967; SAVCHENKO et al., 1998; BAKRIN et al., 2008; BOO et al., 2010).

Muitas plantas e insetos apresentam vários desses compostos em comum, por exemplo, ecdisona (E) e 20-hidroxiecdisona (20E) (MAKKA et al., 2002). O 20E é um composto derivado da ecdisona, hidroxilada no carbono 20, tornando-se então um ecdisteróide ativo, sendo os mais encontrados em diversos artrópodes, principalmente nos insetos (GOODMAN & GRANGER, 2005; KANEKO et al., 2011). O ZE 20E é sintetizado nas células protorácicas (PTTH) que se encontram agrupadas como lobos laterais nas glândulas do anel (GILBERT, 2002; DUBROVSKY, 2005). Ecdisteróides não são biossintetizados por mamíferos. Contudo, 20E quando ingerido por estes apresenta várias propriedades farmacológicas e medicinais (SLAMA & LAFONT, 1995; DINAN, 2001; LAFONT & DINAN, 2003; BATHORI & PONGRACZ, 2005; DINAN & LAFONT, 2006; FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008a).

O ZE 20E juntamente com o Hormônio Juvenil (JH) possuem papel fundamental como reguladores da muda e metamorfose dos insetos (FRANSSSENS et al., 2006). Picos de 20E sinalizam que o organismo do inseto deve promover a muda de instar, pois este já se encontra com a reserva de energia necessária e desenvolvimento completo para passar ao próximo instar (RIDDIFORD & TRUMAN, 1993; BOND et al., 2010). Já picos de hormônio juvenil sinalizam

que o organismo do inseto deve permanecer no instar em que se encontra, para que o inseto se alimente e acumule energia, alcançando o peso e o desenvolvimento ideal para que possa mudar de instar. O balanço entre os níveis destes hormônios no organismo de insetos ocorre de forma inversamente proporcional, pois quando os níveis de hormônio juvenil se encontram elevados, os níveis de 20E encontram-se baixos.

Níveis elevados de 20E no inseto além da concentração normal podem levar à distúrbios no metabolismo do inseto, podendo promover o processo de muda precoce, sem o inseto ter completado o desenvolvimento necessário, má formação morfológica durante o próximo instar, alteração no número de instares (podendo haver mais ou menos instares do que o normal no seu ciclo de vida), deterrência e esterilidade, podendo também levá-lo a morte antes de completar o ciclo de vida (BLACKFORD & DINAN, 1997; DINAN, 2001).

O ecdisteróide (ECD) 20E além de ser produzido por insetos é também produzido por algumas espécies de vegetais, dentre eles, a *Pfaffia glomerata* (Spreng), conhecida popularmente como ginseng brasileiro, sendo bastante utilizado como fitoterápico na medicina como tônico energético, afrodisíaco, antidiabético, em distúrbios gástricos, reumatismo, anti-inflamatório e regeneração de tecidos (OLIVEIRA, 1986; NETO et al., 2005; MENDES & CARLINI, 2007; FREITAS et al., 2009; LEAL et al., 2010). As propriedades medicinais de *P. glomerata* ou outra espécie do gênero *Pfaffia spp.* podem ser atribuídas a 20E ou outro a composto, ou até mesmo a combinação de vários fitoquímicos (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008b).

Altos teores de PE causam distúrbios na fisiologia dos insetos, podendo levá-los a morte, porém como existem espécies que se alimentam de plantas produtoras de 20E, acredita-se que tais espécies possuam mecanismos bioquímicos que lhe confirmam resistência ao composto (neste caso pertencente à ordem Lepidoptera, que são holometábolos). A resistência destes insetos se baseia na capacidade de completar todo o seu ciclo de vida chegando à fase adulta e sendo capaz de gerar descendentes férteis, mesmo se alimentando de plantas produtoras de 20E durante várias gerações.

Diante das questões apresentadas, o presente trabalho teve como objetivos identificar insetos resistentes a 20E que naturalmente se alimentam de *Pfaffia glomerata* (Spreng) e avaliar a biologia do inseto através dos seguintes parâmetros: tamanho (comprimento e largura) e peso da lagarta, pupa e cápsula cefálica, número de instares, tempo de permanência em cada instar da lagarta e pupa, envergadura do inseto adulto, tempo de ovoposição, número de ovos por fêmea, digestibilidade e a sexagem.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAKRIN, A.; MARIA, A.; SAYAH, F.; LAFONT, R.; TAKVORIAN, N. Ecdysteroids in spinach (*Spinacia oleracea* L.): Biosynthesis, transport and regulation of levels. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.46, p.844-854, 2008.

BATHORI, M.; PONGRACZ, Z. Phytoecdysteroids – from isolation to their effects on humans. **Curried Medicinal Chemical**, v.12, p.153-172, 2005.

BOND, N. D.; HOSHIZAKI, D. K.; GIBBS, A. G. The role of 20-hydroxyecdysone signaling in *Drosophila* pupal metabolism. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v.157, p.398-404, 2010.

BLACKFORD, M.; DINAN, L. The tomato moth *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidae) detoxifies ingested 20-hydroxyecdysone but is susceptible to the ecdysteroid agonists RH-5849 and RH-5992. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.27, p.167–177, 1997.

BOO, K. H.; LEE, D.; JEON, G. L.; KO, S. H.; CHO, S. K.; KIM, J. H.; PARK, S. P.; HONG, Q.; LEE, S. H.; LEE, S. S.; RIU, K. Z. Distribution and Biosynthesis of 20-Hydroxyecdysone in Plants of *Achyranthes japonica* Nakai. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.11, p. 2226-2231, 2010.

DINAN, L. Phytoecdysteroids: biological aspects. **Phytochemistry**, v.57, p. 325-339, 2001.

DINAN, L.; LAFONT, R. Effects and applications of arthropod steroid hormones (ecdysteroids) in mammals. **Journal Endocrinology**, v.191, p.1-8, 2006.

DUBROVSKY, E. B. Hormonal cross talk in insect development. **Trends in endocrinology and Metabolism**, v.16, p.6-11, 2005.

FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; CONTIM, L. A. S.; BARBOSA, L. C. A.; STUART, J. J.; OTONI, W. C. Biosynthesis and potential functions of the ecdysteroid 20-hydroxyecdysone – a review. **Botany**, v.86, p.978-987, 2008a.

FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; CONTIM, L. A. S.; BARBOSA, L. C. A.; VIEIRA, R. A.; STUART, J. J.; OTONI, W. C. Level and distribution of 20-hydroxyecdysone during *Pfaffia glomerata* development. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.20, p.305-311, 2008b.

FRANSSENS, V.; SMAGGHE, G.; SIMONET, I. C.; BREUGELMANS, B.; LOOF, A. D.; BROECK, J.V. 20-Hydroxyecdysone and juvenile hormone regulate the laminarin-induced nodulation reaction in larvae of the flesh fly, *Neobellieria bullata*. **Developmental and Comparative Immunology**, v.30, p.735-740, 2006.

FREITAS, C. S.; BAGGIO, C. H.; TWARDOWWSCHY, A.; SANTOS, A. C.; MAYER, B.; LUIZ, A. P.; SANTOS, C. A. M.; MARQUES, M. C. A.; SANTOS, A. R. S. Involvement of glutamate and cytokine pathways on antinociceptive effect of *Pfaffia glomerata* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.122, p.468-472, 2009.

GALBRAITH, M. N., HORN, D. H. S. An insect moulting hormone from a plant. **Journal Chemical Society Chemical Community**, p.905-906, 1966.

GILBERT, L.I. Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway. **Annual Review Entomology**, v.47, p.883-916, 2002.

GOODMAN, W. G.; GRANGER, N. A., The juvenile hormones. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S.S. (Eds.). **Comprehensive Molecular Insect Science**, v.3, p.319-408, 2005.

KANEKO, Y. U.; KINJOH, T.; KIUCH, M.; HIRUMA, K. Stage-specific regulation of juvenile hormone biosynthesis by ecdysteroid in *Bombyx mori*. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.335, p.204-210, 2011.

LAFONT, R.; DINAN, L. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update. **Journal Insect Science**, v.3, p.1-30, 2003.

LEAL, P. F.; KFOURI, M. B.; ALEXANDRE, F. C.; FAGUNDES, F. H. R.; PRADO, J. M.; TOYAMA, M. H.; MEIRELES, M. A. A. Brazilian Ginseng extraction vi LPSE and SFE: Global yields, extraction kinetes, chemical composition and antioxidannt activy. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.54, p.38-45, 2010.

MAKKA, T.; SEINO, A.; TOMITA, S.; FUJUWARA, H.; SONOBE, H. A possible role of 20-hydroxyecdysone in embryonic development of the silkworm *Bombyx mori*. **Archives of Insect Biochemical and Physiology**, v.51, p.111-120, 2002.

MENDES, F. R.; CARLINI, E. A. Brazilian plants as possible adaptogens: an ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, p.493-500, 2007.

NETO, A. G.; COSTA, J. M. L. C.; BELATI, C. C.; VINHÓLIS, A. H. C.; POSSEBOM, L. S.; DA SILVA FILHO, A. A.; CUNHA, W. R.; CARVALHO, J. C. T.; BASTOS, J. K.; SILVA, M. L. A. Analgesic and anti-inflammatory activity of crude root extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. **Journal of Ethnopharmacology**, v.96, p.87–91, 2005.

OLIVEIRA, F. *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze—O ginseng-brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.1, p.1–117, 1986.

RIDDIFORD, L.; TRUMAN, J. Hormone receptors and the regulation of insect metamorphosis. **American Zoology**, v.33, p.340–347, 1993.

SAVCHENKO, T.; WHITING, P.; SIK, V.; UNDERWOOD, E.; SARKER, S. D.; DINAN, L. Distribution and identities of phytoecdysteroids in the genus *Briza* (Gramineae). **Biochemical Systematics and Ecology Biochemistry**, v.26, p.781-791, 1998.

SLAMA, K.; LAFONT, R. Insect hormones - ecdysteroids: their presence and actions in vertebrates. **Europa Journal Entomology**, v.92, p.355-377, 1995.

SPINDLER, K. D.; HONL, C.; TREMMEL, C. H.; BRAUN, E. S.; RUFF, H.; SPINDLER-BARTH, M. Ecdysteroid hormone action. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.66, p.3837-3850, 2009.

STAAL, G. B. Plants as a source of insect hormones. **Koninkl. Nederl Akad Van Wetenschappen Proc. Ser. C**, v.70, p.409-418, 1967.

THUMMEL, C. S.; CHORY, J. Steroid signaling in plants and insects—common themes, different pathways. **Genes & Development**, v.16, p.3113-29, 2002.

UHLIK, O.; KAMLAR, M.; KOHOUT, L.; JEZEK, R.; HARMATHA, J.; MACEK, T. Affinity chromatography reveals Rubisco as an ecdysteroid-binding protein. **Steroids**, v.73, p.1433-1440, 2008.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 GINSENG BRASILEIRO (*Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen)

A espécie *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen pertence à família Amaranthaceae, apresenta ampla distribuição geográfica podendo ser encontrada nos Estados do Sul e Sudeste do Brasil (MAGALHÃES, 2000; FLORES et al., 2010). As plantas dessa família são perenes, subarborescentes ou arbustivas, apresentando caules eretos ou semi-erectos, geralmente ocos, glabros ou levemente pilosos, com 0,5 a 2,5 m de altura. Apresentam raízes tuberosas, e geralmente, bifurcadas. As folhas são opostas, ovado-lanceoladas e pilosas; quando novas são largas e aquelas próximas das inflorescências são estreitas. As flores são completas, ou seja, apresentam gineceu e androceu. A planta é típica de vegetação ciliar e de campos de inundação de rios; sendo encontrada com frequência no cerrado e em orla de matas, beiras de rios, capoeiras úmidas e campos rupestres (POTT & POTT, 1994; NASCIMENTO et al., 2007). Também se desenvolve em solos drenados, tanto argilosos, quanto arenosos (RIBEIRO & PEREIRA, 1994; MONTANARI JÚNIOR et al., 1999; BENTES et al., 2000). A propagação pode ser feita vegetativamente por estaquia dos ramos e sexuadamente por meio do uso de sementes (LAZZARINI et al., 2001; MING et al., 2002).

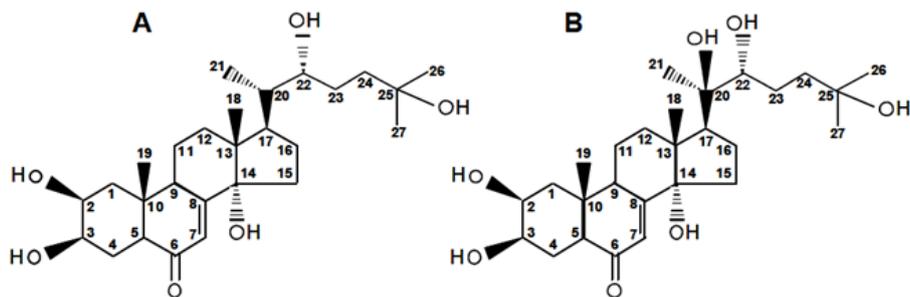
A espécie em questão é conhecida popularmente como fáfia, ginseng do pantanal ou ginseng brasileiro, considerada como sucessora do ginseng verdadeiro (*Panax ginseng* C.A. Meyer). Possui grande potencial para consumo no mercado interno e externo, devido uma parte da fáfia produzida no Brasil ser exportada, principalmente, para o Japão e Estados Unidos, sendo que o mercado brasileiro absorve quase toda a produção, e o fator limitante de sua maior comercialização é a falta de matéria-prima (MONTANARI JÚNIOR, 2001).

Sua importância comercial está ligada à composição bioquímica, apresentando vários compostos com grande relevância medicinal e para a agricultura. Dentre estes compostos, há os tripernóides (ácido glomérico), rubrosterone, ácido oleanólico e ecdisteróides, nos quais podem atribuir efeitos analgésicos, anti-inflamatório, antioxidante, tônicos e afrodisíacos (SHIOBARA et al., 1993; FREITAS et al., 2004; DANIEL et al., 2005; NETO et al., 2005; FLORES, 2009a; LEAL et al., 2010), tendo utilidade na indústria farmacêutica para a produção de fitoterápicos e suplementos alimentares (MAGALHÃES, 2000; FLORES et al., 2009b). Recentemente, foi determinado que 20E está presente nas flores, folhas, caules e raízes de *P.*

*glomerata*, sendo predominantemente acumulado em suas raízes (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008b).

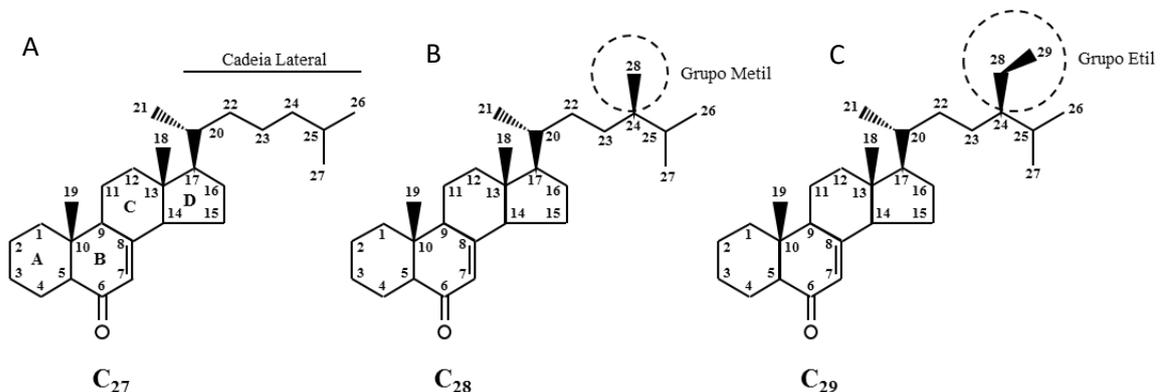
## 2.2 OS ECDISTERÓIDES

Os ecdisteróides (ECD) são hormônios polares, esteróides que controlam o desenvolvimento e reprodução de artrópodes (KOOLMAN, 1989; BAKRIM et al., 2008). Estes hormônios podem ser denominados como zooecdisteróide (ZE), fitoecdisteróide (PE) e microecdisteróide (ME), quando presentes em animais, plantas e fungos, respectivamente. Seus análogos podem ser encontrados nestes diferentes reinos, na forma inativa e convertidos para a forma ativa do hormônio, 20-hidroxiecdisona (Figura 1) (CHAPMAN, 1998; DINAN, 2001; DINAN et al., 2009).



**Figura 1.** Representação estrutural dos ecdisteróides ecdisona (A) e 20-hidroxiecdisona (B). Adaptado (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008a).

Esses ecdisteróides possuem uma cadeia estrutural universal que caracteriza o grupo hormonal esterol, composto por quatro anéis e apresentando uma cadeia lateral ligada ao carbono 17 (C17). A clivagem da cadeia lateral ocorre nos carbonos C19, C21 e C24 (BÁTHORI & PONCRÁZ, 2005; NELSON, 2011) (Figura 2).



**Figura 2.** Estrutura dos ecdisteróides (EDCs) apresentando cadeia lateral C<sub>27</sub> (A), C<sub>28</sub> (B), e C<sub>29</sub> (C). Adaptado (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008a).

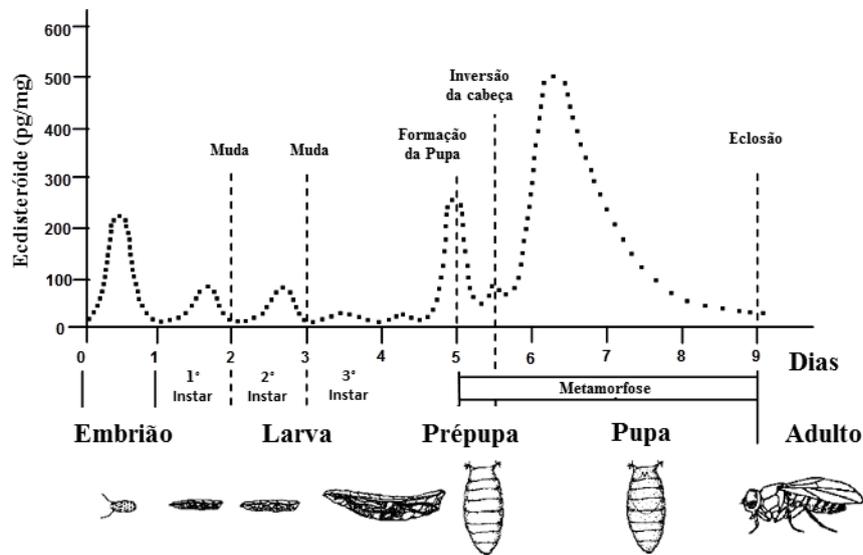
### 2.3 FUNÇÃO DOS ECDISTERÓIDES EM PLANTAS E INSETOS

Em plantas os ecdisteróides (fitoecdisteróides) são considerados como metabólitos secundários, sendo produzidos em uma variedade de espécies vasculares na defesa vegetal contra herbívoros (LAFONT, 1998; DINAN, 2001). Porém, pode atuar também como um composto biologicamente ativo, afetando processos morfológicos e fisiológicos nas plantas, tais como alongamento do coleóptilo, ativação da amilase, atraso no amarelecimento das folhas, além de atuar na diferenciação de células somáticas (MACHACKOVA et al., 1995).

Processos distintos podem ser regulados dependendo de diferentes concentrações de 20-hidroxiecdisona (20E), já que efeitos sinérgicos de 20E e indol-3-il ácido acético (AIA) são observados no alongamento do coleóptilo (GOLOVATSKAYA, 2004; FESTUCCI-BUSELLI, 2008b). Além disso, as concentrações de fitoecdisteróides podem ser aumentadas pelo dano mecânico causado por herbívoros, insetos ou tratamento com o metil jasmonato (SCHEMELZ et al., 1998; SCHEMELZ et al., 2002).

Em insetos, a embriogênese, o desenvolvimento larval, a metamorfose e muda são controlados ou induzidos por pulsos específicos de 20E. Quando o organismo do inseto está com a quantidade suficiente de energia armazenada necessária para a troca e o desenvolvimento completo do instar, pulsos específicos de 20E sinalizam que o organismo está apto para mudar para o instar subsequente (Figura 3). Portanto, o 20E é constantemente exigido para o desenvolvimento do inseto ser concluído, podendo influenciar na esterilidade e reprodução, morte celular programada, síntese de cutícula, desenvolvimento embrionário e pupação (KUBO et al., 1983; ADEL & SEHNAL, 2000; MAKKA et al., 2002).

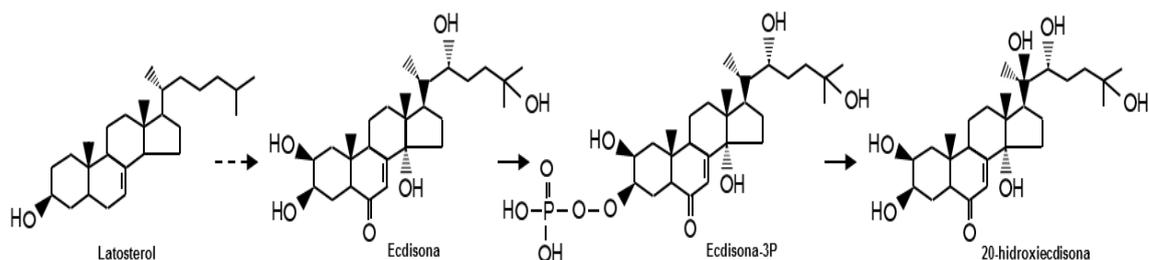
Pulsos inespecíficos de 20E ou o seu uso como forma de proteção contra insetos fitófagos não adaptados podem causar alterações no seu crescimento, desenvolvimento, alterações no processo de muda (ecdise), deterrência, inibição da alimentação, podendo levar o inseto à morte (FRANCISCO & JOSEP, 1993; BLACKFORD, 1997; DINAN, 2001; HUANG et al., 2008; XU et al., 2009). Estudos em *Pectinophora gossypiella*, *Spodoptera frugiperda*, *Acrolepiopsis assectella* e *Bombyx mori* observaram alterações no crescimento e desenvolvidos quando alimentados com dieta a base de 20E (KUBO et al., 1981; ARNAULT et al., 1986; KUBO et al., 1987; TANAKA & TAKEDA, 1993; RHARRABE et al., 2009).



**Figura 3.** Correlações entre o desenvolvimento e pulsos de 20E em *Drosophila melanogaster*. Os processos de desenvolvimento (embriogênese, desenvolvimento larval e metamorfose) são sincronizados por pulsos de ECDs. As transições que ocorrem durante o desenvolvimento são marcadas por linhas quebradas. Adaptado (THUMMEL, 2001).

## 2.4 BIOSÍNTESE DE FITOECDISTERÓIDES

Os esteróis vegetais são triterpenos que incluem um grupo metil ou etil em sua estrutura (GOODWIN, 1971), podendo ter sua cadeia modificada pela hidroxilação realizada por enzimas em pontos específicos da cadeia, sendo transformados em outros compostos, como os esteróis conhecidos: o latosterol, colesterol e 7-dehidrocolesterol, encontrados em baixas quantidades de plantas produtoras de fitoecdisteróides, como as espécies *Spinach spp.* e *Brainea insignis* (Hook.) J. Sm, apresentando o latosterol como o precursor da biossíntese (Figura 4) (ADLER & GREBENOK, 1995; ADLER & GREBENOK, 1999; WU et al., 2010).



**Figura 4.** Biossíntese de ecdisona e 20-hidroxiecdisona em espinafre (*Spinach spp.*). Adaptado (ADLER & GREBENOK, 1999).

Já em *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) o processo de síntese parece ser mais complexo, pois são codificadas 12 enzimas a partir de 24 genes que agem numa via biossintética composta por onze etapas a partir do acetil-CoA para a formação do cicloartenol e lanosterol (SUZUKI & MURANAKA, 2007). O lanosterol pode ser uma via alternativa para a formação do lanosterol (KOLESNIKOVA et al., 2006; SWAI et al., 2006). Apesar de serem conhecidos os precursores, a rota de biossintese precisa dos fitoecdisteróides ainda é desconhecida.

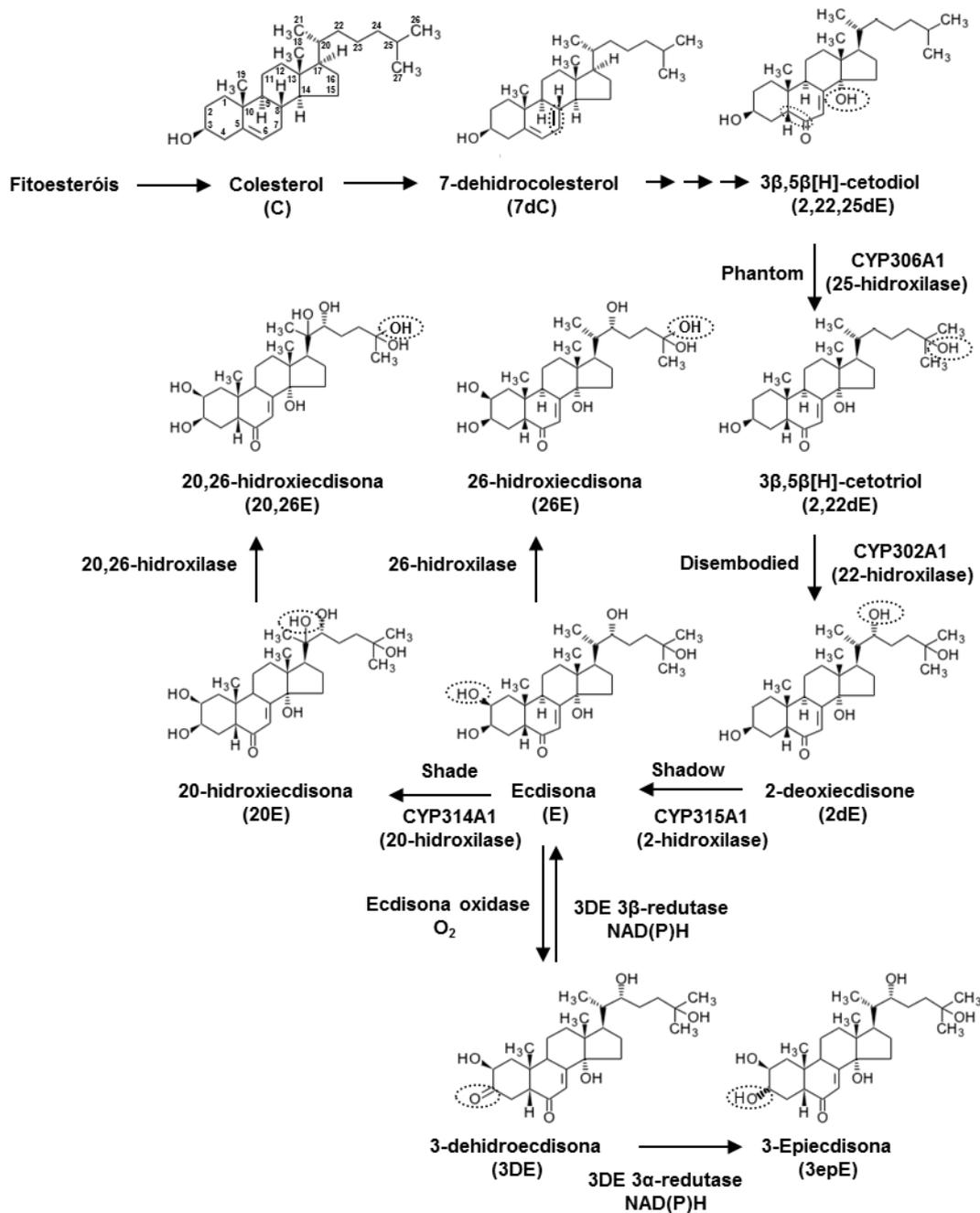
## 2.5 BIOSSÍNTESE DE ZOOECDISTERÓIDES

Os ecdisteróides são os principais hormônios esteróides nos insetos que agem no processo de muda (ecdise) e são sintetizados pela ação do hormônio protoracicotrópico (PTTH) nas glândulas protorácicas (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008a; CHAITANYA, 2010). Em insetos, o esterol absorvido através do consumo de plantas é transformado por meio de reações químicas em colesterol o qual pode ser transformado em 7-deidrocolesterol (7dC) que após sucessivas modificações bioquímicas pode ser convertido em 20-hidroxiectidisona (20E) (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008a).

A rota e as enzimas que convertem o 7-deidrocolesterol em  $3\beta,5\beta$ (H)-cetodiol (2,22,25dE) ainda é desconhecida. Logo após ocorre a ação catalítica de uma série de enzimas da classe dos citocromos P450 monooxigenases que adicionam hidroxilas (OH) as cadeias principais (GILBERT, 2004; URLACHER & EIBEN, 2006), atribuindo dessa forma à característica observada nos ecdisteróides hidroxilados. Dando continuidade à rota de biossintese, o  $3\beta,5\beta$ (H)-cetodiol é transformado em  $3\beta,5\beta$ [H]-cetotriol (2,22dE) através da atividade catalítica do citocromo P450 monooxygenase (CYP306A1) (NIWA et al., 2004; WARREN et al., 2004). Em seguida o  $3\beta,5\beta$ [H]-cetotriol é convertido em 2-deoxiectidisona (2dE) pela atividade da 22-hidroxilase (CYP302A1), que por sua vez é transformado em ectidisona (E) pela ação da 2-hidroxilase (CYP315A1) (WARREN et al., 2002; GILBERT, 2004), sendo então hidroxilada no carbono 20 pela enzima 20-hidroxilase (CYP314A1) (PETRYK et al., 2003), transformando-se em 20-hidroxiectidisona (20E), a forma ativa do hormônio (HOLMWOOD & SCHINDLER, 2009). O 20-hidroxiectidisona (20E) pode se tornar inativo principalmente por meio da ação da enzima 26-hidroxilase, que realiza a hidroxilação convertendo-o em 20,26-hidroxiectidisona. Esta enzima também transforma o ectidisona (E) no

composto 26-hidroiecdisona, através de reações de hidroxilação do carbono 26 (WARREN et al., 2006).

Em algumas espécies como em *Drosophila melanogaster* e *Spodoptera littoralis*, foi verificado que a ecdisona pode ser oxidada por outra enzima, a ecdisona oxidase, que a catalisa em dehidroecdisona (TAKEUCHI et al., 2001; TAKEUCHI et al., 2005). Em *S. littoralis*, o 3-dehidroecdisona é reduzido a 3-epiecdisona (3DE) pela 3 $\alpha$ -redutase (TAKEUCHI et al., 2000) (Figura 5).



**Figura 5.** Biossíntese e metabolismo de zoeodisteróides. Insetos alimentados em dieta contendo fitoesteróis, que foram convertidos em cetodiol em seus organismos. Há possivelmente muitas etapas desconhecidas entre 7dC e

2,22,25dE. Citocromo P450s são responsáveis por uma sequência de hidroxilações de 2,22,25dE (no carbono 25); 2,22dE (no carbono 22); 2dE (no carbono 2); E (no carbono 20). As modificações estruturais são mostradas por um círculo hachurado. Adaptado (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008a).

## 2.6 MECANISMO DE AÇÃO DE 20-HIDROXIECDISONA EM INSETOS

Para que haja a ação do hormônio 20E no organismo, ele precisa se ligar ao receptor de ecdisona (EcR) e complexo ultraespiráculo (USP), que agem como um fator de transcrição que controla a sinalização em várias vias de muitos organismos. O complexo EcR-USP formado, induz a transcrição de genes primários responsáveis pela ecdise, conhecidos como genes precoces (SEGRAVES & HOGNESS, 1990; THUMMEL et al., 1990; DIBELLO et al., 1991; KOELLE et al., 1991; YAO et al., 1992; THOMAS et al., 1993; THUMMEL, 1995). O produto dos genes primários traduz e amplifica o sinal de 20E que é responsável pelo controle da expressão dos genes secundários (THUMMEL, 1996; WHITE et al., 1997; JIANG et al., 2000) que são expressos no estágio e tecidos específicos responsáveis pelo desenvolvimento do inseto. A expressão de EcR foi verificada nas células protoracicotropicas (PTTH), produzidas no cérebro de *Bombyx mori* (HOSSAIN et al., 2006).

## 2.7 APLICABILIDADE BIOTECNOLÓGICA DOS ECDISTERÓIDES

Os ecdisteróides apresentam aplicabilidade biotecnológica, agroquímica, farmacológica, medicinal e interferências sobre processos morfológicos e fisiológicos em plantas (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008a). O 20-hidroxiectdisona (20E) é o ecdisteróide mais ativo e considerado o principal agente indutor de metamorfose nos insetos (DINAN, 2001), além de ser o ecdisteróide encontrado em maior concentração em plantas e em insetos (SAVCHENKO et al., 1998; DINAN, 2001). Os fitoecdisteróides em plantas possui papel defensivo contra insetos e ataques de nematóides, ou então podem possuir uma função fisiológica no interior da planta. São encontrados em grandes quantidades em plantas (LAFONT & DINAN, 2003; BATHORI & PONCRAZ, 2005; DINAN & LAFONT, 2006), além de ser em torno de 20 vezes mais ativos em plantas do que em insetos (ZIBAREVA, 2009). Análogos a esta classe estão presentes em insetos, apresentando a função hormonal de muda em seus organismos, atuando no processo de ecdise (DINAN, 2001; VIGO, 2004). Insetos que não são adaptados ao consumir plantas que tenham em sua composição os

fitoecdisteróides podem apresentar em seu organismo graves distúrbios no seu desenvolvimento larval, redução de peso, alterações na sua ecdise e ou mortalidade. Então, este composto pode ser empregado como inseticida natural em culturas de interesse agrônômico (KLEIN, 2004) ou então o conhecimento da sua rota de biossíntese para estimular sua produção em culturas, visando o controle de insetos sem o uso de agrotóxicos, já que este composto não acarreta danos ao meio ambiente e nem intoxica mamíferos (DINAN & LAFONT, 2006; FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008).

## 2.8 RESISTÊNCIA DE INSETOS À FITOECDISTERÓIDES

Apesar de insetos e algumas espécies de plantas produzirem ecdisteróides análogos, como por exemplo, o 20-hidroxiecdisona (20E), este composto em plantas pode chegar a ser 20 vezes mais ativo e se apresentar em maior concentração do que em insetos (CAMPS et al., 1991; HARMATHA & DINAN, 1997). Como uma concentração de 20E maior do que a necessária em insetos pode levar a picos ocasionando uma ecdise precoce, levando anormalidade do crescimento e desenvolvimento, podendo chegar até a morte (CAMPS & COLL, 1993; TANAKA & TAKEDA, 1993; SAVOLAINEN et al., 1995; BLACKFORD & DINAN, 1997; MONDY et al., 1997). Porém, com a evolução, espécies de insetos podem ter adquirido tolerância ou até resistência a elevadas concentrações do composto em seu organismo. A imunodefesa dos insetos pode ser classificada como celular (incluindo a fagocitose ou encapsulação) ou humoral, na qual inclui peptídeos antimicrobianos, lisozimas e cascata de fenoloxidasas (PO) (JIRAVANICHPAISAL et al., 2006). Esta habilidade pode ser adquirida pelo desenvolvimento de mecanismos de desintoxificação através da expressão de genes que codificam enzimas com essa atividade, tais como fenoloxidasas, que oxidam grupos fenóis, citocromo P450 monoxigenase (CYP450) que liga átomos de oxigênio ou grupo hidroxila nas cadeias. Estas enzimas têm a capacidade de inativar ou converter diversos substratos (GUENGERICH, 1991; URLACHER & EIBEN, 2006).

## 2.9. BIOPROSPECÇÃO

A biodiversidade é definida como o conjunto de todos os seres vivos que vivem em um ecossistema, em que a sua importância ultrapassa o valor de matéria-prima, chegando à

relevância cultural, genética e econômica (BORÉM, 2005). No Brasil, se encontra em torno de 15 a 20% de toda a biodiversidade mundial, em que nele há 55 mil espécies de vegetais (correspondendo a 20% do total mundial) e provavelmente entre 10 e 15 milhões de insetos, em que muitas famílias ainda não foram catalogadas (LOPES et al., 2005).

A partir deste princípio, a Bioprospecção envolve a pesquisa em busca de novos materiais biológicos, baseada no estudo da biodiversidade existente em um ecossistema, podendo ter como foco novas espécies de seres vivos, compostos químicos presentes em espécies, e material genético que tenham aplicabilidade na indústria biotecnológica, com importância comercial como no ramo medicinal, farmacêutico e agrônomo (ARTUSO, 2002). O objetivo é o de se criar bancos de caracteres e funções para se ter acesso às variabilidades genéticas disponíveis ao uso do melhoramento genético e da biotecnologia. Estes acervos são constituídos por populações, genótipos contrastantes, linhas recombinantes para estudos detalhados na área da genética, fisiologia e molecular das bases biológicas de interesse do estudo (LOPES, et al., 2005).

No caso desta linha de estudo, o objetivo foi de realizar a bioprospecção de insetos que apresentem resistência ao composto 20-hidroxicidisona produzido por plantas de *P. glomerata* para a partir daí executar estudos mais detalhados quanto à identificação de genes presentes nas espécies encontradas que conferem a resistência e saber quais os mecanismos utilizados pelo organismo do inseto, caso ele tenha a capacidade de identificar tal composto.

## 2.9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando a importância de 20-hidroxicidisona (20E) na defesa de plantas contra insetos, na alteração do desenvolvimento de insetos e ainda a sua extensa aplicabilidade biotecnológica, torna-se necessário *i)* identificar insetos resistentes a 20E, *ii)* realizar a caracterização biológica destes insetos alimentados com *P. glomerata* e *iii)* analisar os efeitos de 20E nestes insetos, objetivando avaliar a sua resistência ao composto.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEL, M. M.; SEHNAL, F. Azadirachtin potentiates the action of ecdysteroid agonist RH-2485 in *Spodoptera littoralis*. **Journal of Insect Physiology**, v.46, p.267-274, 2000.
- ADLER, J. H.; GREBENOK, R. J. Biosynthesis and distribution of insect-molting hormones in plants – a review. **Lipids**, v.30, p.257–26, 1995.
- ADLER, J. H.; GREBENOK, R. J. Occurrence, biosynthesis, and putative role of ecdysteroids in plants. **Critical Reviews in Biochemical Molecular Biology**, v.34, p.253-264, 1999.
- ARNAULT, C.; SLÁMA, K. Dietary effects of phytoecdysones in the leek-moth, *Acrolepiopsis assectella* Zell. (Lepidoptera: Acrolepiidae). **Journal Chemical Ecology**, v.12, p.1979–1986, 1986.
- ARTUSO, A. Bioprospecting, Benefit Sharing, and Biotechnological Capacity Building. **World Development**, v.30, p.1355-1368, 2002.
- BAKRIN, A.; MARIA, A.; SAYAH, F.; LAFONT, R.; TAKVORIAN, N. Ecdysteroids in spinach (*Spinacia oleracea* L.): Biosynthesis, transport and regulation of levels. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.46, p.844-854, 2008.
- BATHORI, M.; PONGRACZ, Z. Phytoecdysteroids-from isolation to their effects on humans. **Curred Medicinal Chemical**, v.12, p.153-172, 2005.
- BENTES, L. B.; HIDALGO, A. F.; SILVA, J. F. Produção e crescimento de raízes de *Pfaffia glomerata* sob cultivo orgânico. **XVI Simpósio Brasileiro de Plantas Mediciniais**. AG – 033, 2000.
- BLACKFORD, M. J. P.; DINAN, L. The effects of ingested 20-hydroxyecdysone on the larvae of *Aglais urticae*, *Inachisio*, *Cynthiacardui* (Lepidoptera: Nymphalidae) and *Tyria jacobaeae* (Lepidoptera: Arctiidae). **Journal Insect Physiology**, v.43, p.315-327, 1997.
- BORÉM, A. Impacto da biotecnologia na biodiversidade. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.34, p.22-28, 2005.
- CAMPS, F. Plant ecdysteroids and their interactions with insects. In: Harborne, J. B., Thomas Barberan, F.A.(Eds.). Ecological Chemistry and Biochemistry of plant Terpenoids. **Claredon Press, Oxford**, p.331-376, 1991.

- CAMPS, F.; COLL, J. Insect allelochemicals from *Ajuga* plants. **Phytochemistry**, v.2, p.1361-1370, 1993.
- CHAITANYA, R. K.; APARNA, D. G. Light chain fibroin and P25 genes of *Corcyra cephalonica*: Molecular cloning, characterization, tissue-specific expression, synchronous developmental and 20-hydroxyecdysone regulation during the last instar larval development. **General and Comparative Endocrinology**, v.167, p.113-121, 2010.
- CHAPMAN, R. F. The insect structure and function. **New York: American Elsevier Publishing Company**, p.132-141, 1998.
- DANIEL, J. F. S.; ALVES K. Z.; JACQUES, J. D. S.; SOUZA P. V. S.; CARVALHO, M. G.; FREIRE, R. B.; FERREIRA, D. T.; FREIRE, M. F. I. Free radical scavenging activity of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). **Indian Journal Pharmacology**, v.37, p.174–178, 2005.
- DIBELLO, P. R., WITHERS, D. A., BAYER, C. A., FRISTOM, J. W., GUILD, G. M. The *Drosophila* Broad-Complex encodes a family of related proteins containing zinc finger. **Genetics**, v.129, p.385–397, 1991.
- DINAN, L. Phytoecdysteroids: biological aspects. **Phytochemistry**, v.57, p.325-339, 2001.
- DINAN, L.; LAFONT, R. Effects and applications of arthropod steroid hormones (ecdysteroids) in mammals. **Journal Endocrinology**, v.191, p.1-8, 2006.
- DINAN, L.; HARMATHA, J.; VOLODIN, V.; LAFONT, R. Phytoecdysteroids: Diversity, biosynthesis and distribution. **In G. Smagghe. Ed. Ecdysone, structures and functions**, p.3-45, 2009.
- FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; CONTIM, L. A. S.; BARBOSA, L. C. A.; STUART, J. J.; OTONI, W. C. Biosynthesis and potential functions of the ecdysteroid 20-hydroxyecdysone – a review. **Botany**, v.86, p.978-987, 2008a.
- FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; CONTIM, L. A. S.; BARBOSA, L. C. A.; STUART, J. J.; VIEIRA, R. F.; OTONI, W. C. Level and distribution of 20-hydroxyecdysone during *Pfaffia glomerata* development. **Brazil Journal Plant Physiology**, v.20, p.305–311, 2008b.
- FLORES, R.; BRONDANI JUNIOR, D.; CEZAROTTO JUNIOR V.; GIACOMELLI, S. R.; NICOLOSO, F. Micropropagation and  $\beta$ -ecdysone content of the Brazilian ginsengs *Pfaffia*

*glomerata* and *Pfaffia tuberosa*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, p.1-8, 2010.

FLORES, R.; NICOLOSO, F. T.; BRONDANI, D.; MALDANER, J.; CEZAROTTO, V.; GIACOMELLI, S. R. Extração de ecdisterona em raízes de ginseng brasileiro. **Ciência Rural**, v.39, p.1223-1226, 2009a.

FLORES, R.; NICOLOSO, F. T.; MALDANER, J.; GARLET, T. M. B. Benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ) na propagação in vitro de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Revista Brasileira de Planejamento Médico**, v.11, p.292-299, 2009b.

FRANCISCO, C.; JOSEP, C. Insect allelochemicals from *Ajuga* plants. **Phytochemistry**, v.32, p.1361–1370, 1993.

FREITAS, C. S.; BAGGIO, C. H.; SILVA-SANTOS, J. E.; RIECK L.; SANTOS, C. A. M.; JUNIOR, C. C.; MING L. C.; CORTEZ, D. A. G.; MARQUES, M. C. A. Involvement of nitric oxide in the gastroprotective effects of an aqueous extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, Amaranthaceae, in rats. **Life Science**, v.74, p.1167-1179, 2004.

GILBERT, L. I. Halloween genes encode P450 enzymes that mediate steroid hormone biosynthesis in *Drosophila melanogaster*. **Molecular Cellular Endocrinology**, v.215, p.1-10, 2004.

GOLOVATSKAYA, I. F. Effect of ecdysterone on morphological and physiological processes in plants. **Russian Journal Plant Physiology**, v.51, p.407-413, 2004.

GOODWIN, T. W. Biosynthesis of carotenoids and plant triterpenes. **Biochemistry Journal**, v.123, p.293-329, 1971.

GUENGERICH, F. P. Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes. **Journal Biology Chemical**, v.266, p.10019–10022, 1991.

HARMATHA, J.; DINAN, L. Biological activity of natural and synthetic ecdysteroid in the B<sub>H</sub> bioassay. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.35, p.219-225, 1997.

HOSSAIN, M.; SHIMIZU, S.; FUJIWARA, H.; SAKURAI, S.; IWAMI, M. EcR expression in the prothoracicotropic hormone-producing neurosecretory cells of the *Bombyx mori* brain. **FEBS Journal**, v.273, p.3861–3868, 2006.

- HOLMWOOD, G.; SCHINDLER, M. Protein structure based rational design of ecdysone agonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.17, p.4064-4070, 2009.
- HUANG, Z.; ZHOU, F. C.; XU, D.; AFZAL, M.; BASHIR, M. H.; ALI, S.; FREED, S. Antifeedant activities of secondary metabolites from *Ajuga nipponensis* against *Plutella xylostella*. **Pakistan Journal of Botany**, v.40, p.1983-1992, 2008.
- JIANG, C.; LAMBLIN, A. F. J.; STELLER, H.; THUMMEL, C. S. A. Steroid-triggered transcriptional hierarchy controls salivary gland cell death during *Drosophila* metamorphosis. **Molecular Cell**, v.5, p.445-455, 2000.
- JIRAVANICHPAISAL, P.; LEE, B. L.; SODERHALL, K. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. **Immunobiology**, v.211, p.213-236, 2006.
- KLEIN, R. Phytoecdysteroids. **Journal of the American Herbalist Guild**, v.7, p.10-20, 2004.
- KOELLE, M. R.; TALBOT, W. S.; SEGRAVES, W. A.; BENDER, M. T.; CHERBAS, P.; HOGNESS, D. S. The *Drosophila* EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. **Cell**, v.67, p.59-77, 1991.
- KOLESNIKOVA, M. D.; XIONG, Q.; LORDEIRO, S.; HUA, L.; MATSUDA, S. P. T. Lanosterol biosynthesis in plants. **Archives Biochemical and Biophysical**, v.447, p.87-95, 2006.
- KOOLMAN, J. Ecdysone: from Chemistry to Mode of Action, Thieme-Verlag, Stuttgart. **Germany**, 1989.
- KUBO, I.; KLOCKE, J. A.; ASANO, S. Insect ecdysis inhibitors from the East African medicinal plant *Ajuga remota* (Labiatae). **Agricultural, Biological and Chemical**, v.45, p.925-1927, 1981.
- KUBO, I.; KLOCKE, J. A.; ASANO, S. Effects of ingested phytoecdy-steroids on the growth and development of two lepidopterous larvae. **Journal of Insect Physiology**, v.29, p.307-316, 1983.
- KUBO, I.; KOMATSU, S.; ASAKA, Y.; DE BOER, G. Isolation and identification of apolar metabolites of ingested 20-hydroxyecdysone in frass of *Heliothis virescens* larvae. **Journal of Chemical Ecology**, v.13, p.785-794, 1987.

- LAFONT, R. Phytoecdysteroids in world flora: diversity, distribution, biosynthesis and evolution. **Russian Journal Plant Physiology**, v.45, p. 276-295, 1998.
- LAFONT, R.; DINAN, L. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update. **Journal Insect Science**, v.3, p.1-30, 2003.
- LAZZARINI, G.; LUZ, J. M. Q; MOTA, J. S.; VASCONCELLOS, M. C. Avaliação de tipos de estacas do caule para propagação de fáfia (*Pfaffia glomerata*). **Horticultura Brasileira**, v. 19, suplemento CD-Rom, 2001.
- LEAL, P. F.; KFOURI, M. B.; ALEXANDRE, F. C.; FAGUNDES, F. H. R.; PRADO, J. M.; TOYAMA, M. H.; MEIRELES, M. A. A. Brazilian Ginseng extraction via LPSE and SFE: Global yields, extraction kinetics, chemical composition and antioxidant activity. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.54, p.38-45, 2010.
- LOPES, M. A.; NASS, L. L.; MELO, I. S. Bioprospecção. **Biotecnologia ciência e Desenvolvimento**, n.34, p.29-35, 2005.
- MACHAKOVA, I.; VAGNER, M.; SLAMA, K. Comparison between the effects of 20-hydroxyecdysone and phytohormones on growth and development in plants. **European Journal of Entomology**, v.92, p.309-316, 1995.
- MAGALHÃES P. M. Agrotecnologia para el cultivo de fáfia o ginseng brasileiro. In: Martinez, J. V. (ed) Fundamentos de agrotecnología de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas. **Convênio Andrés Bello/CYTED**, p. 323– 332, 2000.
- MAKKA, T.; SEINO, A.; TOMITA, S.; FUJUWARA, H.; SONOBE, H. A possible role of 20-hydroxyecdysone in embryonic development of the silkworm *Bombyx mori*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.51, p.111-120. 2002.
- MING, L. C.; CORREA JR., C.; CHAVES, F. C. M. Influência do diâmetro e posição no ramo no pegamento de estacas caulinares de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Anais do XVII Simpósio Brasileiro de Plantas Mediciniais**. Cuiabá-MT, 2002.
- MONDY, N.; CAISSA, C.; PITOZET, N.; DELBECQUE, J. P.; CORIO-COSTET, M. F. Effects of the ingestion of *Serratula tinctoria* extracts, a plant containing phytoecdysteroids, on the development of the vineyard pest *Lobesia botrana* (Lepidoptera. Tortricidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.35, p.227-235, 1997.

MONTANARI JUNIOR, I.; MAGALHÃES, P. M.; QUEIROGA, C. L. Influence of plantation density and tenors of  $\beta$ -ecdysone in *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. **Acta Horticulturae**, v.3, n.502, p.125-128, 1999.

MONTANARI JUNIOR, I. Aspectos do cultivo de plantas medicinais nativas. **Agroecologia Hoje**, v.7, 2001.

NASCIMENTO, E. X.; MOTA, J. H.; VIEIRA, M. C.; ZARATE, N. A. H. Produção de biomassa de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Plantago major* L. em cultivo solteiro e consorciado. **Ciência e agrotecnologia**, v.31, p.3, 2007.

NELSON, D. L. Princípios de bioquímica de Lehninger. 5ª edição. Porto Alegre: Artmed, p.425, 2011.

NETO, A. G.; COSTA, J. M. L. C.; BELATI, C.; VINHOLIS, A. H. C.; POSSEBOM, L. S.; DA SILVA FILHO, A. A.; CUNHA, W. R.; CARVALHO, J. C. T.; BASTOS, J. K.; SILVA, M. L. A. Analgesic and anti-inflammatory activity of a crude root extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Journal Ethnopharmacol**, v.96, p.87-91, 2005.

NIWA, R.; MATSUDA, T.; YOSHIYAMA, T.; NAMIKI, T.; MITA, K.; FUJIMOTO, Y.; KATAOKA, H. CYP306A1, a cytochrome P450 enzyme, is essential for ecdysteroid biosynthesis in the prothoracic glands of *Bombyx* and *Drosophila*. **Journal Biology Chemistry**, v.279, p.35942-35949, 2004.

PETRICK, A.; WARREN, J. T.; MARQUES, G.; JARCHO, M. P.; GILBERT, L. I.; KAHLER, J.; PARVY, J. P.; LI, Y.; DAUPHIN-VILLEMANT, C.; O'CONNOR, M. B. Shade is the *Drosophila* P450 enzyme that mediates the hydroxylation of ecdysone to the steroid insect molting hormone 20-hydroxyecdysone. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, p.13773-13778, 2003.

POTT, A.; POTT, V. S. **Plantas do pantanal**. Corumbá: Embrapa-SPI, p.320, 1994.

RHARRABE, K.; BOUAYAD, N.; SAYAH, F. Effects of ingested 20-hydroxyecdysone on development and midgut epithelial cells of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera, Pyralidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.93, p.112-119, 2009.

RIBEIRO, P. G. F.; PEREIRA, P. F. Estudo da germinação das sementes de *Pfaffia glomerata*. **XIII Simpósio Brasileiro de Plantas Medicinais**, p. 207, 1994.

SAVCHENKO, T.; WHITING, P.; SARKER, S. D.; DINAN L. Distribution and identity of phytoecdysteroids in *Gomphrena* spp. (Amaranthaceae). **Biochemical Systematic Ecology**, v.26, p.337-346, 1998.

SAVOLAINEN, V.; WUEST, J.; LAFONT, R.; CONNAT, J. L. Effects of ingested phytoecdysteroids in the female soft tick *Ornithodoros moubata*. **Experientia**, v.51, p.596-600, 1995.

SCHMELZ, E. A.; GREBENOK, R. J.; GALBRAITH, D. W.; BOWERS, W. S. Damage-induced accumulation of phytoecdysteroids in spinach: A rapid root response involving the octadecanoic acid pathway. **Journal of Chemical Ecology**, v. 24, p.339-360, 1998.

SCHMELZ, E. A.; GREBENOK, R. J.; OHNMEISS, T. E.; BOWERS, W. S. Interactions between *Spinacia oleracea* and *Bradysia impatiens*: a role for phytoecdysteroids. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.51, p.204-221, 2002.

SEGRAVES, W. A.; HOGNESS, D. S. The E75 ecdysone-inducible gene responsible for the 75B early puff in *Drosophila* encodes two new members of the steroid receptor super family. **Genes & Development**, v.4, p.204-219, 1990.

SHIOBARA, Y.; INOUE, S.; KATO, K.; NISHIGUCHI, Y.; OISHI, Y.; NISHIMOTO, N.; OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K.; HASHIMOTO, G. A nortriterpenoid, triterpenoid and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. **Phytochemistry**, v.32, p.1527- 1530, 1993.

SUZUKI, M.; MURANAKA, T. Molecular genetics of plant sterol backbone synthesis. **Lipids**, v.42, p.47-54, 2007.

SWAI, S.; AKASHI, T.; SAKURAI, N.; SUZUKI, H.; SHIBATA, D.; AYABE, S.; AOKI, T. Plant lanosterol synthase: divergence of the sterol and triterpene biosynthetic pathways in eukaryotes. **Plant Cell Physiology**, v.47, p.673-677, 2006.

TAKEUCHI, H.; CHEN, J. H.; O'REILLY, D. R.; REES, H. H.; TURNER, P. C. Regulation of ecdysteroid signaling molecular cloning, characterization and expression of 3-dehydroecdysone 3 $\alpha$ -reductase, a novel eukaryotic member of the short-chain dehydrogenase/reductases superfamily from the cotton leaf-worm, *Spodoptera littoralis*. **Biochemical Journal**, v.349, p.239-245, 2000.

TAKEUCHI, H.; CHEN, J. H.; O'REILLY, D. R.; TURNER, P. C.; REES, H. H. Regulation of ecdysteroid signaling cloning and characterization of ecdysone oxidase: a novel steroid oxidase from the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. **Journal Biology Chemical**, v.276, p.26819-26828, 2001.

TAKEUCHI, H.; Ridgden, D. J.; EBRAHIMI, B.; TURNER, P. C.; REES, H. H. Regulation of ecdysteroid signaling during *Drosophila* development: identification, characterization and modeling of ecdysone oxidase, an enzyme involves in control of ligand concentration. **Biochemical Journal**, v.389, p.637-645, 2005.

TANAKA, Y.; TAKEDA, S. Ecdysone and 20-hydroxyecdysone supplements to the diet affect larval development in the silkworm, *Bombyx mori*, differently. **Journal of Insect Physiology**, v.20, p.805-809, 1993.

THOMAS, H. E.; STUNNENBERG, H. G.; STEWART, A. F. Heterodimerization of the *Drosophila* ecdysone receptor with retinoid X receptor and ultraspiracle. **Nature**, v.362, p.471–475, 1993.

THUMMEL, C. S.; BURTIS, K. C.; HOGNESS, D. S. Spatial and temporal patterns of E74 transcription during *Drosophila* development. **Developmental Cell**, v.61, p.101–111, 1990.

THUMMEL, C. S. From embryogenesis to metamorphosis: the regulation and function of *Drosophila* nuclear receptor superfamily members. **Cell**. v.183, p.871–877,1995.

THUMMEL, C. S. Files on steroids – *Drosophila* metamorphosis and the mechanisms of steroid hormone action. **Trends in Genetics**, v.12, p.306–310,1996.

THUMMEL, C. S. Molecular mechanisms of developmental timing in *C. elegans* and *Drosophila*. **Developmental Cell**, v.18, p.91-99, 2001.

URLACHER, V. B.; EIBEN, S. Cytochrome P450 monooxygenases: perspectives for synthetic application. **Trends in Biotechnology**, v.24, p.324-330, 2006.

VIGO, C. L. S.; NARITA, E.; MILANEZE-GUTIERRE, M. A.; MARQUES, L. C. Caracterização farmacognóstica comparativa de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Hebanthe paniculata* Martius- Amaranthaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.6, n.2, p.7-19, 2004.

WARREN, J. T.; PETRYK, A.; MARQUES, G.; JARCHO, M.; PARVY, J. P.; DAUPHIN-VILLEMANT, C.; O'CONNOR, M. B.; GILBERT, L. I. Molecular and biological characterization of two P450 enzymes in the ecdysteroidogenic pathway of *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of the National Academy of Sciences Of the United States of America**, v.99, p.11043-11048, 2002.

WARREN, J. T.; PETRYK, A.; MARQUES, G.; PARVY, J. P.; SHINODA, T.; ITOYAMA, K.; KOBAYASHI, J.; JARCHO, M., LI, Y.; O'CONNOR, M. B.; DAUPHIN-VILLEMANT, C.; GILBERT, L. I. *Phantom* encodes the 25-hydroxylase of *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*: a P450 enzyme critical in ecdysone biosynthesis. **Insect Biochemical Molecular Biology**, v.34, p.991-1010, 2004.

WARREN, J. T.; YERUSHALMI, Y.; SHIMELL, M. J.; O'CONNOR, M. B.; RESTIFO, L. L.; GILBERT, L. I. Discrete pulses of molting hormone, 20-hydroxyecdysone, during late larval development of *Drosophila melanogaster*, correlations with changes in gene activity. **Developmental Dynamics**, v.235, p.315-326, 2006.

WHITE, K. P.; HURBAN, P.; WATANABE, T.; HOGNESS, D. S. Coordination of *Drosophila* metamorphosis by two ecdysone-induced nuclear receptors. **Science**, v.276, p.114–117, 1997.

WU, P.; XIE, H.; TAO, W.; MIAO, S.; WEI, X. Phytotoecdysteroid from the rhizomes of *Brainea insignis*. **Phytochemistry**, v.71, p.975-981, 2010.

XU, D.; HUANG, Z.; CEN, Y. J.; CHEN, Y.; FREED, S.; HU, X. G. Antifeedant activities of secondary metabolites from *Ajuga nipponensis* against adult of striped flea beetles, *Phyllotreta striolata*. **Journal of Pest Science**, v.82, p.195–202, 2009.

YAO, T. P.; SEGRAVES, W. A.; ORO, A. E.; MCKEOWN, M.; EVANS, R. M. *Drosophila* ultraspiracle modulates ecdysone function via heterodimer formation. **Cell**, v.71, p.63–72, 1992.

ZIBAREVA, L. N. Phytoecdysteroids of Caryophyllaceae Juss. **Contemporary Problems of Ecology**, v.16, p.753-764, 2009.

### **3 CAPÍTULO 1: BIOPROSPECÇÃO DE INSETOS RESISTENTES AO ECDISTERÓIDE 20-HIDROXIECDISONA**

#### **3.1 INTRODUÇÃO**

Os ecdisteróides são hormônios esteróides, que são encontrados em artrópodes, mais especificamente em insetos, em poucas plantas e mais raramente em espécies de fungos, sendo denominados respectivamente como zooecdisteróides (ZEs), fitoecdisteróides (PEs) e microecdisteróides (MEs) (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008; SPLINDER et al., 2009).

Em insetos, os ecdisteróides têm um papel fundamental no crescimento e desenvolvimento, atuando no processo de muda e metamorfose através de pulsos de ecdisteróides que sinalizam ao organismo do inseto que está pronto para trocar de instar. Estes são produzidos nas glândulas protorácicas (SMITH, 1998; TIMOFEEV, 2009).

Alguns ecdisteróides são encontrados tanto em plantas como em insetos, dentre eles o 20-hidroxiecdisona, que é uma forma ativa do hormônio derivada do ecdisona, responsável por atuar no desenvolvimento dos insetos, como na embriogênese, muda dos instares na fase larval e metamorfose por meio de pulsos específicos sinalizando que o organismo do inseto está preparado para a muda (MAKKA et al., 2002; GOODMAN & GRANGER, 2005; KANEKO et al., 2011).

Pulsos inespecíficos de 20-hidroxiecdisona (20E) durante o período de imaturidade do inseto podem ter sérias consequências para seu desenvolvimento. Quando esses pulsos ocorrem sem o acúmulo adequado de energia e desenvolvimento necessário para a transição entre instares, o inseto pode enfrentar uma série de problemas, como distúrbios no desenvolvimento, levando a desajustes no crescimento; inibição do crescimento afetando o tamanho final do inseto; anomalias morfológicas, comprometendo a funcionalidade do inseto; deterrência, levando-o a comportamentos alterados, dificultando a alimentação ou a reprodução; e o risco de morte (FRANCISCO & JOSEP, 1993; HUANG et al., 2008; RHARRABE et al., 2009; WU et al., 2010).

Em mamíferos, inclusive em humanos, há evidências que o 20E possui propriedades medicinais e farmacológicas dentre elas ação energética e regeneração de tecidos através da proliferação de células somáticas, porém eles não são capazes de sintetizar este ecdisteróide (SLAMA & LAFONT, 1995; DINAN, 2001; LAFONT & DINAN, 2003; BATHORI & PONGRACZ, 2005; DINAN & LAFONT, 2006).

O 20E pode ser encontrado em várias espécies de vegetais, como em *P. glomerata*, conhecida popularmente como ginseng brasileiro pertence à família Amaranthaceae, sendo encontrada na América do Sul (SHIOBARA et al., 1993; FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008). Recentemente, foi determinado que 20E está presente em flores, folhas, caules e raízes de *P. glomerata*, sendo predominantemente acumulado em raízes (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008b). Em plantas, 20E é considerado um metabólito secundário, podendo agir como composto fitohormonal, na defesa contra insetos fitófagos não adaptados e no crescimento e proliferação celular (MACHACKOVA et al., 1995; LAFONT, 1997; DINAN, 1998; GOLOVATSKAYA, 2004).

Altas concentrações de fitoecdisteróides estimulam a muda anormal em vários insetos, podendo levá-los à morte e como o 20E não causa toxidez nos humanos, acredita-se que pode ser utilizado como forma de proteção contra predadores herbívoros em culturas de importância comercial alimentícia, conseqüentemente diminuindo o uso de inseticidas químicos (DINAN, 1998; DINAN, 2001; GOLOVATSKAYA, 2004, FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008).

Como as espécies durante a evolução se adaptam as condições adversas, acredita-se que os insetos desenvolveram mecanismos de defesa que lhe condicionam tolerância ou resistência a compostos tóxicos ao seu organismo, podendo apresentar anomalias morfológicas, ou em alguns casos, apresentar desenvolvimento normal, dependendo da concentração de 20E inserido em dieta. Diversos estudos têm observado o crescimento e desenvolvimento de espécies de insetos alimentados com dieta à base de 20E, como em *Plodia interpunctella*, *Corcyra cephalonyca* e *Bombix mori*, no qual foi verificado morfologia da pupa e inseto adulto anormal (RHARRABE et al., 2009; TIAN et al., 2010; CHAYNTANIA et al., 2010), porém em outros ensaios foram adicionados em dieta de *Bombyx mori*, conhecido como bicho da seda, em que houve o desenvolvimento e crescimento normal, com ocorrência de um instar a mais, apresentando neste caso um aspecto favorável já que permanecendo maior tempo no estado larval há maior produção de seda.

Considerando que 20E está presente em flores, folhas, caules e raízes de *P. glomerata* (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008b) e a biodiversidade presente na floresta Amazônica, o presente trabalho teve como objetivo realizar a bioprospecção e caracterização biológica de insetos resistentes a 20E.

### 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Local de execução dos experimentos

Os experimentos foram executados no Laboratório de Físico-Química e em casa de vegetação, localizado no Centro de Tecnologia Agropecuária (CTA) da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA). As análises foram realizadas no Laboratório de Entomologia de Controle Biológico, na Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA). As fotos foram obtidas no Laboratório de Fitopatologia e Entomologia da Embrapa Amazônia Oriental.

### 3.2.2 Produção das mudas de *P. glomerata* para alimentação dos insetos

Foram propagadas mudas de *Pfaffia glomerata* a partir de clones de três meses de idade escolhidos aleatoriamente plantados em recipientes plásticos de dois litros com um substrato contendo: solo: areia: esterco (4:1:1). Em cada recipiente foram adicionados antes do transplante, macronutrientes: [N (6,40 g), P (9,78 g), K (5,31 g), Ca (6,41 g), Mg (1,15 g), Fe (0,07 g)] e micronutrientes: [B (14,44 mg), Mn (73,19 mg), Zn (26,08 mg), Mo (1,32 mg), Cu (0,08 mg), Co (0,08 mg)], de acordo com a necessidade da espécie. As plantas foram irrigadas diariamente e acondicionadas por três meses em casa de vegetação.

### 3.2.3 Coleta e criação dos insetos

Plantas iscas de *P. glomerata* foram colocadas em vários locais próximos a áreas de mata por 06 meses para a coleta de insetos que estivessem se alimentando desta planta em sua fase larval (lagartas). Os insetos coletados foram levados ao laboratório para concluírem seu ciclo de vida, sendo alimentados diariamente exclusivamente com folhas da referida planta. As larvas foram mantidas em um fotoperíodo de 8 horas diárias, temperatura a 27 °C. Os insetos que concluíram seu desenvolvimento e geraram descendentes férteis durante três gerações foram considerados como resistentes ao composto 20-hidroxiecdisona. A partir da terceira geração os insetos começaram a serem utilizados nos experimentos.

### 3.2.4 Identificação dos insetos

A identificação dos insetos foi realizada na Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) pela Professora e Doutora em Entomologia Telma Batista. As características observadas foram as que distinguem a família e, em segundo, as características observadas nas asas que são peculiares desta espécie: apresentam três estrias escuras nas asas anteriores e duas nas asas posteriores dispostas longitudinalmente e paralelas entre si.

### 3.2.5 Obtenção da população massal dos insetos

Para se obter uma população massal dos insetos, mariposas (fase adulta) foram colocadas dentro de gaiola de reprodução ao ar livre para simular o ambiente natural. A alimentação foi baseada em solução de mel a 20%, embebida em algodão dentro de copos plásticos de café. Mudas de *P. glomerata* foram colocadas dentro da gaiola para que os insetos pudessem fazer a ovoposição. As folhas que continham ovos foram levadas para o laboratório para que as larvas pudessem concluir o ciclo vital, sendo alimentadas somente com folhas de *Pfaffia*. Para a geração de população massal foi necessário em torno de 3 a 5 gerações.

Os ovos foram acondicionados em placas de *Petri* higienizadas com álcool, com a eclosão das lagartas de 1º instar, estas foram separadas em gerbox também higienizado com álcool, sendo colocadas 10 lagartas em cada recipiente para o melhor controle do experimento.

### 3.2.6 Avaliações realizadas

#### Biologia do inseto

Para a análise da biologia do inseto, primeiramente houve a sincronização dos instares através do monitoramento de quatro em quatro horas da ovoposição da geração que foi avaliada, ou seja, foram retirados os ovos depositados durante esse intervalo de tempo a fim de obter um maior controle e observar o tempo médio que insetos de mesma idade levaram para trocar de instar. Após a sincronização foram escolhidas 30 lagartas (n=30) aleatoriamente para a avaliação dos seguintes caracteres:

#### Ovoposição

Foram colocados 9 casais de insetos adultos em gaiola de reprodução no mesmo dia em que houve a sua emergência de pupa para adultos. Foi contabilizado o número de ovos colocados diariamente pelas fêmeas e os dados apresentados são a média aritmética de ovoposição diária pelo número de fêmeas contidas na gaiola.

#### Ovos

Foi realizada a mensuração do diâmetro anterior, médio e inferior de 30 ovos com a utilização de um paquímetro. Também foram analisadas a disposição dos ovos sobre a folha (isolados ou em conjunto), e o período médio de eclosão das lagartas a partir do ovo.

#### Número de instares

O número de instares e seu tempo de permanência (dias) em cada instar foi observado durante o ciclo de vida dos insetos alimentados com a planta produtora de 20-hidroxicdisona.

#### Cápsula Cefálica

Foram mensurados o comprimento e largura com o uso de um paquímetro. Já o peso médio das cápsulas cefálicas liberadas em cada mudança de instar pelas lagartas foram obtidos através de balança de precisão, sendo que foram necessárias um valor de  $n > 30$  para atingir dado quantitativo na balança de alta precisão.

#### Crescimento das lagartas

Foi verificado o crescimento das lagartas através da mensuração do comprimento e largura do tórax e abdômen em cada instar larval, os dados foram obtidos com o uso de paquímetro.

## Peso

Foi quantificado o peso em cada instar larval, pré-pupa, pupa e cápsula cefálica através de balança de alta precisão cedida pelo Laboratório de microbiologia da UFRA.

## Tamanho dos insetos adultos

Machos e fêmeas foram avaliados, mensurando o tamanho da envergadura, comprimento e largura das asas anteriores e inferiores até o ponto de inserção das asas, do corpo à altura do tórax, no mesmo ponto de inserção das asas anteriores da mariposa e comprimento das antenas utilizando um paquímetro como ferramenta.

## Longevidade

Foi verificado o tempo de permanência das lagartas (insetos na fase imatura) em cada instar, e em insetos adultos de ambos os sexos contados desde o dia da emergência da mariposa até a morte.

## Digestibilidade

A digestibilidade dos insetos durante a sua fase larval foi avaliada através da razão do peso foliar ingerido pelo peso do excremento das lagartas (digestibilidade =  $((\text{peso ingerido} - \text{peso excretado}) / \text{peso ingerido}) \times 100$ ). O peso ingerido pelas lagartas desta espécie em 24 horas é em torno de 22% do peso total. Para a coleta do peso foi utilizada balança de precisão.

A área foliar consumida por lagarta foi encontrada pela razão das folhas inteiras e as sobras de folhas após 24 horas de consumo, a obtenção dos dados foi através de desenho no contorno do limbo foliar em papel milimetrado, digitalizado e a verificação de área foliar remanescente foi quantificada pelo Programa Foxit Reader (PDF).

O Peso consumido foi quantificado da seguinte forma:  $\text{Peso consumido} = \text{Peso foliar das folhas inteiras} - \text{Peso das folhas restantes pós consumo} - \text{perda de peso por desidratação}$  (BOARETO & BRANDÃO, 2000).

## Fotos dos instares das lagartas, pupas e adultos

As fotos de lagartas e pupas foram obtidas em lupa com câmera fotográfica acoplada, e foram selecionadas três lagartas, duas pupas e dois adultos de sexos diferentes para serem fotografados diariamente.

## Sexagem

A identificação do sexo dos insetos em fase de pupa foi realizada no Laboratório de Entomologia da Embrapa Amazônia Oriental. As pupas foram separadas de acordo com o sexo para observar a emergência para a fase adulta e identificar a ocorrência de dimorfismo sexual. Os insetos tiveram a sua fase de reprodução avaliada, e o comportamento observado foi confirmado através de estudo anterior com esta espécie por Cruz & Castillo (1989), que relataram ocorrência de dimorfismo.

### 3.2.7 Análise Estatística

O programa estatístico utilizado foi o ASSISTAT 7.5 Beta, realizando o Teste “t” a 5% de significância e o desvio padrão, em caracteres avaliados em função do dimorfismo sexual do inseto a partir da fase de pupa, a partir de 15 indivíduos de cada sexo, totalizando em 30 indivíduos (n=30). Já em caracteres avaliados durante a fase imatura de lagarta sem a diferenciação sexual, utilizou-se apenas a média e o desvio padrão dos dados obtidos de 30 lagartas.

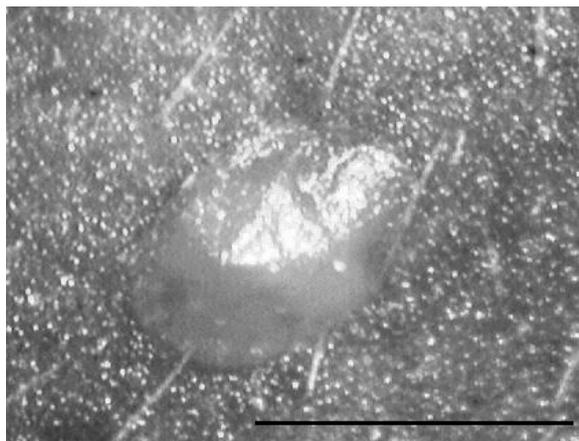
## **3.3 RESULTADOS**

### 3.3.1 Identificação do inseto

Neste trabalho foi identificada a espécie *Omiodes indicata* (FABRICIUS, 1775) (Lepidoptera:Pyralidae) apresentando resistência ao 20-hidroxicidisona (20E). É considerada uma praga secundária de ampla distribuição geográfica, havendo relatos de sua ocorrência no Paraná, Maranhão, Roraima e Goiás, tendo como plantas hospedeiras culturas comerciais como a soja e o feijoeiro, ocorrendo no final do ciclo da cultura da soja quando a desfolha não é importante (HOFFMAN-CAMPO et al., 2000; RATTES et al., 2008), já em plantas de feijoeiro comum tem gerado danos consideráveis devido à desfolha total da planta no estado de São Paulo (QUINTELLA & BARRIGOSI, 2005).

### 3.3.2 Ovos

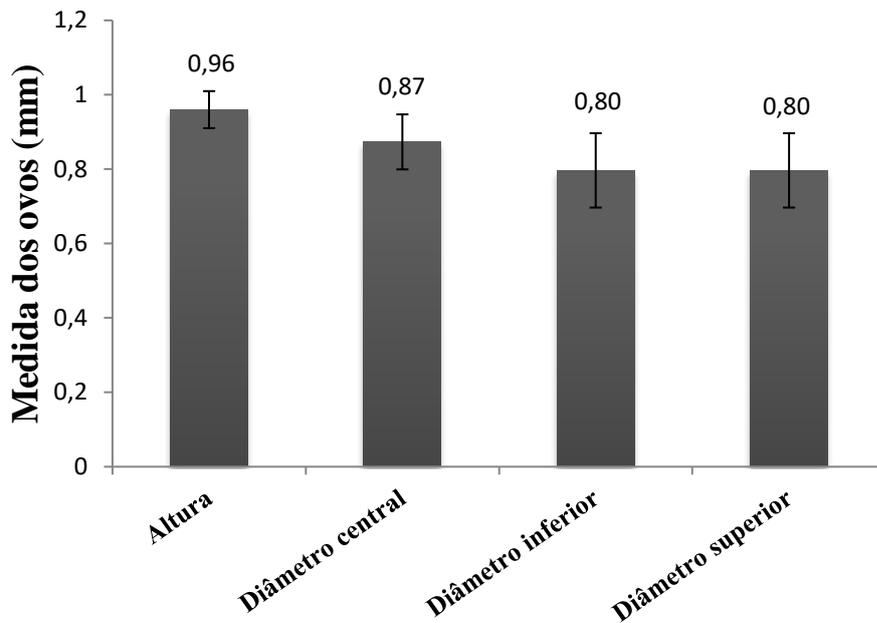
Os ovos caracterizam a fase embrionária dos insetos, em que há a formação de lagartas de primeiro instar. Os ovos da espécie *Omiodes indicata* são do tipo globular (Figura 1), ovopositados individualmente ou em grupos de ovos. Inicialmente, quando recém postos, os ovos apresentam a coloração branca se tornando amarelados próximo à eclosão, sendo possível até visualizar o embrião (lagarta) já formado dentro do ovo. Os ovos levam em média de dois a três dias para eclodirem, variando em tempo máximo de um a quatro dias. Após este período os ovos que não eclodiram são considerados estéreis, adquirindo o aspecto ressecado e murchos, aparentando ser apenas uma película fina sobre a superfície foliar.



**Figura 1.** Ovo de *O. indicata*. Foto obtida no laboratório de Entomologia da Embrapa Amazônia Oriental. A barra corresponde a 1mm de comprimento.

#### 3.3.2.1 Tamanho médio dos ovos

Os ovos apresentaram altura média de 0,96mm ( $\pm 0,05$ ), diâmetro central de 0,87mm ( $\pm 0,07$ ); os diâmetros inferior e superior possuem o mesmo valor de 0,80mm ( $\pm 0,01$ ), confirmando dessa forma que os ovos são do tipo globular devido apresentarem valores de medidas aproximados.



**Figura 2.** Médias para altura, diâmetro central, diâmetro inferior e diâmetro superior de ovos de *O. indicata* (N=30) alimentadas com *P. glomerata*.

### 3.3.2.2 Ovoposição

As mariposas começam a ovopositar um dia após a sua emergência, começando com baixa produção de ovos (12 ovos totais; 1,33 ovos/fêmea), e os ovos depositados no primeiro dia apresentaram-se inviáveis ([Tabela 1](#)). Ao longo dos dias houve o aumento da postura de ovos e a fecundação destes foram constatadas através da eclosão das larvas.

O pico máximo de postura foi observado ao quarto dia (227 ovos; com média de 25,22 ovos/fêmea), havendo destes 98,23% de ovos viáveis/fecundados. Do quinto dia em diante houve o decréscimo gradual na ovoposição e eclosão. Do décimo quarto ao décimo sexto dia foi observado somente a produção de um ovo diário, todos sem viabilidade. Após o 16º dia foi finalizado o período de reprodução dos insetos.

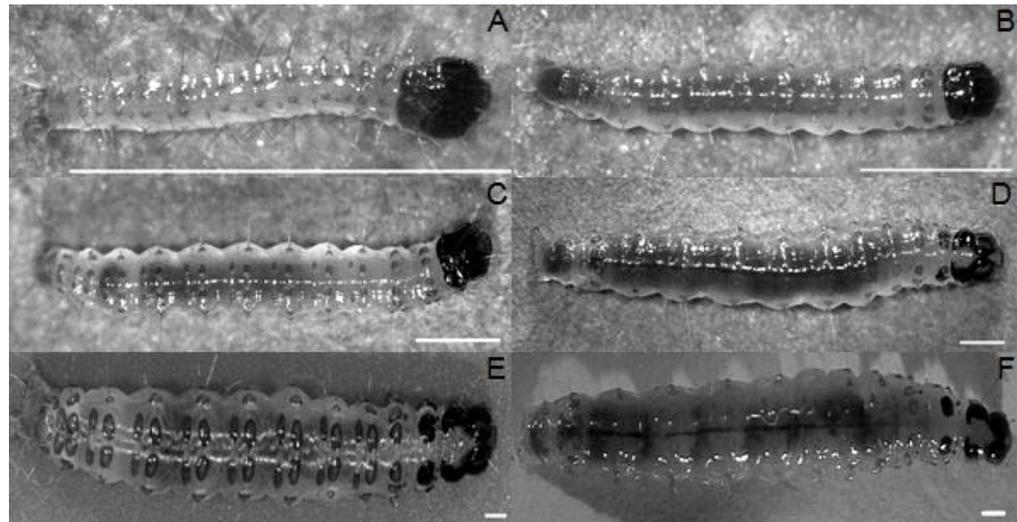
**Tabela 1.** Ovoposição de mariposas de *O. indicata* em ambiente natural, alimentadas com solução de mel a 5%. Foram utilizados 9 casais de adultos simultaneamente e utilizado o teste de média simples para a obtenção de ovoposição por cada fêmea.

<b>Dia</b>	<b>Média de ovos/fêmea</b>	<b>Ovos totais</b>	<b>Ovos eclodidos</b>	<b>Ovos viáveis (%)</b>	<b>Ovos inviáveis (%)</b>
1	1,33	12	0	0	100
2	0,22	118	107	90,68	9,32
3	0,33	163	159	97,54	2,46
4	25,22	227	223	98,23	1,77
5	23,22	209	198	94,74	5,26
6	13,78	124	115	92,74	7,26
7	16,44	148	143	96,62	3,38
8	11,11	100	83	83	17,00
9	8,67	78	71	91,03	8,97
10	3,44	31	28	90,32	9,68
11	3,33	30	27	90	10,00
12	1,00	9	5	55,56	54,56
13	0,22	2	0	0	100,00
14	0,11	1	0	0	100,00
15	0,11	1	0	0	100,00
16	0,11	1	0	0	100,00

### 3.3.3 Lagartas

As lagartas de *O. indicata* alimentadas com folhas de *P. glomerata* apresentaram seis instares durante a fase de desenvolvimento (Figura 3), enquanto em experimento realizado por Cruz & Castillo (1989) com lagartas da mesma espécie alimentadas com folhas de soja, relatou o desenvolvimento de cinco instares em seu estágio larval.

O aparelho bucal é do tipo metagnato, com características de mastigador na fase imatura e sugador labial durante a fase adulta do inseto; e classificado como hipognata, devido a direção das peças bucais serem direcionadas para baixo e a cabeça se direciona no ângulo vertical, formando o ângulo de 90° (GALLO et al., 2002).



**Figura 3.** Lagartas de *O. indicata*. **A:** primeiro instar; **B:** segundo instar; **C:** terceiro instar; **D:** quarto instar; **E:** quinto instar e **F:** sexto instar alimentadas com folhas de *P.glomerata*. As barras representam 1 mm de comprimento.

### 3.3.3.1 Descrição

**Primeiro instar.** As lagartas são transparentes, apresentaram cabeça preta e cerdas partindo de tubérculos de cor marrom alinhados longitudinalmente. Há a presença de pernas, mais precisamente oito pares, sendo três pares presentes no tórax, quatro pares de pernas abdominais e um par de pernas anais, todos esbranquiçados da mesma cor do corpo. São pouco ativas neste instar e alimentam-se através de raspagem a superfície foliar (Figura 3A).

**Segundo instar.** As lagartas são brancas tendendo para o transparente, sendo possível observar a folha ingerida ao longo de seu aparelho digestivo, aparentando então que seu corpo é esverdeado, também há a presença de cerdas dispostas longitudinalmente. Neste instar sua alimentação ainda continua por raspagem foliar e começa a produzir teias que são utilizadas para enrolar a folha, ou então unir duas folhas, envolvendo o corpo e passa o restante do desenvolvimento larval envolvida no cartucho formado em meio aos seus excrementos depositados. Posteriormente, passa a se alimentar dessa folha enrolada (Figura 3B).

**Terceiro instar.** As lagartas apresentam cerdas ao longo do corpo, porém mais espaçadas umas das outras e menores comparadas ao primeiro instar. A alimentação é mais intensa em relação ao segundo instar, ingerindo maior área da superfície foliar através da

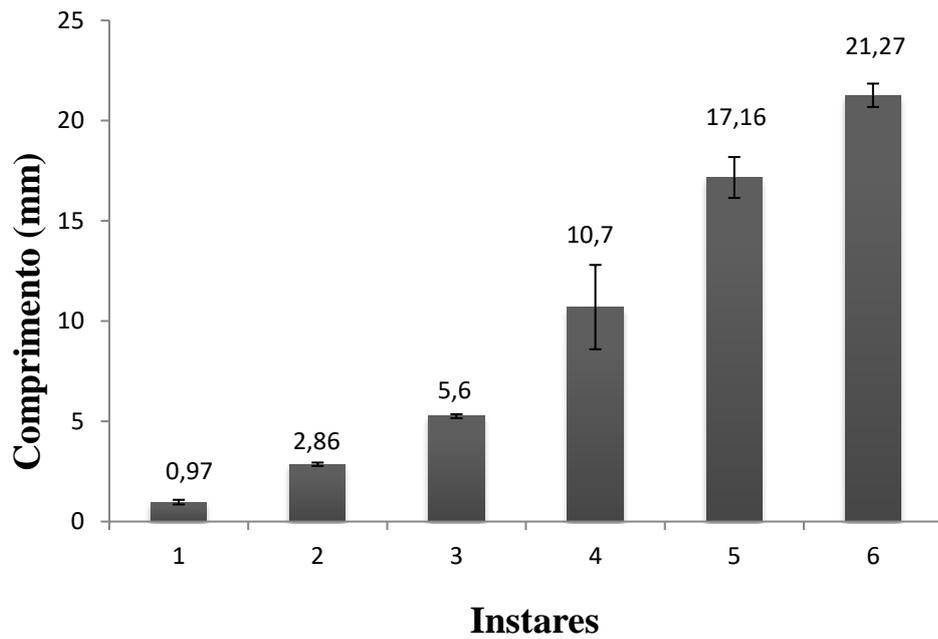
raspagem. Sua atividade se torna mais ativa, ingerindo mais rapidamente as folhas e se movimenta mais em busca de outras folhas para se enrolar e se alimentar (Figura 3C).

**Quarto instar e quinto instar.** Nestes instares as lagartas passam a se alimentar com maior intensidade e a sua atividade torna-se mais ativa, se movimentando mais ao longo das folhas da planta, já que logo se enrolam nelas através da teia que produzem e logo se alimentam dessa folha enrolada, passando para outra. Também a preferência nesta fase é pelas folhas mais velhas, que são maiores e encontram-se mais próximas à base da planta. Conclui-se que o movimento das lagartas é das folhas mais novas (no ápice da planta) para as folhas mais velhas (mais próximo ao solo) (Figura 3D e 3E).

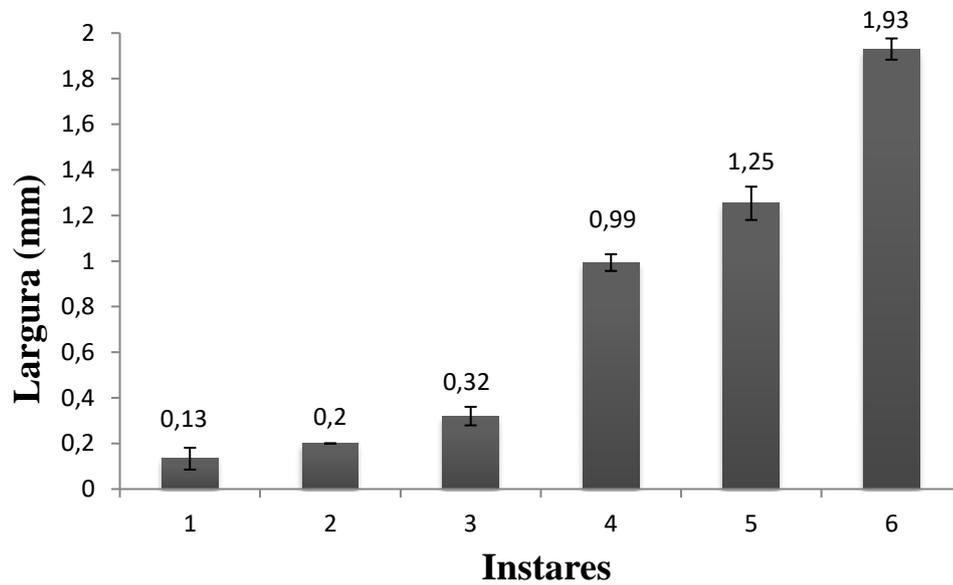
**Sexto instar.** Os tubérculos de onde partem as cerdas se tornam mais visíveis, podendo ser observados sem a utilização de lupa, apresentando uma cor variando do marrom para o preto. Ao se aproximar da fase de pré-pupa a ingestão de alimento é cessada e a movimentação da lagarta vai diminuindo. A lagarta forma uma proteção com a produção de teia envolta do corpo ou então enrola-se na folha, sua cor vai mudando de esbranquiçada onde é possível ver o alimento ingerido ao longo do corpo, para branco leitoso tendendo para amarelo (Figura 3F).

### 3.3.3.2 Crescimento

O crescimento das lagartas foi avaliado em cada instar larval, e os valores médios de comprimento corporal (Figura 4) e largura torácica (Figura 5), respectivamente, foram de 0,97mm ( $\pm 0,1$ ) e 0,13mm ( $\pm 0,05$ ) para o primeiro instar; no segundo instar foram de 2,86mm ( $\pm 0,08$ ) e 0,2mm ( $\pm 0,00$ ); terceiro instar foram de 5,6mm ( $\pm 0,1$ ) e 0,32mm ( $\pm 0,04$ ); para o quarto instar os valores encontrados foram de 10,7mm ( $\pm 2,1$ ) e 0,99mm ( $\pm 0,04$ ). Para o quinto instar larval os valores foram de 17,16mm ( $\pm 1,02$ ) e 1,25mm ( $\pm 0,07$ ) e para o sexto instar foram de 21,27mm ( $\pm 0,58$ ) e 1,93mm ( $\pm 0,05$ ).



**Figura 4.** Comprimento corporal, em milímetros, de lagartas do primeiro ao sexto instar de *O. indicata*.

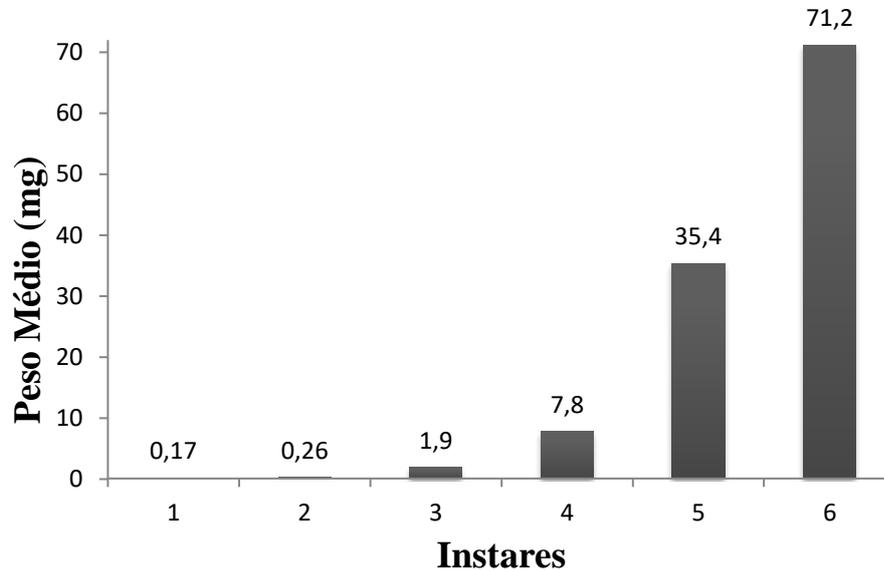


**Figura 5.** Largura torácica, em milímetros, de lagartas do primeiro ao sexto instar de *O. indicata*.

### 3.3.3.3 Peso

Para a mensuração do peso, foram utilizadas 30 lagartas do 1º ao 3º instar e 20 lagartas do 4º ao 6º instar. O peso médio das lagartas em cada fase larval foi de 0,17mg para o primeiro

instar; 0,26mg para o segundo instar; 1,90mg nas de terceiro instar; 7,8mg para o quarto instar; quinto e sexto instar foram de 35,4mg e 71,2mg, respectivamente (Figura 6).



**Figura 6.** Peso médio das lagartas de *O. indicata* em cada instar da fase imatura alimentadas a base de *P. glomerata*. N=30 lagartas.

#### 3.3.3.4 Digestibilidade

A digestibilidade variou de 88,56 % a 98,80%, durante o quinto e sexto instar, respectivamente, significando que as lagartas possuem alta taxa de digestibilidade ao se alimentar de folhas de *P. glomerata*, havendo conseqüentemente um alto acúmulo de energia utilizado durante o processo de muda de instar, e afetando diretamente no peso e crescimento da lagarta (Tabela 2). A menor área e peso foliar consumidos ocorreram durante o primeiro instar (54,79mm<sup>2</sup> e 6,29mg), porém neste instar foi observada a terceira maior digestibilidade (96,09%). A maior área e peso foliar ingeridos foi durante o sexto instar larval (1726,93 mm<sup>2</sup> e 155,60mg), havendo também maior digestibilidade (98,80%) dentre os instares avaliados.

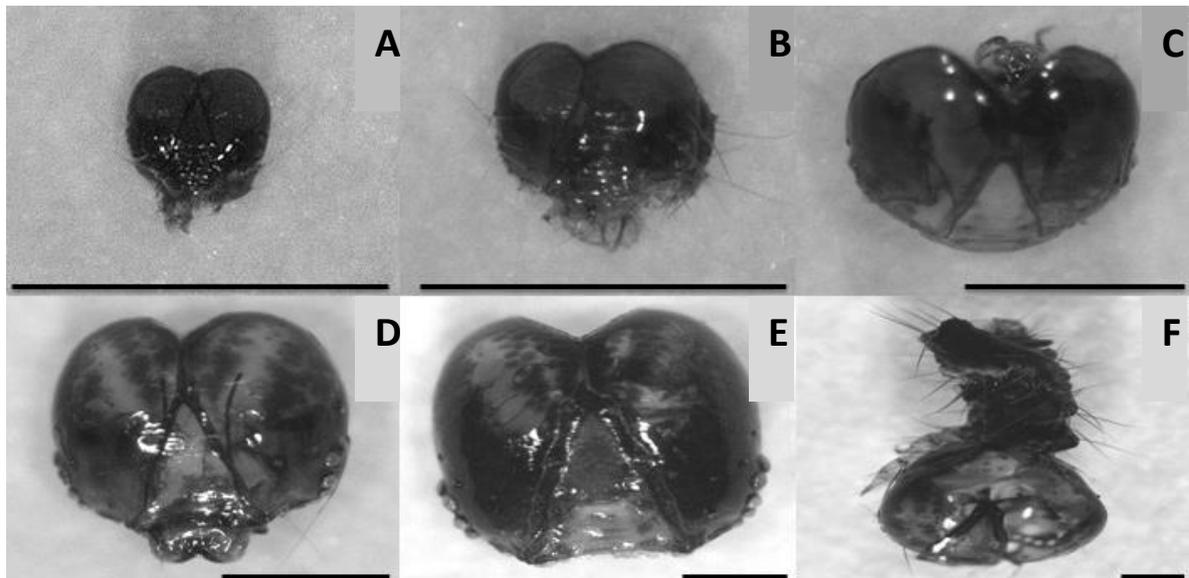
**Tabela 2.** Área e Peso Foliar diário e Digestibilidade em Lagartas de *O. indicata*. N=30 lagartas.

Instar	Área Foliar consumida (mm <sup>2</sup> )	Peso Foliar Consumido (mg)	Peso Excretado (mg)	Digestibilidade (%)
1º	54,79	6,39	0,25	96,09
2º	191,26	20,43	0,40	98,04
3º	719,30	55,74	3,15	94,35
4º	1066,71	84,15	5,60	93,35
5º	369,52	100,85	11,53	88,56
6º	1726,93	155,60	1,87	98,80

### 3.3.3.5 Cápsula cefálica

As cápsulas cefálicas da espécie *O. indicata* apresentam a forma semelhante de um coração invertido, coloração preta, presença de cerdas na parte lateral de coloração preta, sendo mais evidentes nas cápsulas de primeiro e segundo instar, ficando mais espaçadas uma das outras e menos evidentes a partir do terceiro instar, devido o crescimento da lagarta. As cápsulas do primeiro ao sexto instar são apresentadas na [Figura 7](#).

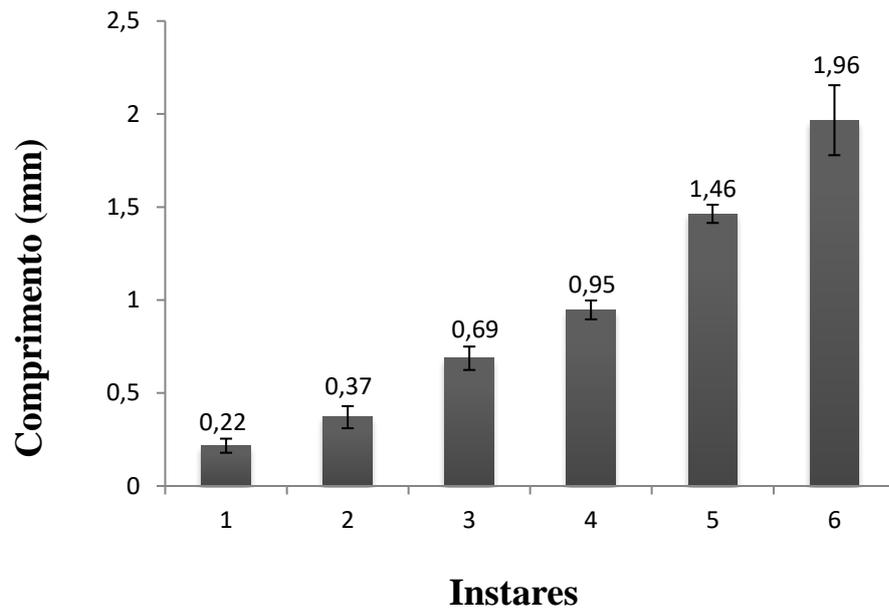
As cápsulas possuem sutura epicranial que vai se tornando mais evidente com o desenvolvimento dos instares, dividindo superiormente a cápsula cefálica em duas regiões.



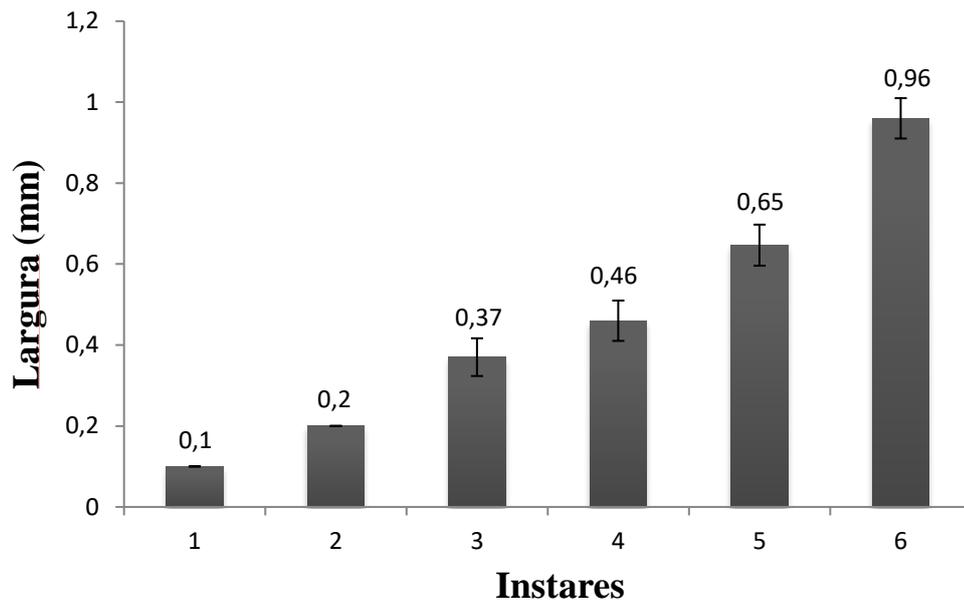
**Figura 7.** Cápsulas cefálicas dos seis instares de *Omiodes indicata*. (A) primeiro instar, (B) segundo instar, (C) terceiro instar, (D) quarto instar, (E) quinto instar, e (F) sexto instar. As barras representam 0,5mm de comprimento.

### 3.3.3.6 Tamanho da cápsula cefálica

As cápsulas cefálicas refletem o crescimento das lagartas de acordo com o desenvolvimento da fase imatura (de lagarta), pois pode-se inferir o crescimento da cabeça, do cérebro e corporal (Figuras 8 e 9). Foram avaliados o crescimento das cápsulas cefálicas em cada um dos instares tomando como base a mensuração do comprimento e largura das cápsulas, utilizando para coleta de dados trinta cápsulas que foram excretadas pelas lagartas no recipiente ao mudar de instar. Os comprimentos e larguras encontrados, respectivamente, no primeiro instar foi de 0,22mm ( $\pm 0,04$ ) e 0,1mm ( $\pm 0,00$ ); no segundo instar foi de 0,37mm ( $\pm 0,06$ ) e 0,2mm ( $\pm 0,00$ ); terceiro instar de 0,69mm ( $\pm 0,06$ ) e 0,37mm ( $\pm 0,05$ ); quarto instar de 0,95mm ( $\pm 0,05$ ) e 0,46mm ( $\pm 0,05$ ); quinto instar de 1,46mm ( $\pm 0,05$ ) e 0,65mm ( $\pm 0,05$ ); sexto instar de 1,96mm ( $\pm 0,19$ ) e 0,96mm ( $\pm 0,05$ ).



**Figura 8.** Comprimento médio da cápsula cefálica de lagartas do primeiro ao sexto instar alimentadas à base de folhas de *P. glomerata*.



**Figura 9.** Largura média da cápsula céfálica de lagartas do primeiro ao sexto instar alimentadas à base de folhas de *P. glomerata*. Foram utilizadas n=30 cápsulas céfálicas.

### 3.3.3.7 Mortalidade

O maior índice de mortalidade ocorreu no primeiro e quinto instar apresentando a morte de quatro lagartas o que corresponde à 13,33% de mortalidade (Tabela 3). Em seguida, houve incidência de mortalidade durante o sexto instar com a morte de duas lagartas correspondendo a 6,66% de mortalidade. Durante o período de segundo e quarto instar não foi verificado a mortalidade de lagartas.

**Tabela 3.** Taxa de mortalidade de lagartas de *O. indicata* alimentadas com *P. glomerata*.

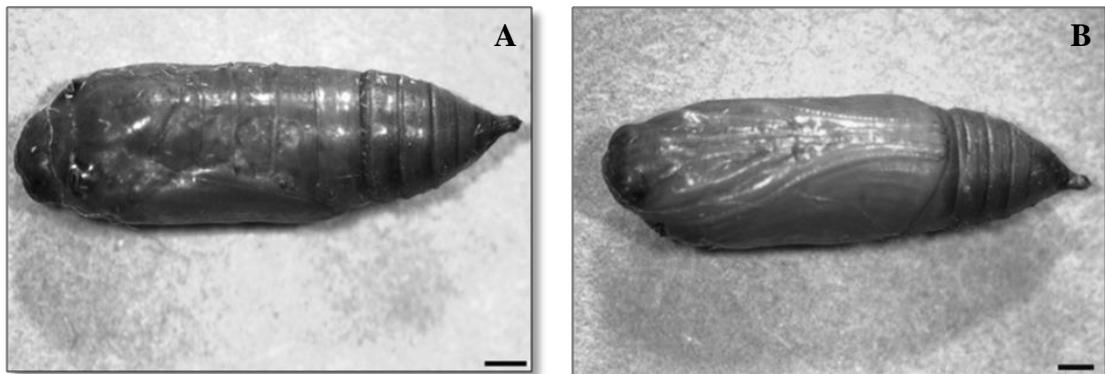
Instar	Lagartas mortas	Mortalidade (%)
1°	4	13,33
2°	0	0
3°	0	0
4°	0	0
5°	4	13,33
6°	2	6,66

n= 30 lagartas.

### 3.3.4 Pupa

A fase de pupa é a fase intermediária que o inseto passa da fase imatura de lagarta para a fase adulta, aparentando dormência (GALLO, 2002). É durante o período de pupa que ocorre uma série de processos bioquímicos e transformações morfológicas para que ele sofra a metamorfose, emergindo o adulto morfológicamente diferente da fase imatura, obtendo a capacidade de voar.

As pupas de *O. indicata* são do tipo obtecta e nua, não sendo possível a observação dos apêndices devido estarem bem aderidos ao corpo, e a pupa não estar protegida ou envolvida por casulo. Apresentam a coloração amarela clara quando se torna pupa recentemente, e o corpo mole por não ter iniciado o processo de esclerotização. Pode ser encontrada no solo ou então fixada em folhas por fios (cremaster) na extremidade inferior produzida pela lagarta antes de iniciar o processo de pupação (GALLO, 2002) (Figura 10).



**Figura 10.** Vista dorsal (A) e ventral (B) de pupa de *O.indicata* alimentadas com folhas de *P.glomerata*. As barras correspondem à 1mm.

Rapidamente, em torno de duas horas, ela se torna totalmente esclerotizada, apresentando a cor marrom, podendo variar do claro ao escuro, sendo que o corpo esclerotizado se torna enrijecido devido a produção de quitina, (Figura 10).

#### 3.3.4.1 Sexagem

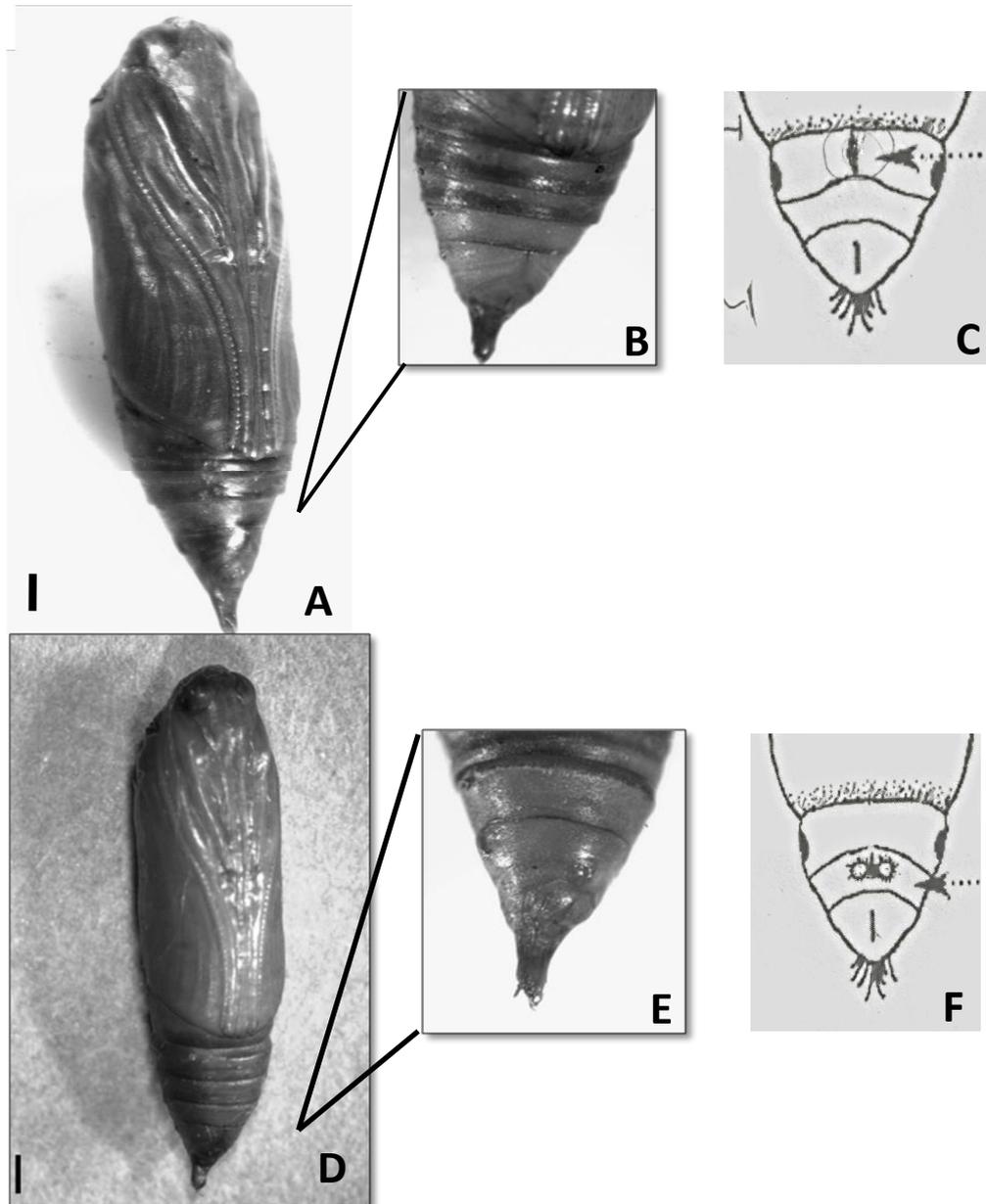
A diferenciação do sexo masculino e feminino dos insetos desta espécie somente é possível a partir da fase de pupa. A diferença é caracterizada pela posição que a genitália do

inseto está, ou seja em que segmento ela se encontra, nas pupas fêmeas a cavidade da genitália está presente no segundo segmento após o ânus (Figura 11A, 11B e 11C) enquanto que em pupas machos a genitália está logo no segmento seguinte após o ânus, ou seja, nos machos está mais próximo ao ânus quando comparado à da fêmea (Figura 11D, 11E e 11F).

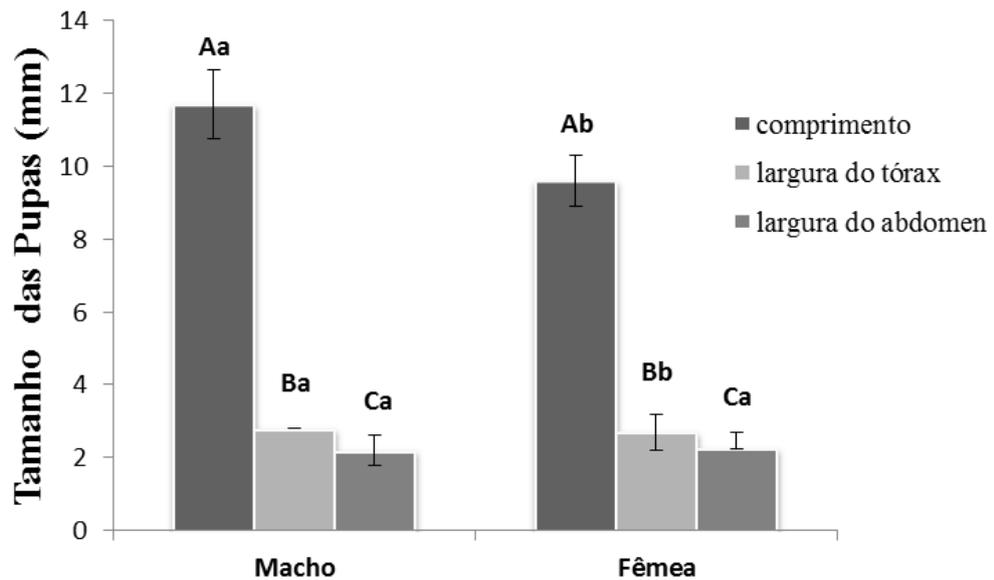
#### 3.3.4.2 Tamanho da pupa

As pupas de sexo masculino apresentaram um maior comprimento (11,7mm;  $\pm 0,95$ ) do que as pupas do sexo feminino (9,6mm;  $\pm 0,70$ ) (Figura 12). Porém, as pupas femininas apresentaram largura abdominal maior (2,25;  $\pm 0,00$ ) do que as masculinas (2,2;  $\pm 0,42$ ). Já em relação à largura torácica, não houve diferença significativa (Figura 12).

A largura abdominal no sexo feminino é mais desenvolvida, devido o seu aparelho reprodutor se encontrar internamente para a produção de ovos.



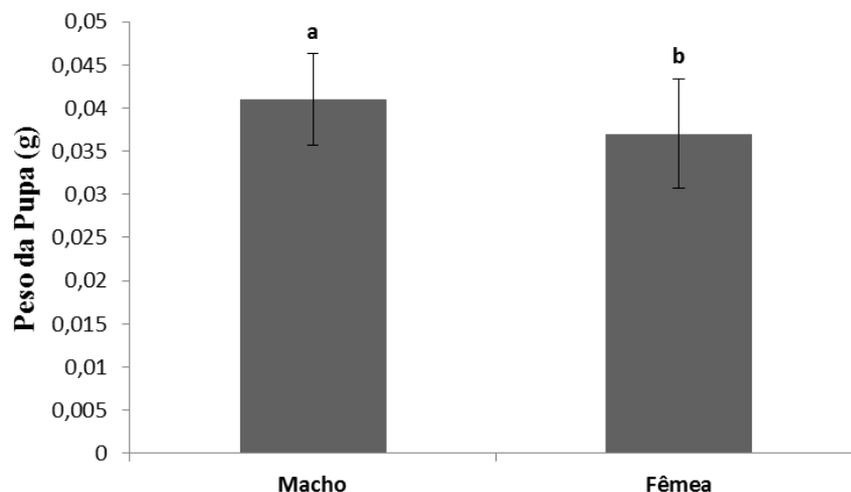
**Figura 11.** Ilustração do dimorfismo sexual de *O. indicata*. **A:** vista ventral da pupa fêmeas; **B:** imagem ampliada mostrando a morfologia da pupa fêmeas; **C:** esquema mostrando a genitália feminina; **D:** vista ventral da pupa macho; **E:** imagem ampliada mostrando a morfologia da pupa macho; **F:** esquema mostrando a genitália masculina..



**Figura 12.** Tamanho das Pupas Masculinas e Femininas de *O. indicata*. As letras maiúsculas indicam o parâmetro avaliado: A. Comprimento. B. Largura do tórax. C. Largura do abdômen. Letras minúsculas significam a diferença de tamanho entre machos e fêmeas dentro de cada parâmetro avaliado, sendo que 'a' significa maior valor e 'b' o menor valor. Foi utilizado Programa Assistat 7.5 beta, aplicado Teste *t*. n=10.

### 3.3.4.3 Peso

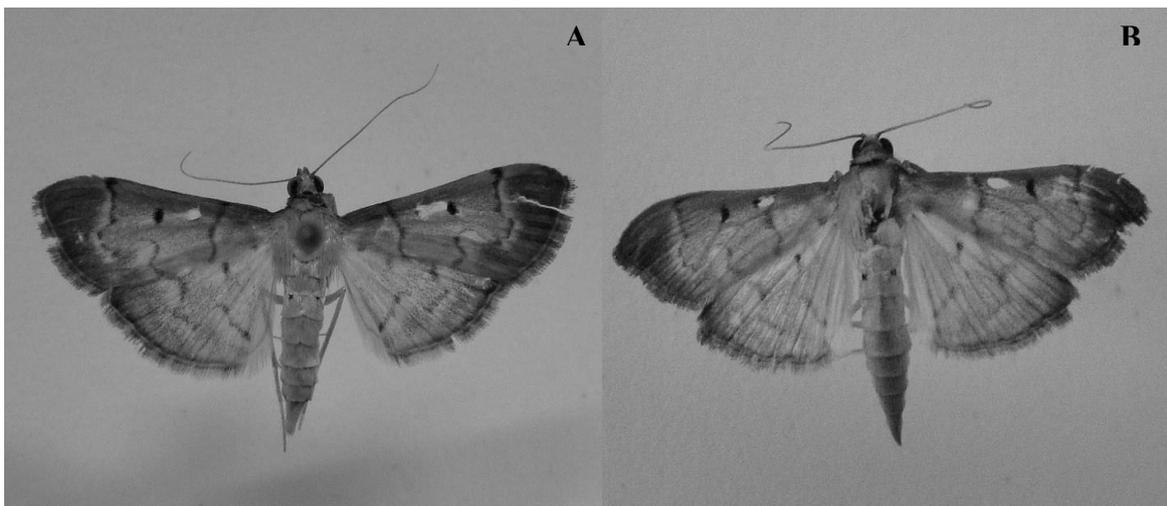
A variação do peso das pupas está diretamente relacionado ao dimorfismo sexual: as pupas do sexo masculino possuem maior peso quando comparados às pupas femininas. Os resultados obtidos podem ser verificados na [Figura 13](#), que apresenta o peso médio de 0,041g ( $\pm 0,005$ ) e 0,037g ( $\pm 0,006$ ), respectivamente, de pupas masculinas e femininas.



**Figura 13.** Peso das pupas femininas e masculinas em gramas de *O. indicata*. 'a' e 'b' houve diferença significativa entre machos e fêmeas, sendo que o peso do macho é superior ao da fêmea. Foi utilizado o Programa Assistat 7.5 beta, aplicado Teste *t*. n=10.

### 3.3.5 Adultos

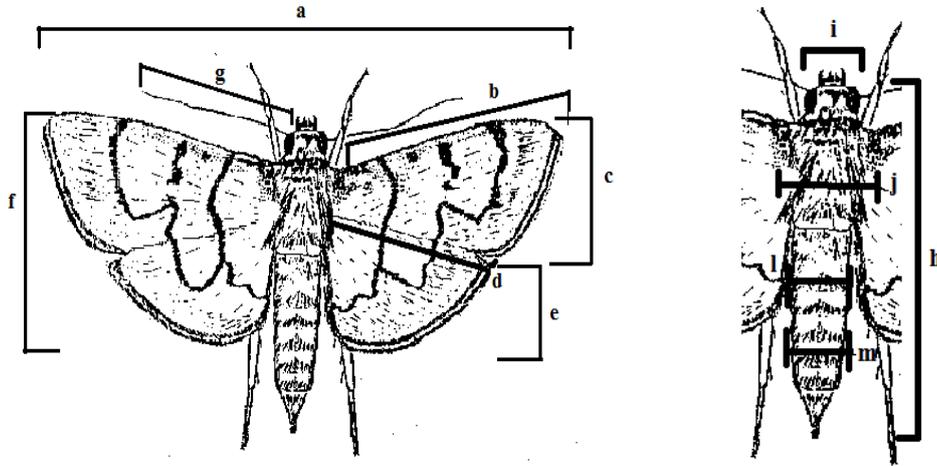
Os insetos na fase adulta da espécie *O. indicata* apresentaram coloração parda, variando de marrom claro ao escuro, as asas são estreitas do tipo membranosas que é característico de Lepidopteras com três estrias escuras em cada uma das asas anteriores e duas estrias nas asas posteriores, também são chamadas de mariposas, apresentando hábitos noturnos como uma de suas características (GALLO et al., 2002) (Figura 14). As antenas são do tipo filiforme. Sua reprodução se inicia geralmente um dia após a emergência na fase adulta. Os machos quando em repouso são rotineiramente vistos com a extremidade abdominal apontada para cima.



**Figura 14.** Insetos adultos de *O. indicata*. **A:** Fêmea e **B:** Macho alimentadas com solução de mel a 5%.

#### 3.3.5.1 Tamanho dos adultos

O dimorfismo sexual que caracteriza a família Pyralidae, da qual pertence esta espécie estudada, é que geralmente os machos adultos são maiores e apresentam o corpo mais delgado. Enquanto que as fêmeas são menores e o corpo é mais largo, com a área abdominal mais desenvolvida. O tamanho dos insetos machos e fêmeas, foi avaliado através da mensuração da envergadura, comprimento e largura da asa anterior e posterior, comprimento do corpo, largura torácica e abdominal, largura da cabeça e comprimento da antena, em que pode ser observada a ilustração da mensuração do inseto (Figura 15).



**Figura 15.** Ilustração das medidas que foram obtidas do inseto adulto. (a) envergadura; (b) comprimento da asa anterior; (c) altura da asa anterior; (d) comprimento da asa posterior; (e) altura da asa posterior; (f) comprimento total das asas; (g) comprimento da antena; (h) comprimento do corpo do inseto; (i) largura da cabeça; (j) largura do tórax; (l) largura do início do abdômen e (m) largura do final do abdômen. Modificado de Cruz & Castillo (1989).

Após a comparação das médias analisadas entre machos e fêmeas, foi verificada diferença significativa para a envergadura, comprimento da asa anterior, altura da asa anterior, comprimento da asa posterior, altura da asa posterior e comprimento do corpo. Para estas variáveis os adultos machos apresentaram média maior do que as fêmeas. Em relação ao comprimento do abdômen, a média das fêmeas apresentaram-se maiores ([Tabela 4](#)).

**Tabela 4.** Médias e desvios padrão para onze caracteres mensurados em machos e fêmeas de *O. indicata*.

Caracteres (mm)	Machos			Fêmeas			Teste <i>t</i>
	n	Média	Desvio Padrão	n	Média	Desvio Padrão	
a) Envergadura	10	27,06	0,321	10	24,31	0,218	*
b) Comprimento da asa anterior	10	9,04	0,048	10	8,03	0,05	**
c) Altura da asa anterior	10	4,93	0,048	10	4,74	0,222	*
d) Comprimento da asa posterior	10	12,53	0,262	10	11,12	0,096	**
e) Altura da asa posterior	10	4,49	0,455	10	4,11	0,087	*
f) Altura total da asa	10	9,42	0,504	10	8,85	0,309	**
g) Comprimento da antena	10	7,07	0,048	10	7,03	0,048	ns
h) Comprimento do corpo	10	0,421	13,48	10	0,471	10,54	**
i) Largura da cabeça	10	1,45	0,135	10	1,5	0	ns
j) Largura do tórax	10	2	0	10	2,03	0,048	ns
l) Largura do início do abdômen	10	1,3	0,163	10	1,92	0,103	**
m) Largura do final do abdômen	10	0,61	0,087	10	0,84	0,048	**

ns: não significativo.

\*significativo a 0,05%.

\*\*muito significativo a 0,01%.

### 3.3.6 Ciclo Biológico do inseto

O ciclo biológico da espécie *O. indicata* avaliado desde a ovoposição é apresentado na [Tabela 05](#). A fase de embrião tem a duração mínima de dois dias e máxima de quatro dias. A

fase imatura (lagartas), possui a duração máxima de dezesseis dias: média de dois dias no primeiro instar, um dia no segundo e um dia no terceiro instar, o período de quarto instar possui a durabilidade de dois dias, quinto e sexto instar tem a durabilidade de três dias cada um, totalizando essa fase com máximo de 16 dias. A pré-pupa possui a duração em média de vinte e uma horas e duração de pupa em torno de seis dias, havendo então a metamorfose para emergência do inseto adulto aos vinte e dois dias, e este inseto adulto alcança a maturidade sexual após um dia da eclosão, iniciando a sua fase reprodutiva.

A longevidade dos insetos variou de acordo com o dimorfismo sexual: o período de vida dos insetos adultos do sexo masculino (25-28 dias) foi maior do que os insetos do sexo feminino (20-21 dias).

**Tabela 05.** Ciclo biológico da espécie de *O. indicata* alimentadas com folhas de *P. glomerata* na fase larval e solução de mel a 5% para os insetos adultos. N=10 indivíduos na fase larval, Adultos: N= 5 machos e 5 fêmeas.

Fase	Duração (dias)	Idade (dias)	Desvio Padrão
Embrião	4	0 ao 4º	±1,0
1º Instar	2	4º ao 6º	0,0
2º Instar	1	6º ao 7º	0,0
3º Instar	1	7º ao 8º	0,0
4º Instar	2	8º ao 10º	0,0
5º Instar	3	10º ao 13º	0,0
6º Instar	3	13º ao 16º	0,0
Pré-pupa	1 (21 horas)	16º ao 17º	0,0
Pupa	5	17º ao 22º	±1,0
Adulto	20-21 (fêmea)		±3,0
	25-28 (macho)	22º em diante	±3,0

### 3.4 DISCUSSÃO

A estratégia utilizada para a detecção de insetos resistentes a 20-hidroxiecdisona (20E) foi eficiente, uma vez que a espécie *O. indicata*, pertencente à família Pyralidae da ordem Lepidoptera, foi detectada como resistente a 20E. Esta espécie é reconhecida como praga de

culturas comerciais de leguminosas, tais como a soja e o feijoeiro. Durante o experimento, os animais em sua fase larval foram exclusivamente alimentados com folhas de *P. glomerata* (planta produtora de 20E) durante 10 gerações e seus descendentes geraram descendentes viáveis.

Os ovos apresentaram dimensionamento maior em média de 0,96 x 0,80mm quando comparados aos encontrados por Cruz & Castillo (1989), que apresentaram 0,6 x 0,82mm. Durante o período de fase imatura foi observado que houve o desenvolvimento de seis instares larvais pelo tempo médio de 16 dias. O mesmo período médio foi observado nesta espécie em habitat natural, alimentada à base de leguminosas, porém, com o desenvolvimento larval ocorrendo em cinco instares. Resultados semelhantes foram verificados em estudos feitos por Kamimura et al. (2003) em lagartas de *Bombyx mori* alimentadas com dieta artificial contendo 20E, e com o aumento do título deste ecdisteróide no organismo do inseto induziu um maior número de mudas, conseqüentemente ocorrendo um maior número de instares nesta espécie.

Quanto à fertilidade dos ovos, houve variação de 0 a 97,54%, nas mariposas alimentadas com *Pfaffia*, apresentando a média de 61,28% de fertilidade nesta geração, porém os ovos colocados nos dias de maior ovoposição tiveram alta quantidade de ovos viáveis em comparação as mariposas alimentadas com folhas de soja durante os instares larvais, variando de 46,96 a 100%, respectivamente, observada durante a primeira e quarta geração. Portanto, verificou-se que os adultos provenientes de lagartas alimentadas com folhas de *Pfaffia* tiveram alterações no processo e no período de ovoposição além da fertilidade (ovos viáveis), por ter ocorrido o aumento deste período. Em contrapartida, Cruz & Castillo (1989) atribui a instabilidade da ovoposição e capacidade reprodutiva a fatores como a temperatura e a umidade quando elevadas, favorece para maior fertilidade dos ovos.

Quanto ao crescimento das lagartas alimentadas com folhas de *Pfaffia*, o tamanho médio das lagartas do primeiro ao quarto instar foi menor comparado a insetos desta mesma espécie alimentados com folhas de soja. O crescimento superior somente foi observado no quinto e sexto instar. Em cápsulas cefálicas do primeiro ao quinto instar, o dimensionamento não teve diferença significativa, somente as cápsulas de quinto e sexto instar apresentaram dimensões maiores aos observados por Cruz & Castillo (1989). Em lagartas de *Bombyx mori* alimentadas com dieta contendo 400 µg de 20E, também foi observado um maior crescimento a partir do penúltimo instar (quarto estágio) em relação ao tratamento controle com ausência de 20E na dieta artificial (KANEKO et al., 2011).

Estudos avaliando a ação de 20E em insetos de importância agrônômica vêm sendo realizados detectando as alterações no desenvolvimento, crescimento e reprodução de

descendentes férteis. O efeito deste ecdisteróide pode se tornar favorável em algumas espécies, como na criação de *Bombix mori* para a produção de fios de seda, para que o inseto permaneça maior parte do seu ciclo na fase imatura para obter maior quantidade de matéria-prima (KANEKO et al., 2011).

Em altas concentrações no organismo do inseto, 20E e seus derivados (produtos da inativação de 20E) podem levar a muda precoce. Possivelmente, devido a este fator, as lagartas durante os primeiros instares possuem tamanho (comprimento) menor que o habitual. O peso observado das lagartas alimentadas com folhas de *Pfaffia* durante os instares do estágio larval também é menor comparado ao peso médio de lagartas desta mesma espécie alimentadas com plantas que não contém fitoecdisteróides, semelhante ao observado em experimento com lagartas de *Plodia interpunctella* avaliado por Rharrabe, Sayah & Marion-Poll (2010), a alimentação com dietas contendo ecdisteróides, dentre eles o 20E, foi constatado o efeito negativo na alimentação das lagartas em função de maior concentração de ecdisteróide. Os resultados encontrados são relacionados ao efeito de deterrência provocado por fitoecdisteróides, como forma de defesa da planta que são predadas por herbívoros, podendo ser considerados tóxicos (RHARRABE et al., 2009, 2010).

Baixa mortalidade larval foi verificada durante os seis instares larvais, havendo registro de ocorrência no primeiro, quinto e sexto instar, mostrando que estes insetos apresentam uma alta resistência a 20E, e o percentual máximo de mortalidade foi de 13,33% no primeiro e sexto instar, diferentemente ao observado em estudo com *P. interpunctela*, que teve o máximo de 20% de mortalidade para larvas alimentadas com 100 µg de 20E, chegando à 50% de mortalidade para larvas alimentadas com 200 µg de 20E (RHARRABE et al., 2011).

Houve uma alta taxa de digestibilidade (88,56 a 98,80%) nas lagartas de *O. indicata*, indicando que a alimentação com base em dieta de folhas de *P. glomerata* contendo 20E não afetou de forma significativa, ou podem ter afetado positivamente no processo digestivo, em que as lagartas absorveram grande parte da massa foliar e seus nutrientes, permitindo dessa forma maior absorção e acúmulo de energia que são necessários para o desenvolvimento, crescimento, engorda e muda de um instar para o outro. Através desta análise, pode-se confirmar que o inseto apresenta uma alta adaptabilidade e resistência ao composto 20-hidroxiecdisona presente na *Pfaffia*, pois não houve toxicidade ou presença dos sintomas relatados em insetos sem resistência tais como deterrência, diminuição da alimentação e anormalidade no desenvolvimento (FESTUCCI-BUSELLI, 2008; MARION-POLL & DECOINS, 2002; BLACKFORD & DINAN, 1977).

As pupas apresentaram tamanho e peso significativamente diferente em função do sexo: machos possuem maior dimensionamento e peso do que as fêmeas. O período de pupa até a eclosão da mariposa (fase adulta) dura em média 6 dias desde a primeira geração, mantendo-se nesta média o período de pupação. Resultados semelhantes foram encontrados a partir da sétima geração da espécie, no período de dezembro a maio no Peru (CRUZ & CASTILLO, 1989) alimentadas com plantas de soja, que não são produtoras de 20E. Como os resultados foram semelhantes chega-se à conclusão de que a alimentação das lagartas com folhas de *Pfaffia* não afetou o desenvolvimento pupal.

O dimorfismo sexual apresentado pelos indivíduos adultos é verificado pela estrutura corporal dos machos serem maiores do que as fêmeas, exceto quanto pela largura abdominal, que a fêmea apresenta essa região mais desenvolvida devido ao seu aparelho reprodutor. A maturidade sexual é alcançada após um dia da emergência, havendo também a ovoposição. Os adultos machos geralmente possuem um período vital maior em relação às fêmeas, devido o maior desgaste físico devido a fatores hormonais e gasto de energia para a produção de ovos. Não foi afetado o período de emergência dos adultos alimentados com planta produtora de 20E. Resultados semelhantes foram observados em *Plodia interpunctella* por Rharrabe (2011), que relatou a emergência de adultos alimentados com dietas com concentração de 0, 50 e 500 µg de 20E ao 14º dia de vida.

A análise do ciclo biológico revela que um período menor é necessário comparado ao observado por Cruz & Castillo (1989) em insetos desta mesma espécie alimentados com folhas de soja, para a sua conclusão quando os insetos são alimentados com folhas de *P. glomerata*, que são produtoras de 20E. Do estágio inicial de desenvolvimento até a eclosão dos adultos e maturidade sexual foi necessária média de 22 dias, enquanto que em estudo anterior feito pelo autor, um período variando entre 29,1 e 35,8 dias foi necessário para se concluir o ciclo biológico. O ciclo biológico pode ser menor justamente devido à precocidade de mudas causada pela presença de 20E e seus derivados (produtos da inativação de 20E) presente no organismo do inseto. Este inseto inativa 20E e aparentemente utiliza seus derivados positivamente em seu metabolismo, diminuindo assim seu ciclo biológico, o que representa uma vantagem seletiva uma vez que estes insetos produzem indivíduos férteis. A maior longevidade dos machos adultos está relacionada ao desgaste físico das fêmeas serem maior devido a maior produção de hormônios e postura de ovos.

A alimentação destes insetos com folhas de *P. glomerata*, que é uma espécie vegetal produtora de 20E, pode levar a altas concentrações do composto ou seus derivados no organismo do inseto, podendo causar alterações em seu crescimento e desenvolvimento, como

um maior número de instares e um ciclo biológico mais curto. Os dados obtidos neste trabalho sugerem que o metabolismo das larvas de *O. indicata* foi modulado durante o curso evolutivo para inativar 20E e ainda utilizar seus derivados de forma positiva em seu metabolismo. A identificação de insetos resistentes a este composto, isto é, que seja capaz de concluir seu ciclo biológico e gerar descendentes férteis é importante para se entender as rotas bioquímicas envolvidas na inativação de 20E. Este entendimento pode ser utilizado na geração de estratégias biotecnológicas que visam o controle de insetos em culturas de interesse agrônômico.

### 3.5 CONCLUSÕES

A estratégia utilizada foi eficiente para o isolamento de insetos resistentes a 20-hidroxiecdisona.

A espécie *O. indicata* apresenta resistência ao 20-hidroxiecdisona, apresentando potencial aplicabilidade biotecnológica.

O ecdisteróide 20-hidroxiecdisona provoca alterações sobre o desenvolvimento das lagartas da espécie *O. indicata*, apresentando seis instares larvais.

O dimorfismo sexual pode ser avaliado a partir do estágio de pupas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATHORI, M.; PONGRACZ, Z. Phytoecdysteroids – from isolation to their effects on humans. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 153-172, 2005.

BLACKFORD, M. J. P.; DINAN, L. The effects of ingested 20-hydroxyecdysone on the larvae of *Aglais urticae*, *Inachisio*, *Cynthia cardui* (Lepidoptera: Nymphalidae) and *Tyria jacobaeae* (Lepidoptera: Arctiidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 43, p. 315-327, 1997.

BOARETO, M. A. C.; BRANDÃO, A. L. S. Manejo integrado de pragas, Vitória da Conquista: UESB, 2000.

CHAITANYA, R. K.; SRIDEVI, P.; SENTHILKUMARAN, B.; GUPTA, A. D. 20-Hydroxyecdysone regulation of H-fibroin gene in the stored grain pest *Corcyra cephalonica* during the last instar larval development. **Steroids**, v. 76, p. 125-134, 2010.

CRUZ, L. A.; CASTILLO, P. S. *Omiodes indicata* (Lepidoptera, Pyralidae) en Tumbes: ciclo biológico y potencial reproductivo en insectario. **Revista Peruana de Entomologia**, v. 31, p. 103-106, 1989.

DINAN, L. A strategy towards the elucidation of the contribution made by phytoecdysteroids. 1998.

DINAN, L. Phytoecdysteroids: biological aspects. **Phytochemistry**, v. 57, p. 325–339, 2001.

DINAN, L.; LAFONT, R. Effects and applications of arthropod steroid hormones (ecdysteroids) in mammals. **Journal of Endocrinology**, v. 191, p. 1-8, 2006.

FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; CONTIM, L. A. S.; BARBOSA, L. C. A.; STUART, J. J.; OTONI, W. C. Biosynthesis and potential functions of the ecdysteroid 20-hydroxyecdysone – a review. **Botany**, v. 86, p. 978-987, 2008.

FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; CONTIM, L. A. S.; BARBOSA, L. C. A.; VIEIRA, R. A.; STUART, J. J.; OTONI, W. C. Level and distribution of 20-hydroxyecdysone during *Pfaffia glomerata* development. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 20, p. 305-311, 2008b.

FRANCISCO, C.; JOSEP, C. Insect allelochemicals from *Ajuga* plants. **Phytochemistry**, v. 32, p. 1361–1370, 1993.

- GALLO, D.; PEREIRA, J. C.; MORAES, J. A.; et al. *Insetos: bioecologia e controle*. São Paulo: Editora Agropecuária, 2002.
- GOLOVATSKAYA, I. F. Effect of ecdysterone on morphological and physiological processes in plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 51, p. 407-413, 2004.
- GOODMAN, W. G.; GRANGER, N. A. The juvenile hormones. In: GILBERT, L. I.; IATROU, K.; GILL, S. S. (Eds.). **Comprehensive Molecular Insect Science**, v. 3, p. 319–408, 2005.
- HOFFMAN CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; CORREA FERREIRA, B. S.; OLIVEIRA, L. J.; SOSA GOMEZ, D. R.; PANIZZI, A. R.; CORSO, I. C.; GAZZONI, D. L.; OLIVEIRA, E. B. de. Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado. Londrina: Embrapa Soja, 2000. **Circular técnica**, v. 30, p. 70.
- HUANG, Z.; ZHOU, F. C.; XU, D.; AFZAL, M.; BASHIR, M. H.; AI, S.; FREED, S. Antifeedant activities of secondary metabolites from *Ajuga nipponensis* against *Plutella xylostella*. **Pakistan Journal of Botany**, v. 40, p. 1983-1992, 2008.
- KAMIMURA, M.; HOSHINO, T.; NISHIO, T.; et al. Efeito da dieta contendo 20-hidroxiecdisona em lagartas de *Bombyx mori*. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 47, n. 2, p. 201-207, 2003.
- KANEKO, Y.; SHINODA, T.; HIRUMA, K. Remodeling of the corpora cardiaca and the corpora allata during adult metamorphosis in *Bombyx mori*: identification of invisible corpora cardiaca by the expression of adipokinetic hormone. **Entomology Zoology**, v. 60, n. 3, p. 151-158, 2011.
- LAFONT, R. Ecdysteroids and related molecules in animals and plants. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 35, p. 3-20, 1997.
- LAFONT R.; DINAN L. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update. **Journal of Insect Science**, v.3, p.1-30, 2003.
- MACHACKOVA, I.; VAGNER, M.; SLAMA, K. Comparison between the effects of 20-hydroxyecdysone and phytohormones on growth and development in plants. **European Journal of Entomology**, v. 92, p. 309-316, 1995.

- MAKKA, T.; SEINO, A.; TOMITA, S.; FUJIWARA, H.; SONOBE, H. A possible role of 20-hydroxyecdysone in embryonic development of the silkworm *Bombyx mori*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 51, p. 111-120, 2002.
- MARION-POLL, F.; DESCOINS, C. Taste detection of phytoecdysteroids in larvae of *Bombyx mori*, *Spodoptera littoralis* and *Ostrinia nubilalis*. **Journal of Insect Physiology**, v. 48, p. 467-476, 2002.
- QUINTELLA, C. M.; BARRIGOSI, J. A. A. Efeitos de práticas culturais no desenvolvimento do feijoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, n. 3, p. 555-561, 2005.
- RATTES, L. R.; BOSSOLANI, J. W.; SILVA, F. R. Efeitos da adição de soja na alimentação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 1, p. 79-87, 2008.
- RHARRABE, K.; MARION-POLL, F. Effects of ingested 20-hydroxyecdysone on development and midgut epithelial cells of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera, Pyralidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 93, p. 112–119, 2009.
- RHARRABE, K.; SAYAH, F.; LAFONT, R. Dietary effects of four phytoecdysteroids on growth and development of the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*. **Journal of Insect Science**, p. 1-12, 2010.
- RHARRABE, K. K.; SAYAH, F. F.; MARION-POLL, F. F. Gustatory perception of phytoecdysteroids in *Plodia interpunctella* larvae. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 138, n. 1, p. 33-39, 2011.
- SHIOBARA, Y.; INOUE, S.; KATO, K.; NISHIGUCHI, Y.; OISHI, Y.; NISHIMOTO, N.; OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K.; HASHIMOTO, G. A nortriterpenoid, triterpenoid and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. **Phytochemistry**, v.32, p.1527- 1530, 1993.
- SLAMA, K.; LAFONT, R. Insect hormones - ecdysteroids: their presence and actions in vertebrates. **Europa Journal Entomology**, v. 92, p. 355-377, 1995.
- SPINDLER, K. D.; HONL, C.; TREMMEL, C. H.; BRAUN, E. S.; RUFF, H.; SPINDLER-BARTH, M. Ecdysteroid hormone action. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.66, p.3837-3850, 2009.
- SMITH, L. S. Trends in Endocrinology and Metabolism, p. 301,1998.

TIAN, L.; ENEN, G.; WANG, S.; LIU, S.; JIANG, R.-J.; YANG, C.; LING, E.; SHENG, L. Developmental Regulation of Glycolysis by 20 -hydroxyecdysone and Juvenile Hormone in Body Tissues of the Silkworm, *Bombyx mori*. **Journal of Molecular Cell Biology**, v.2, p.255-263, 2010.

TIMOFEEV, N. P. Ecological Relations of Agricultural Populations of Ecdysteroid-Containing Plants *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin and *Serratula coronata* L. to Herbivorous Insects. **Contemporary Problems of Ecology**, vol.2, p.489-500, 2009.

WU, P.; XIE, H.; TAO, W.; MIAO, S.; WEI, X. Phytotoecdysteroid from the rhizomes of *Brainea insignis*. **Phytochemistry**, v.71, p.975-981, 2010.