

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ESTUDOS DA INIBIÇÃO DE PROTEASES OBSERVADA EM
FOLHAS DE *Coffea racemosa* Lour. SOBRE *Spodoptera
frugiperda* (J.E Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) E
Diatraea saccharalis (Fabricius, 1794) (Lepidoptera:
Crambidae)**

Nicole de Paula Souza

Engenheira Agrônoma

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ESTUDOS DA INIBIÇÃO DE PROTEASES OBSERVADA EM
FOLHAS DE *Coffea racemosa* Lour. SOBRE *Spodoptera
frugiperda* (J.E Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) E
Diatraea saccharalis (Fabricius, 1794) (Lepidoptera:
Crambidae)**

Discente: Nicole de Paula Souza

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Duarte Rossi

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Entomologia Agrícola).

2023

S729e SOUZA, NICOLE DE PAULA

Estudos da inibição de proteases observada em folhas de *Coffea racemosa* Lour. sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) / NICOLE DE PAULA SOUZA. -- , 2023

48 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal,

Orientador: Guilherme Duarte Rossi

1. Entomologia. 2. Broca da cana 3. Lagarta do cartucho. I.Título.

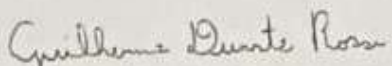
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ESTUDOS DA INIBIÇÃO DE PROTEASES OBSERVADA EM FOLHAS DE COFFEA RACEMOSA LOUR. SOBRE SPODOPTERA FRUGIPERDA (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E DIATRAEA SACCHARALIS (FABRICIUS, 1797) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE).

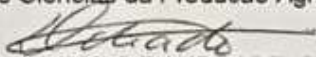
AUTORA: NICOLE DE PAULA SOUZA

ORIENTADOR: GUILHERME DUARTE ROSSI

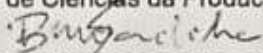
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Agronomia (Entomologia Agrícola), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. GUILHERME DUARTE ROSSI (Participação Presencial)
Departamento de Ciências da Produção Agrícola / FCAV UNESP Jaboticabal



Prof. Dr. DANIEL JUNIOR DE ANDRADE (Participação Presencial)
Departamento de Ciências da Produção Agrícola / FCAV UNESP Jaboticabal



Prof. Dr. BRUNO HENRIQUE SARDINHA DE SOUZA (Participação Presencial)
Entomologia / Universidade Federal de Lavras

Jaboticabal, 16 de fevereiro de 2023

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

NICOLE DE PAULA SOUZA – Nascida em 15 de agosto de 1996 na cidade de Franca – SP, filha de Sirlene de Paula e Daniel César de Souza. Em 2015, ingressou no curso de Engenharia Agrônômica pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal. Sob orientação do Prof. Dr. Guilherme Duarte Rossi desenvolveu Iniciação Científica e Trabalho de Conclusão de Curso na área de Bioquímica de Insetos. Em 2020, iniciou o curso de Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola) na UNESP de Jaboticabal. Foi bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e desenvolveu o projeto de dissertação na linha de pesquisa de Biotecnologia e Resistência de Plantas a Insetos, Ácaros e Nematoides.

Dedico às mulheres que tornaram possível minha vitória:
minha avó, Vitalina Rocha de Paula, e minha mãe, Sirlene de Paula.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por ser luz e presença constante em minha vida, guiando meu caminho com sua infinita sabedoria, paciência, amor e misericórdia.

Agradeço à minha mãe, Sirlene de Paula, por ser minha melhor amiga, minha companheira e meu lar. Obrigada por caminhar ao meu lado, fortalecer meus passos, e sonhar meus sonhos.

Agradeço ao meu pai, Daniel César de Souza, por dividir comigo o amor pela biologia, pela pesquisa e pela educação. Obrigada por apoiar a minha trajetória e vibrar pelas minhas conquistas.

Agradeço à minha família: Sirlene de Paula, Solange A. de Paula Santana, Sandra M. de Paula Ferreira, Sônia M. de Paula Pereira, Samantha Paula Silva, Sara Santana, Brunna D. Bezerra e Murilo Soares. Obrigada por serem minha maior torcida e meus maiores apoiadores; sou imensamente grata por tê-los em minha vida. Em especial às mulheres fortes e batalhadoras que me criaram – minha mãe, minha avó e minhas tias – saibam que tenho muito orgulho em possuir vocês como modelo de vida.

Ao meu orientador, Dr. Guilherme Duarte Rossi, sou muito grata pela parceria que desenvolvemos ao longo dos anos. Agradeço todo conhecimento compartilhado, orientação fornecida, apoio e confiança em mim depositada.

Aos meus colegas entomologistas, por dividirem essa etapa comigo, em especial aos meus parceiros do Laboratório de Bioquímica de Insetos: Amanda C. Guimarães Sousa, Ana Letícia Zéro dos Santos, Ciro Pedro G. Pinto e Sandy Souza Fonsêca. Obrigada pela amizade construída, por toda ajuda durante minha formação, e claro, pelas tardes de café com bolo e fofoca.

Aos “roommates” queridos, Thais do Prado, André Camargo e Raquel Muhlbeier Bonato, agradeço a parceria e os momentos tão especiais vividos no memorável apartamento 4.

Meus sinceros agradecimentos àqueles que caminham comigo: Aline L. Gregório, Calisto Nonato, Claudiane M. Rocha, Camilo Cesar M. Lopes, Diandro R.

Barilli, Fernanda C. Rocha Souza, Guilherme R. Vieira, Gustavo O. Brandão, Isabela Faria, Joacir do Nascimento, João Rafael S. Soares, Jordana A. Flôres, Juliana S. Queiroz, Mariane R. Ferreira, Matheus M. D. Pinto, Maynumi C. Scarano, Pedro H. M. Parreira, Roseli B. Ramos, Samuel P. Bícego, Sarah C. S. Martins, Tatiane S. Jeromini, Thales R. Vasconcelos, Thaís S. Pereira, Thaynara A. S. Junqueira, e Vinicius O. Galache. Obrigada tornarem minha vida mais leve, sendo fonte de amor, carinho, conforto e alegria.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

RESUMO.....	ii
ABSTRACT	iii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Lagarta do cartucho do milho	3
2.2. Broca da cana.....	6
2.3. Metabólitos secundários de plantas	11
2.3.1. Terpenoides	11
2.3.2. Compostos nitrogenados	12
2.3.3. Compostos fenólicos.....	13
2.3.4. Proteínas de defesa.....	13
2.4. <i>Coffea racemosa</i> Lour.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Extratos enzimáticos dos intestinos das lagartas	16
3.2. Extrato de folhas de <i>Coffea racemosa</i>	16
3.3. Detecção da atividade de tripsinas digestivas das lagartas	17
3.4. Inibição da atividade de tripsinas digestivas das lagartas pelo extrato foliar ..	17
3.5. Filtração molecular do extrato foliar	18
3.6. Inibição de tripsinas digestivas das lagartas pelos grupos de frações formados após filtração molecular	18
3.7. Efeitos do extrato foliar fracionado sobre o desenvolvimento das lagartas.....	19
4. RESULTADOS	20
4.1. Atividade e inibição de tripsinas digestivas pelo extrato de folhas de <i>Coffea racemosa</i>	20
4.2. Filtração molecular do extrato de folhas de <i>Coffea racemosa</i>	21
4.3. Efeitos do extrato foliar de <i>Coffea racemosa</i> sobre a atividade de tripsinas e o desenvolvimento de <i>Spodoptera frugiperda</i>	23
4.4. Efeitos do extrato foliar de <i>Coffea racemosa</i> sobre a atividade de tripsinas e o desenvolvimento de <i>Diatraea saccharalis</i>	26
5. DISCUSSÃO	28
6. CONCLUSÕES	30
REFERÊNCIAS.....	32

ESTUDOS DA INIBIÇÃO DE PROTEASES OBSERVADA EM FOLHAS DE *Coffea racemosa* Lour. SOBRE *Spodoptera frugiperda* (J.E Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) E *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae)

RESUMO – Novas moléculas inseticidas têm sido de grande interesse para o manejo de insetos pragas como a lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), e a broca da cana, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae). Sob a hipótese de que inibidores de tripsinas digestivas interferem no desenvolvimento de lepidópteros pragas, foram avaliados o potencial de inibição das tripsinas digestivas e o desenvolvimento larval de *S. frugiperda* e *D. saccharalis* na presença de um extrato de folhas de *Coffea racemosa* que apresenta inibição de tripsinas. Complementarmente, o extrato de *C. racemosa* foi fracionado em grupos proteicos e não proteicos para desvendar os principais tipos de efeitos dos diferentes grupos de moléculas sobre a inibição de tripsinas digestivas e o desenvolvimento dos insetos pragas em questão. Foi observado que a atividade de tripsinas digestivas em *S. frugiperda* é superior à observada em *D. saccharalis* e que a atividade residual de tripsinas digestivas de *S. frugiperda* após exposição ao extrato de *C. racemosa* é superior à atividade residual de *D. saccharalis*. Não foi observada mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* quando alimentadas com o extrato bruto ou com os grupos de fracionamento do extrato de *C. racemosa*. Por outro lado, houve mortalidade pronunciada de lagartas de *D. saccharalis* alimentadas com o extrato e com os grupos de frações obtidos pelo fracionamento do extrato de *C. racemosa*. O fracionamento do extrato de *C. racemosa* indicou que moléculas não proteicas do extrato que apresentam inibição de tripsinas digestivas estão associadas com as altas mortalidades observadas para lagartas de *D. saccharalis*.

Palavras-chave: broca da cana, inibidores de proteases vegetais, lagarta do cartucho, proteases digestivas dos insetos.

STUDIES ON THE PROTEASE INHIBITION OF A LEAF EXTRACT from *Coffea racemosa* Lour. OVER *Spodoptera frugiperda* (J.E Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) AND *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae)

ABSTRACT – New insecticidal molecules have been of great interest for the development of pest management strategies of insect pests such as the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), and the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae). Under the hypothesis that digestive trypsin inhibitors interfere with the development of lepidopteran pests, it was investigated the activity and the inhibition of digestive trypsins and the larval development of *S. frugiperda* and *D. saccharalis* exposed to a leaf extract of *Coffea racemosa* that presents trypsin inhibition. Complementarily, the *C. racemosa* extract was fractionated into protein and non-protein groups aiming to reveal the types of effects of the different groups of molecules on the lepidopteran pests trypsin activity and larval development. It was observed that the activity of digestive trypsins and the residual activity of digestive trypsins after exposure to *C. racemosa* extract were higher in larval *S. frugiperda* than in larval *D. saccharalis*. Mortality of larval *S. frugiperda* was not observed when fed with the *C. racemosa* extract or with the fractionation groups of the extract. On the other hand, there was pronounced mortality of larval *D. saccharalis* fed on the *C. racemosa* extract and on the fractionation groups of the leaf extract. Fractionation of the *C. racemosa* extract indicated that non-protein molecules of the extract presenting trypsin inhibition activity are associated with the high mortalities observed for larval *D. saccharalis*.

Keywords: sugarcane borer, plant protease inhibitors, fall armyworm, insect digestive proteases.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores mundiais de alimentos, sendo o agronegócio responsável por 27,6% do PIB brasileiro (CEPEA, 2022). Todavia, apesar de sua magnitude, o setor enfrenta diversos problemas fitossanitários, como o ataque de insetos pragas, que resultam em uma redução média anual de 7,7% na produção nacional (Oliveira et al., 2014).

Os insetos pragas podem causar danos diretos aos cultivos por meio de injúrias como a desfolha, sucção de seiva e formação de galerias, ou danos indiretos por atuarem como transmissores de viroses e/ou possibilitarem o estabelecimento de patógenos nas estruturas vegetais. Dessa forma, o ataque de insetos pragas reduz o rendimento e a qualidade da produção agrícola, acarretando em perdas econômicas e redução da segurança alimentar (Savary et al., 2019).

Entre os insetos pragas que causam prejuízos às culturas de interesse econômico, são destacadas a lagarta-do-cartucho-do-milho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), e a broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae).

A lagarta do cartucho do milho é uma espécie originária das zonas tropicais, de ocorrência nas Américas e recentemente relatada nos continentes africano e asiático (Sarmiento et al., 2002; Georgen et al., 2016; Chormule et al., 2019). É praga-chave na cultura do milho, tanto nos cultivos de verão como nos cultivos de segunda safra, conhecidos como “safrinha”. No entanto, devido ao seu hábito polífago, a espécie pode se alimentar de aproximadamente 353 diferentes tipos de plantas, tais como algodão, soja, arroz, trigo, sorgo, cana-de-açúcar e espécies não cultivadas (Cruz, 1995; Barros et al., 2010; Hardke et al., 2015; Montezano et al., 2018; Oliveira et al., 2019).

A broca da cana-de-açúcar é um inseto nativo do hemisfério ocidental, encontra-se amplamente distribuída pelos continentes americanos e é praga-chave nas regiões canavieiras do Brasil. Em função de seu hábito oligófago, a broca também causa prejuízos a outras culturas de importância econômica da família Poaceae, como o milho, o sorgo e o arroz (Arrigoni, 2002; Ferreira et al., 2004; Cruz, 2007; Dinardo-Miranda et al., 2013; Mendes et al., 2014; Francischini et al., 2019).

A realização do controle desses herbívoros nos sistemas de produção agrícola é fundamental para a geração de produtos em níveis economicamente sustentáveis. Entretanto, os métodos disponíveis apresentam certas limitações, relacionadas principalmente aos hábitos e à evolução da resistência dos insetos pragas. Além disso, a utilização de produtos químicos, método de controle mais utilizado na maioria dos sistemas de produção, apresenta como inconveniente a toxicidade sobre organismos não alvo e ao ambiente. A eliminação dos organismos não alvo como inimigos naturais e agentes polinizadores, causada pelo uso excessivo de inseticidas de amplo espectro, impacta negativamente a biodiversidade e a produtividade dos cultivos agrícolas (Thompson, 2003; Desneux et al., 2007; Blanco et al., 2016; Mahmood et al., 2016; Fatoretto et al., 2017; Sponsler et al., 2019).

Em vista disso, a busca por novas moléculas inseticidas tem sido de grande interesse para o desenvolvimento de ferramentas de controle para serem utilizadas no manejo de insetos pragas. As plantas destacam-se entre as fontes de moléculas aplicadas ao manejo de insetos pragas. Por estarem em constante coevolução com os insetos, apresentam mecanismos de resistência como a presença de compostos químicos denominados metabólitos secundários. Os principais compostos que atuam na defesa química das plantas são os terpenos, os compostos nitrogenados, os compostos fenólicos e as proteínas de defesa (Felton e Gatehouse, 1996; Harbone, 1999; Rattan, 2010; Boiça Junior et al., 2016; Ahmed et al., 2017).

Uma importante classe de proteínas de defesa são os inibidores de proteases, moléculas capazes de comprometer a digestão primária do alimento consumido pelos insetos através da redução da atividade das proteases responsáveis por esse processo. Em lepidópteros, as serino proteases, tripsina e quimotripsina, são as enzimas digestivas predominantes no intestino médio e, ao serem inibidas, prejudicam a nutrição do inseto, comprometendo seu desenvolvimento (Ryan, 1990; Srinivasan et al., 2006, Oliveira e Macedo, 2011; Silva et al., 2011; Pinto et al., 2018).

Uma espécie não cultivada de café, *Coffea racemosa* Lour., vem sendo estudada como fonte de moléculas inseticidas devido à resistência que possui ao bicho mineiro do cafeeiro, *Leucoptera coffella* (Guérin-Mèneville & Perrottet, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae). Além de sua utilização para a geração de híbridos resistentes, *C. racemosa* aparenta ser uma importante fonte de metabólitos

secundários com atividade inseticida, passíveis de serem utilizadas no manejo de lepidópteros pragas (Guerreiro Filho et al., 1991; Ramiro et al., 2004; Alves et al., 2011; Souza, 2019).

Sob a hipótese de que inibidores de proteases de origem vegetal alteram o desenvolvimento de insetos pragas, o presente trabalho foi conduzido com o objetivo de se observar os efeitos de um extrato de folhas de *C. racemosa* que apresenta a propriedade de inibição de proteases sobre o desenvolvimento de duas lagartas de importância econômica com hábitos alimentares distintos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Lagarta do cartucho do milho

A lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), também conhecida como lagarta militar, é uma espécie originária das zonas tropicais, de ocorrência nas Américas e recentemente relatada nos continentes africano e asiático (Sarmiento et al., 2002; Georgen et al., 2016; Montezano et al., 2018; Chormule et al., 2019; Lee et al., 2020; Suby et al., 2020; Herlinda et al., 2021; Piggott et al., 2021). Apresenta ampla distribuição no território nacional, principalmente devido a condições favoráveis de clima e a abundante disponibilidade de alimento dada pela sucessão de culturas de importância agrícola realizada no País (Cruz, 1995; Sarmiento et al., 2002; Barros et al., 2010).

Spodoptera frugiperda é uma praga-chave na cultura do milho, presente nos cultivos de primeira e de segunda safra (Cruz, 1995; Cruz, 1999; Busato et al., 2002; Sarmiento et al., 2002; Farinelli e Fornasier Filho, 2006; Valicente, 2015; Wordell Filho et al., 2016). Devido ao seu hábito polífago, esse inseto pode utilizar pelo menos 353 diferentes tipos de plantas como recurso alimentar, compreendendo espécies cultivadas e não cultivadas, tais como algodão, arroz, cana-de-açúcar, milheto, soja, sorgo e trigo (Pitre e Hogg, 1983; Veloso e Nakano, 1983; Busato et al., 2002; Pogue, 2002; Barros et al., 2010; Bueno et al., 2011; Hardke et al., 2015; Montezano et al., 2018; Oliveira et al., 2019; Suby et al., 2020; Hailu et al., 2021).

A lagarta militar é um inseto holometábolo, apresentando as fases de ovo, larva, pupa e adulto em seu ciclo, que, no total, dura cerca de 30 dias. Lagartas dessa espécie apresentam coloração que varia do cinza-claro ao marrom escuro e podem atingir até 50 mm de comprimento. Possuem três faixas longitudinais de coloração clara no dorso e duas faixas laterais de coloração escura. A cabeça é escura com manchas claras e é caracterizada por possuir suturas na forma de “Y” invertido, o que facilita o reconhecimento do gênero (Nakano et al., 1981; Cruz, 1995; Gallo et al., 2002; Sarmiento et al., 2002). A duração da fase larval varia de acordo com as condições climáticas, mas, em termos gerais, apresenta seis ínstaes, sendo cada um deles dividido em um período ativo de alimentação e um de repouso no qual o inseto prepara-se para a ecdise (Cruz, 1995; Sarmiento et al., 2002; Omoto et al., 2013). Os imaturos apresentam a característica de tecerem fios de seda, utilizados para a dispersão e/ou proteção contra inimigos naturais (Cruz, 1995). Outra característica interessante é que geralmente apenas uma lagarta é encontrada por planta, pois imaturos dessa espécie apresentam hábito canibal (Gallo et al., 2002; Sarmiento et al., 2002; Wordell Filho et al., 2016).

As pupas possuem coloração marrom-avermelhada, medem cerca de 15 mm e podem ser encontradas no solo, a poucos centímetros de profundidade (Nakano et al., 1981; Cruz, 1995; Gallo et al., 2002; Sarmiento et al., 2002). Na fase adulta, as mariposas de *S. frugiperda* apresentam hábito noturno e possuem 35 mm de envergadura. Apresentam asas anteriores cinza escuro e posteriores cinza claro (Nakano et al., 1981; Cruz, 1995; Gallo et al., 2002; Sarmiento et al., 2002). Nos machos, é possível observar a presença de pequenas manchas claras na asa anterior, enquanto que nas fêmeas a coloração é uniforme (Cruz, 1995). A oviposição ocorre em massas, na face superior da planta, preferencialmente ao entardecer (Dew, 1913; Gallo et al., 2002; Sarmiento et al., 2002).

As perdas causadas por *S. frugiperda* variam em relação a diferentes fatores, tais como, cultura afetada, fenologia da planta, cultivar, local de plantio, práticas de manejo adotadas e a intensidade de infestação (Cruz, 1995; Sarmiento et al., 2002; Barros et al., 2010).

Na cultura do milho, os danos podem ser observados em todo o ciclo da cultura. É observada uma preferência pelos cartuchos de folhas jovens, mas o inseto pode

causar injúrias em toda a planta durante todas as fases de desenvolvimento (Cruz, 1995; Gallo et al., 2002; Sarmento et al., 2002; Farinelli e Fornasieri Filho, 2006). Lagartas de primeiro e segundo ínstar realizam raspagens nas folhas de milho, enquanto lagartas a partir do terceiro ínstar alimentam-se do tecido vegetal e penetram no cartucho do milho, causando perfurações que podem levar à destruição completa da planta e consequentes prejuízos à produção da cultura (Barros et al., 2010; Valicente, 2015; Wordell Filho et al., 2016).

Na fase inicial do desenvolvimento do cultivo, esse inseto praga pode danificar plântulas ao se alimentar da região do colo, causando murcha, tombamento e redução do estande da cultura, podendo gerar a necessidade de replantio. Durante a fase reprodutiva, *S. frugiperda* pode danificar o pendão e a espiga, o que prejudica a produção do pólen, a fecundação, o enchimento dos grãos e os grãos em si (Cruz, 1995; Cruz, 1999; Gallo et al., 2002; Sarmento et al., 2002; Farinelli e Fornasieri Filho, 2006; Valicente, 2015; Wordell Filho et al., 2016).

Dentre as ferramentas de controle utilizadas para o manejo de *S. frugiperda*, o controle químico é amplamente empregado na cultura do milho existindo 259 produtos registrados com diversos princípios ativos, como os carbamatos, organofosforados, piretroides, neonicotinoides, espinosinas, diamidas e antranilamidas (AGROFIT, 2023).

Entretanto, apesar da variedade de inseticidas disponíveis, o controle químico é muitas vezes dificultado devido a fatores como (i) o hábito da lagarta de proteger-se dentro do cartucho das plantas, (ii) falhas na aplicação dos agrotóxicos devido à utilização incorreta da tecnologia e (iii) a evolução da resistência de *S. frugiperda* aos diferentes ingredientes ativos (Yu, 1991; Cruz, 1995; Cruz, 1999; Da Cunha e Silva Junior, 2010; Gimenes, 2011; Carvalho et al., 2013; Bass et al., 2015; Omoto et al., 2013; Tavares et al., 2017; Guan et al., 2021).

Além disso, a utilização de inseticidas químicos, em sua maioria de elevada toxicidade e amplo espectro de ação, acarreta em prejuízos ao ecossistema, devido a contaminação do ambiente e eliminação de organismos benéficos, bem como malefícios à saúde humana e à segurança alimentar (Thompson, 2003; Carvalho, 2006; Desneux et al., 2007; Biondi et al., 2012; Abrol e Shankar, 2014; Pisa et al., 2015; Mahmood et al., 2016; Bonner e Alavanja, 2017; Kim et al., 2017; Sponsler et

al., 2019; Rani et al., 2021). Nesse sentido, atualmente, há uma preocupação social maior quanto ao uso indiscriminado de inseticidas, principalmente em países mais tecnificados, o que contribui para o desenvolvimento e utilização de formulações menos nocivas e mais seletivas (Waquil et al., 2002; Carvalho, 2006; Abrol e Shankar, 2014; Mahmood et al., 2016; Bonner e Alavanja, 2017; Rani et al., 2021).

Outra estratégica de controle de *S. frugiperda* envolve a utilização de plantas transgênicas que expressam toxinas do microrganismo *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt). Plantas transgênicas são organismos geneticamente modificados (OGM) que contém inserções gênicas em seu genoma, obtidas por meio de ferramentas da Engenharia Genética (Brasileiro e Carneiro, 1998; Glare e O'Callaghan, 2000; Carneiro et al., 2009; Blanco et al., 2016).

Inicialmente, a tecnologia Bt demonstrou controle satisfatório de lepidópteros pragas, entretanto, atualmente o cenário não é o mesmo. A intensa utilização das plantas transgênicas, associada a não adoção das estratégias de manejo de resistência, gerou elevada pressão de seleção sobre os insetos, resultando em um desenvolvimento acelerado da resistência, o que compromete a eficiência da tecnologia (Storer et al., 2010; Bernardi et al., 2011; Tabashink et al., 2013; Farias et al., 2014; Blanco et al., 2016; Omoto et al., 2016; Fatoretto et al., 2017). Além disso, características genéticas, biológicas e ecológicas de *S. frugiperda* como a frequência inicial de alelos de resistência, o custo adaptativo, a herança da resistência, o hábito polífago, a elevada capacidade reprodutiva, a capacidade de migração a longas distâncias e os mecanismos de detoxificação de compostos inseticidas também contribuem para a evolução acelerada da resistência a moléculas e proteínas inseticidas (Wadleigh e Yu, 1988; Jongsma et al., 1995; Carriere e Tabashnik, 2001; Brioschi et al., 2007; Gassmann et al., 2009; Tabashink et al., 2013; Giraudo et al., 2015).

2.2. Broca da cana

A broca da cana, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae), também conhecida como broca do colmo, é uma espécie nativa do hemisfério ocidental e encontra-se amplamente distribuída pelo continente americano,

principalmente devido a múltiplas introduções por ações humanas de populações da espécie realizadas ao longo do tempo (Roe, 1981; Joyce et al., 2014; Francischini et al., 2019; Echeverri-Rubiano et al., 2022; Fogliata et al., 2022; Pérez et al., 2022).

No Brasil, a espécie é conhecida por ser praga chave em regiões canavieiras. Entretanto, em função do seu hábito oligófago, a broca também causa prejuízos a outras culturas de importância econômica da família Poaceae, como o milho, sorgo e o arroz (Macedo e Botelho, 1988; Long e Hensley, 1972; Arrigoni, 2002; Ferreira et al., 2004; Cruz, 2007; Sandoval e Senô, 2010; Martins et al., 2009; Dinardo-Miranda et al., 2013; Mendes et al., 2014).

A broca do colmo é um inseto holometábolo, apresentando as fases de ovo, larva, pupa e adulto em seu ciclo. A duração do ciclo varia principalmente em função da alimentação, fatores genéticos e condições climáticas (Botelho, 1985; Melo e Parra, 1988; Parra et al., 1999; Parra et al., 2002; Portela et al., 2010; Lopes et al., 2015; Carbognin, 2016; Borges Filho et al., 2018).

Os imaturos dessa espécie podem atingir até 25 mm de comprimento; apresentam coloração clara, linhas amarronzadas dispostas lateralmente no corpo e cápsula cefálica marrom (Mendonça et al., 1996; Gallo et al., 2002; Macedo e Macedo, 2004; Rossato Junior, 2012). A duração da fase larval é influenciada principalmente pela temperatura, sendo mais curta no verão (temperaturas elevadas) e mais longa no inverno (temperaturas amenas), o que faz com que haja variação no número de ínstaes em lagartas oriundas do campo enquanto que, para lagartas criadas em dieta artificial e condições controladas, geralmente são observados seis ínstaes (Costa-Lima, 1950; Cruz, 2007; Costa, 2009; Lopes et al., 2015). Caso as condições para o seu desenvolvimento sejam favoráveis, as gerações da broca do colmo podem ser contínuas ao longo do ano (Botelho e Macedo, 2002; Gallo et al., 2002; Nakano et al., 2002; Cruz et al., 2010).

As pupas, também conhecidas como crisálidas, possuem coloração marrom, medem entre 16 e 20 mm e podem ser encontradas nas galerias formadas pelas lagartas no colmo das plantas. Em condições climáticas favoráveis, a duração do estágio pupal é de aproximadamente 10 dias (Botelho, 1985; Botelho e Macedo, 2002; Parra et al., 2002; Cruz, 2007; Costa, 2009).

Os adultos dessa espécie são mariposas de coloração amarelo-palha, que possuem asas anteriores com manchas escuras e posteriores de coloração branca (Ferreira, 1998; Botelho e Macedo, 2002; Gallo et al., 2002; Parra et al., 2002; Macedo e Macedo, 2004; Costa, 2009). Apresentam baixa capacidade de dispersão devido à reduzida capacidade de voo e, sem o auxílio do vento, alcançam cerca de 200 a 300 m (Caixeta, 2010; Francischini, 2019). Além disso, os indivíduos apresentam dimorfismo sexual, sendo os machos de menor tamanho, maior pigmentação das asas e com cerdas no último par de pernas (Mendonça et al., 1996; Macedo e Macedo, 2004; Cruz, 2007; Dinardo-Miranda, 2008; Costa, 2009; Rossato Junior, 2012).

A oviposição ocorre em massas de camada única que contém ovos que se sobrepõem de maneira semelhante a escamas de peixes. Podem ser encontradas tanto nas folhas como nas bainhas das plantas. A coloração dos ovos varia, sendo esbranquiçada imediatamente após a oviposição e enegrecida próximo a eclosão das lagartas. Após o período embrionário, as lagartas eclodem dos ovos e inicia-se um novo ciclo (Costa-Lima, 1950; Botelho e Macedo, 2002; Gallo et al., 2002; Macedo e Macedo, 2004; Cruz, 2007; Costa, 2009; Rossato Junior, 2012; Mendes et al., 2014).

Durante a fase larval, a broca penetra no interior do colmo das plantas formando galerias devido à alimentação do tecido vegetal. As injúrias causadas reduzem o peso das plantas, tornando-as enfraquecidas e susceptíveis ao tombamento e à quebra (Mendonça et al., 1996; Botelho e Macedo, 2002; Gallo et al., 2002; Parra et al., 2002; Macedo e Macedo, 2004; Cruz, 2007; Dinardo-Miranda, 2008; Sandoval e Senô, 2010; Rossato Junior, 2012; Mendes et al., 2014; Gallan, 2019). Lavouras localizadas em regiões com maior frequência de ventos estão mais propensas a serem mais prejudicadas (Macedo e Macedo, 2004; Cruz, 2007; Mendes et al., 2014).

O ataque a canas jovens pode causar a morte da gema apical, resultando em secamento do ponteiro, sintoma conhecido por “coração morto”. Em canaviais mais desenvolvidos, o ataque resulta no surgimento de brotações laterais e enraizamento aéreo (Mendonça et al., 1996; Botelho e Macedo, 2002; Gallo et al., 2002; Parra et al., 2002; Macedo e Macedo, 2004; Cruz, 2007; Dinardo-Miranda, 2008; Costa, 2009; Sandoval e Senô, 2010; Rossato Junior, 2012). Na cultura do arroz e do sorgo, ao danificar o pedúnculo, a broca compromete o desenvolvimento da panícula, sintoma conhecido por “panícula branca”, que prejudica a formação das espiguetas e,

consequentemente, a granação (Ferreira, 1998; Barrigossi et al., 2004; Mendes et al., 2014; Martins et al., 2019).

Além disso, as perfurações realizadas pelas lagartas permitem a entrada de pragas secundárias e patógenos causadores de podridões (Gallo et al., 2002; Macedo e Macedo, 2004; Costa, 2009; Sandoval e Senô, 2010; Dinardo-Miranda et al., 2012; Rossato Junior, 2012; Mendes et al., 2014; Gallan, 2019). Na cultura da cana-de-açúcar, por exemplo, o complexo broca-podridão compromete a qualidade tecnológica do produto e a produtividade da lavoura, pois a presença dos microrganismos leva à diminuição da pureza do caldo, resultando em menor rendimento do açúcar; interferências na coloração do açúcar produzido, aumento do teor de fibra com consequente aumento da dificuldade para a extração do caldo, inibição do processo fermentativo e inversão da sacarose armazenada na planta, com consequente formação de glucose, frutose, ácidos orgânicos e outras substâncias prejudiciais ao processamento da cana (Blumer, 1992; Stupiello, 2005; Sandoval e Senô, 2010; Dinardo-Miranda et al., 2012; Rossato Junior, 2012; Ferreira, 2013; Mendes et al., 2014; Ferreira et al., 2018; Gallan, 2019).

Em função das lagartas se dirigirem ao interior do colmo das plantas em determinado momento de seu ciclo dificulta o contato de inseticidas com os insetos, reduzindo a eficiência de controle. Em vista disso, destaca-se a importância de monitorar a presença dos insetos em campo, bem como do conhecimento da biologia da espécie, para que seja possível definir o momento correto de utilização do método de controle (Marconato, 1988; Macedo e Macedo, 2004; Costa, 2009; Figueiredo et al., 2010; Avellar e Cruz, 2016). Nesse contexto, Figueiredo et al. (2010) afirma que a broca “passa um período razoável de seu ciclo na parte externa da planta, o que facilitaria o seu controle com medidas biológicas ou químicas”. Foi observado que 100% das lagartas avaliadas encontravam-se no cartucho das plantas de milho até os 12 dias após a eclosão, sugerindo que, nesse período, a utilização de inseticidas químicos ou biológicos seria viável (Figueiredo et al., 2010).

O controle químico da broca na cultura da cana-de-açúcar pode ser realizado utilizando-se inseticidas de diferentes grupos químicos, como antranilamidas, benzoilureias, piretroides, neonicotinoides, pirazóis, espinosinas e diamidas do ácido flúico (AGROFIT, 2023). Na cultura do milho, os inseticidas indicados para o manejo

da broca do colmo são mais escassos, restringindo-se a seis produtos pertencentes ao grupo dos piretroides (AGROFIT, 2023).

Em relação ao controle biológico, são utilizados os parasitoides *Cotesia flavipes* Cameron, 1891 (Hymenoptera: Braconidae) e *Trichogramma galloi* Zuchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) como agentes de controle de *D. saccharalis*, sendo considerado como o maior programa de controle biológico do mundo.

Introduzido no Brasil na década de 1970, *C. flavipes* é um endoparasitoide larval, de origem asiática, que contribui significativamente para a diminuição do impacto da broca sobre a cultura da cana-de-açúcar (Mendonça Filho et al., 1977; Botelho, 1992; Mendonça et al., 1996; Botelho e Macedo, 2002; Bortoli et al., 2017; Nascimento, 2017). De acordo com Sandoval e Senô (2010), desde o início da implantação do programa de controle biológico no estado de São Paulo em 1977, 943 milhões de adultos dessa espécie haviam sido liberados até 1991, reduzindo a porcentagem de intensidade de infestação da broca do colmo de 9% em 1980 para 3,17%.

Associado à utilização de *C. flavipes*, o endoparasitoide *T. galloi* tem se mostrado eficiente no controle de ovos da broca do colmo, principalmente em regiões onde ocorrem altas infestações desse inseto praga e/ou baixa predação de ovos por inimigos naturais (Lopes, 1988; Botelho et al., 1999; Nava et al., 2009; Pinto et al., 2015; Isas et al., 2016).

Entretanto, apesar da ampla utilização dos parasitoides, a eficiência do parasitismo depende, entre outros fatores, da sobrevivência do inseto em campo, da sua capacidade de dispersão, bem como da técnica de liberação e quantidade de indivíduos liberados. Recomenda-se que as liberações desses agentes de controle sejam realizadas em condições ideais de temperatura (amenas) e umidade relativa do ar (elevada), o que nem sempre é possível nas regiões mais quentes e secas do país (Pinto et al., 2014; Emaná, 2007; Nascimento, 2007; Bortoli et al., 2017). Além disso, para *C. flavipes*, devem ser distribuídos 9.000 adultos/ha, através de liberações aéreas ou terrestres, enquanto que para *T. galloi* a recomendação é de 150.000 a 175.000 parasitoides/ha (Botelho e Macedo, 2002; Pinto et al., 2003; Broglio-Micheletti et al., 2007; Pinto et al., 2015).

A utilização de plantas transgênicas que expressam toxinas do microrganismo *Bacillus thuringiensis* também é uma estratégia de manejo da broca do colmo. Em 2017, foram aprovadas pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) duas variedades de cana geneticamente modificadas, resistentes a *D. saccharalis*, CTC9001BT e CTC20BT (Estadão, 2019). Lopes et al. (2022) realizaram uma avaliação tecnológica de quatro cultivares de cana e observaram uma menor Intensidade de Infestação (II) pela broca em CTC20BT em relação às demais variedades.

2.3. Metabólitos secundários de plantas

As plantas e os insetos estão em coevolução a milhares de anos. Devido a essa complexa interação, as plantas desenvolveram ao longo do tempo estratégias de defesa contra o ataque de insetos herbívoros, envolvendo características de natureza química, física e morfológica. Os mecanismos de natureza química estão relacionados à presença de compostos denominados metabólitos secundários.

Metabólitos secundários são moléculas presentes em células especializadas que, apesar de não possuírem um papel essencial no metabolismo primário das plantas, atuam conferindo a estas vantagens adaptativas, como a defesa contra herbívoros. Os principais compostos com atividade inseticida são os terpenoides, compostos nitrogenados, compostos fenólicos e proteínas de defesa (Felton e Gatehouse, 1966; Harbone, 1999; Lattanzio et al., 2009; Rattan, 2010; Ahmed et al., 2017).

2.3.1. Terpenoides

Os terpenoides compõem o maior grupo de compostos secundários de origem vegetal, desempenhando papel importante nas interações herbívoro-planta-fitopatógeno, além das funções exercidas no metabolismo primário das plantas. Encontram-se armazenados em dutos de resina, células oleosas e/ou tricomas glandulares, sendo classificados quanto ao número de átomos de carbono (C) em sua estrutura (Schoonhoven et al., 2005; Ahmed et al., 2017).

Os monoterpenos (10C) e os sesquiterpenos (15C) são responsáveis pela emissão de voláteis em resposta ao ataque de herbívoros, atuando na atração de inimigos naturais, e/ou repelência a fitófagos. Além disso, alguns terpenos são classificados como fitoalexinas, compostos de baixo peso molecular relacionados à defesa contra microrganismos. No grupo dos monoterpenos, destacam-se as piretrinas, grupo de toxinas amplamente utilizado no desenvolvimento de inseticidas piretroides. Os diterpenos (20C) e os triterpenos (30C), por sua vez, podem apresentar toxicidade, ação deterrente e/ou antialimentar, com destaque ao grupo das saponinas como importante classe de diterpenos atuante na defesa contra insetos e microrganismos (Cheng et al., 2007; Rattan et al., 2010; Vizzotto et al., 2010; Tholl, 2015; Boiça Junior et al., 2016).

2.3.2. Compostos nitrogenados

Os compostos nitrogenados são caracterizados pela presença de átomos de nitrogênio (N) em sua estrutura, podendo ser divididos em: alcaloides, glicosídeos e aminoácidos não proteicos.

Os alcaloides são compostos nitrogenados cíclicos que atuam na defesa das plantas contra herbívoros e patógenos por promoverem efeito tóxico e deterrente. Destaca-se a nicotina como importante componente deste grupo, precursora de inseticidas nicotinoides que agem no sistema nervoso dos insetos (Hegnauer, 1988; Schoonhoven et al., 2005; Rattan et al., 2010). Os glicosídeos são compostos que, em resposta ao ataque de herbívoros, liberam substâncias de defesa, como o ácido cianídrico, liberado pela decomposição dos glicosídeos cianogênicos, capazes de inibir a alimentação dos insetos.

Aminoácidos não proteicos são aqueles que não são codificados pelo código genético para serem incorporados às proteínas. Além de potencial interferência na neurotransmissão, os aminoácidos não proteicos análogos dos aminoácidos proteicos podem ser incorporados de maneira errônea às proteínas dos insetos herbívoros que os ingerirem, resultando em enzimas não funcionais e comprometendo o desenvolvimento do herbívoro (Huang et al., 2011).

2.3.3. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são assim classificados devido à presença de um anel aromático contendo uma hidroxila em sua estrutura. Desempenham papel importante na defesa das plantas contra estresses bióticos e abióticos, através de mecanismos bioquímicos e estruturais de resistência (Stangarlin, 2011; Lattanzio, 2013; Ahmed et al., 2017). Os principais compostos fenólicos são os flavonoides, ácidos fenólicos, cumarinas, ácido benzoico e polímeros como os taninos e as ligninas.

Os flavonoides, maior classe de fenóis, atuam na redução de estresses às plantas, e/ou interferindo na alimentação, oviposição e desenvolvimento dos insetos herbívoros (Harbone, 1991; Treutter, 2006). Os ácidos fenólicos e as cumarinas, em situações de estresse, são produzidos em elevadas concentrações pelas plantas. Já o ácido benzoico, presente em óleos essenciais, apresenta a característica de repelência a herbívoros (Boiça Junior et al., 2016).

Os taninos são polímeros de elevado peso molecular, conhecidos por afetarem negativamente os insetos fitófagos devido à lesões causadas no intestino médio, além de diminuir a eficiência de absorção dos nutrientes e reduzir a taxa de consumo devido à baixa palatabilidade (Barbehenn e Constabel, 2011; Boiça Junior et al., 2016).

As ligninas, por sua vez, encontram-se amplamente distribuídas no reino vegetal, sendo essenciais para o desenvolvimento das plantas. Por serem compostos resistentes, estáveis, que se ligam covalentemente a diversas moléculas, as ligninas são capazes de reduzir significativamente a digestibilidade do tecido vegetal. Além disso, alguns vegetais são capazes de lignificar áreas danificadas, impedindo ou retardando novos ataques (Stangarlin, 2011; Boiça Junior et al., 2016).

2.3.4. Proteínas de defesa

Proteínas de defesa que comprometem o desenvolvimento dos insetos por interferirem em sua nutrição são consideradas antinutritivas. Essa interferência pode ocorrer de diferentes formas: (i) por interação direta e consequente indisponibilização de um nutriente essencial; (ii) por interações com receptores gustativos; (iii) por

inibição de enzimas digestivas; (iv) por interações com as células do intestino médio (Felton e Gatehouse, 1966). Dentre as proteínas de defesa, destacam-se os inibidores de proteases.

Inibidores de proteases são compostos que, ao serem ingeridos por insetos herbívoros, inativam temporariamente uma parcela das proteases digestivas responsáveis pelo processo de digestão primária do alimento (Oliveira e Macedo, 2011; Pinto et al., 2018).

Proteases são as enzimas responsáveis por catalisar a hidrólise das ligações peptídicas presentes em proteínas. De acordo com a natureza do grupo funcional presente em seu sítio ativo, as proteases podem ser classificadas em: serino proteases, aspartil proteases, cisteíno proteases e metalo proteases. As serino proteases, como tripsinas e quimotripsinas, são as enzimas digestivas predominantes em lepidópteros imaturos (Terra e Ferreira, 2005; Srinivasan et al., 2006).

A digestão química do alimento consumido por lagartas da Ordem Lepidoptera ocorre no intestino médio, o qual é compartimentalizado pela membrana peritrófica (Ferreira et al., 1994; Terra et al., 1996; Hegedus, 2009). Após a ingestão, o alimento atravessa o intestino anterior e alcança o interior da membrana peritrófica que contém as serinoproteases (tripsina e quimotripsina) que realizarão a digestão inicial. As proteases localizadas no interior da membrana peritrófica reduzem o peso molecular das proteínas ingeridas permitindo que os produtos dessa digestão inicial atravessem a membrana peritrófica e sejam posteriormente digeridos (digestão intermediária e final) e absorvidos pelas células do epitélio, nutrindo o inseto (Terra e Ferreira, 2005; Rossi, 2015).

Portanto, ao inibirem a atividade das proteases, os inibidores reduzem a digestão primária do alimento e, conseqüentemente, a disponibilidade de oligômeros de proteínas que atravessarão a membrana peritrófica do herbívoro e não haverá os processos de digestão intermediária e final (quebra dos oligômeros de proteínas em aminoácidos), prejudicando a nutrição do inseto e acarretando em prejuízos ao seu desenvolvimento (Ryan, 1990; Lehane e Billingsley, 1996; Prasad et al., 2010; Silva et al., 2011; El-Latif, 2014).

2.4. *Coffea racemosa* Lour.

Uma espécie selvagem de café, *Coffea racemosa* Lour., vem sendo estudada como fonte de moléculas inseticidas devido à resistência que possui a uma praga-chave da cultura do café, o bicho mineiro do cafeeiro, *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville & Perrottet, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae) (Medina Filho et al., 1977; Guerreiro Filho et al., 1991; Ramiro et al., 2004; Alves et al., 2011; Souza, 2019).

A resistência de diferentes variedades de café ao ataque do bicho mineiro foi avaliada, em condições de campo, por Medina Filho et al. (1977). Diante dessa avaliação, *C. racemosa* demonstrou reduzida porcentagem de folhas atacadas pelo inseto, indicando algum grau de resistência à praga, hipótese que foi fundamentada por Guerreiro Filho et al. (1991) ao classificarem a espécie como moderadamente resistente à *L. coffeella*, em um estudo que buscou fontes de resistência ao inseto entre variedades cultivadas e selvagens de café.

Ramiro et al. (2004) observaram que essa resistência não parece estar relacionada com a morfologia foliar da planta, uma vez que não houve diferença quanto à espessura dos tecidos foliares de *Coffea arabica*, espécie suscetível ao bicho mineiro, *C. racemosa* e híbridos gerados entre as duas espécies. Observou-se, no entanto, crescimento reduzido do bicho mineiro em *C. racemosa*, sugerindo a presença de compostos químicos nas células do parênquima paliádico que influenciam a alimentação e o desenvolvimento do inseto.

Buscando analisar os efeitos desses compostos químicos presentes em *C. racemosa* sobre *L. coffeella*, Alves et al. (2011) realizaram testes de oviposição com chance de escolha e teste de efeito ovicida, em plantas de *C. arabica* pulverizadas com extrato metanólico de *C. racemosa*. Foi observada redução na preferência por oviposição nas plantas pulverizadas, além de redução na eclosão de larvas dos ovos pulverizados, corroborando com a hipótese de Ramiro et al. (2004) quanto à presença de metabólitos secundários, com atividade repelente e inseticida.

Visando à transferência da característica de resistência dessa espécie silvestre para variedades comerciais de café, *C. racemosa* continuou sendo utilizada no melhoramento genético do cafeeiro. Lançada em 2014 pela Fundação Procafé, a cultivar Siriema AS1, híbrido entre *C. racemosa* e *C. arabica*, tem demonstrado

resultados satisfatórios para o manejo do bicho mineiro (Matiello et al., 2016; Matiello et al., 2019; Costa et al., 2018).

Além de sua utilização para a geração de híbridos resistentes, *C. racemosa* é uma importante fonte de moléculas potencialmente inseticidas, passíveis de serem utilizadas no manejo de lepidópteros pragas. A presença de inibidores de tripsinas digestivas de lagartas de *S. frugiperda* em folhas de *C. racemosa* com potencial de interferência sobre o desenvolvimento de imaturos dessa espécie foi previamente observada (Souza, 2019).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Extratos enzimáticos dos intestinos das lagartas

Lagartas de *S. frugiperda* e *D. saccharalis*, obtidas de criação estabelecida em laboratório, próximas ao último ínstar foram colocadas em gelo (10 min) e tiveram suas cabeças e extremidades posteriores retiradas. As lagartas foram dissecadas em solução salina (NaCl 125 mM) e seus intestinos foram retirados após um corte longitudinal feito na região ventral das lagartas. O intestino médio das lagartas foi separado do intestino posterior por meio de um corte transversal no ponto de inserção dos túbulos de Malpighi no intestino posterior. Os intestinos médios contendo suas membranas peritrófica e seus respectivos conteúdos foram macerados em homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem na proporção de 3 intestinos médios de *S. frugiperda* para 1 mL de água (4°C) e 5 intestinos médios de *D. saccharalis* para 1 mL de água (4°C). Os pesos das lagartas (aproximadamente 916 mg para *S. frugiperda* e 740 mg para *D. saccharalis*) e dos intestinos médios dissecados (aproximadamente 330 mg para *S. frugiperda* e 200 mg para *D. saccharalis*) foram medidos. Após homogeneização dos intestinos, o homogeneizado foi centrifugado (10.000xg, 10 min, 4°C) e o sobrenadante utilizado como fonte de enzimas solúveis nos ensaios de atividade enzimática. Os extratos enzimáticos foram armazenados a -20°C.

3.2. Extrato de folhas de *Coffea racemosa*

Folhas jovens de *C. racemosa* de tamanho e aspectos visuais padronizados foram coletadas e submetidas a liofilização por 24h. Em seguida, o tecido foliar foi macerado em almofariz e pistilo. Ao pó obtido, foi adicionada água (4°C) em uma proporção de 1:5 (peso de folhas:volume de água) e a extração do inibidor ocorreu em um agitador orbital a 4°C sob agitação de 150 rpm por 30 min. Decorrido esse tempo, a amostra foi centrifugada (10.000xg, 10 min, 4°C) e o sobrenadante coletado como fonte de inibidor. O extrato contendo o inibidor foi armazenado a -20°C.

3.3. Detecção da atividade de tripsinas digestivas das lagartas

A atividade de tripsina no intestino das lagartas foi determinada utilizando os extratos enzimáticos dos intestinos das lagartas em avaliação e o substrato BapNA a 1,0875 mM preparado em tampão glicina-NaOH 0,1 mM pH=9,0 (Erlanger et al., 1961). O ensaio foi realizado a 30°C de maneira cinética com leituras de absorbância realizadas a cada 1 min em espectrofotômetro regulado no comprimento de onda de 410 nm. O extrato enzimático foi diluído de forma a obter resultados proporcionais à diluição e foram utilizados 40 µL de extrato enzimático diluído 40x e 160 µL do substrato.

Uma unidade de tripsina (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para a formação de 1 nmol de p-nitroanilina/min e foi calculada utilizando-se uma curva padrão de p-nitroanilina ($4,785x + 0,0339$; $R^2=0,9997$) (Erlanger et al., 1961). A atividade de tripsinas digestivas foi expressa em unidades de tripsina por grama de intestino (U/g de intestino).

3.4. Inibição da atividade de tripsinas digestivas das lagartas pelo extrato foliar

A inibição de tripsinas digestivas de lagartas de *S. frugiperda* e *D. saccharalis* causada pelo extrato de folhas de *C. racemosa* foi determinada pela comparação de um ensaio cinético da atividade de tripsina dos insetos em avaliação com um ensaio da atividade de tripsina em reações contendo o extrato de folhas de *C. racemosa* (solução inibidora). Os dados de inibição de tripsinas digestivas foram expressos em porcentagem (%) relativa às atividades observadas nas reações sem o inibidor (100%

de atividade). Os ensaios de inibição continham 40 µL do extrato foliar, 40 µL do extrato enzimático (40x diluído) e 160 µL do substrato BApNA. A reação controle continha 40 µL de água em vez do extrato foliar de *C. racemosa*.

3.5. Filtração molecular do extrato foliar

O extrato de folhas de *C. racemosa* foi submetido à filtração molecular, técnica de purificação baseada no fracionamento de moléculas por exclusão de tamanho em coluna cromatográfica. As frações obtidas nesse processo foram utilizadas em avaliações bioquímicas e biológicas para verificação dos efeitos sobre as lagartas em estudo. Para isso, o extrato foliar (item 3.3) foi liofilizado e concentrado 10x. A amostra concentrada foi submetida a filtração molecular em coluna cromatográfica (39 cm de altura, 2,5 cm de diâmetro) contendo a resina Sephadex™ G-25 (GE HealthCare, Uppsala, Sweden) ocupando 27 cm de altura da coluna. A vazão foi ajustada para 1,5 mL/min e as frações eluídas foram analisadas em espectrofotômetro a 280 nm para detecção da presença de proteínas e grupos aromáticos como moléculas fenólicas. Para isso, 200 µL de cada fração foram colocados em placas de 96 poços compatíveis com leitura UV (Corning, Kennebunk, ME, USA). De acordo com o perfil de eluição observado, as frações foram reunidas em grupos de moléculas de peso molecular similar.

3.6. Inibição de tripsinas digestivas das lagartas pelos grupos de frações formados após filtração molecular

A inibição de tripsinas digestivas de lagartas de *S. frugiperda* e *D. saccharalis* associada a cada grupo de frações formados após filtração molecular do extrato de folhas de *C. racemosa* foi determinada pela comparação de um ensaio cinético contendo os grupos de frações nas reações, com um ensaio no qual o volume dos grupos de frações foi substituído pelo mesmo volume de água. Para isso, foram adicionados 40 µL de cada grupo de frações (40 µL de água no controle), 40 µL do extrato enzimático e 160 µL do substrato BapNA (1,0875 mM) (Sigma Aldrich, St. Louis, CA, USA). Foram realizadas leituras de absorbância a cada 1 min em

espectrofotômetro regulado no comprimento de onda de 410 nm. Os dados de inibição de tripsinas digestivas foram expressos em porcentagem (%) relativa às atividades observadas nas reações sem o inibidor (100% de atividade).

3.7. Efeitos do extrato foliar fracionado sobre o desenvolvimento das lagartas

Os grupos de frações obtidos após a etapa de filtração molecular do extrato de folhas de *C. racemosa* foram quantificados em termos de proteínas totais (Bradford, 1976) utilizando o reagente de Bradford (Sigma Aldrich, St. Louis, CA, USA). A concentração de proteínas totais foi calculada e, em seguida, as amostras foram liofilizadas e ressuspensas em água deionizada para obtenção de concentração de 23 µg/mL em cada grupo de frações.

Os grupos de frações concentrados foram utilizados para observação de suas interferências sobre o desenvolvimento de lagartas de *S. frugiperda* e *D. saccharalis* por meio de aplicação dos grupos sobre a superfície das dietas dos insetos em avaliação. As dietas utilizadas para avaliação do desenvolvimento de lagartas de *S. frugiperda* e *D. saccharalis* foram preparadas, respectivamente, de acordo com Kasten et al. (1978) e Hensley e Hammond Jr. (1968). Os grupos de frações foram aplicados (23 µg/mL em um volume final de 2000 µL) sobre a superfície (aproximadamente 3,14 cm²) das dietas utilizadas.

As lagartas foram individualizadas e mantidas em recipientes de plástico (7 cm de diâmetro x 4,5 cm de altura), sob condições de 25°C e fotofase de 12h durante todo o ciclo de desenvolvimento. Parâmetros biológicos como peso das lagartas aos 7º e 14º dias após o início da alimentação, peso das pupas em 24h após formação, duração do período larval, duração do período de desenvolvimento (larval-adulto) e viabilidade da fase imatura (larval e pupal) foram avaliados em relação a um controle no qual os insetos das espécies em estudo se desenvolveram em dieta padrão sem adição do extrato foliar. O controle foi preparado pela adição de volume de água em vez de extrato bruto ou grupos de frações do extrato bruto.

O experimento foi realizado em delineamento experimental inteiramente casualizado com 7 tratamentos no total, 5 referentes aos 5 grupos de frações obtidos após filtração molecular, 1 tratamento referente ao extrato foliar bruto de *C. racemosa*

e 1 controle sem adição do extrato foliar. Cada tratamento possuiu aproximadamente 50 (cinquenta) repetições sendo cada repetição composta por 1 (uma) lagarta de *S. frugiperda* ou *D. saccharalis*.

Os dados obtidos foram testados para observação de distribuição normal (teste de Cramer-von Mises, $\alpha=0.05$) e homogeneidade das variâncias (teste de Bartlett, $\alpha=0.05$ e/ou análise de Box-Cox). Os dados que apresentavam os requisitos de distribuição normal e homogeneidade de variâncias foram analisados por ANOVA ($\alpha=0,05$) e, quando indicado efeito significativo, as médias dos tratamentos foram comparadas pelos testes de Tukey ($\alpha=0,05$). Os dados que não apresentaram os requisitos de distribuição normal e homogeneidade de variâncias foram analisados por Kruskal Wallis ($\alpha=0,05$) e, quando indicado efeito significativo, as médias dos tratamentos foram agrupadas com a correção de Bonferroni. As análises foram realizadas utilizando o programa R (R Core Team, 2020).

4. RESULTADOS

4.1. Atividade e inibição de tripsinas digestivas pelo extrato de folhas de *Coffea racemosa*

A atividade de tripsinas digestivas de *S. frugiperda* foi aproximadamente 2057 U/g de intestino (Fig. 1A) enquanto a atividade de tripsinas digestivas de *D. saccharalis* foi aproximadamente 778 U/g de intestino (Fig. 1B). Nas reações contendo o extrato foliar de *C. racemosa* foi possível observar inibição significativa na atividade de tripsina tanto para *S. frugiperda* ($F_{1,4}=986,52$; $p<0,001$) como para *D. saccharalis* ($F_{1,4}=1560,85$; $p<0,001$) (Fig. 1A e 1B).

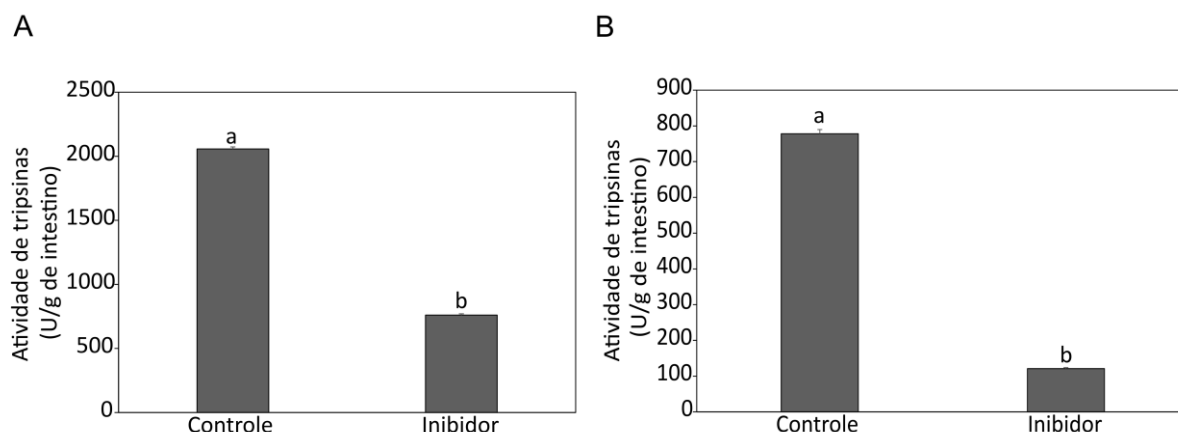


Figura 1. Atividade de tripsinas digestivas de *Spodoptera frugiperda* (A) ou *Diatraea saccharalis* (B) em unidades de tripsina por grama de tecido (U/g de intestino) nos tratamentos controle e contendo extrato de folhas de *Coffea racemosa*. Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si por ANOVA ($p \leq 0,05$).

De maneira comparativa entre as duas espécies de lepidópteros, foi possível observar que o extrato de folhas de *C. racemosa* resultou em uma inibição superior (~84%) da atividade de tripsinas digestivas de *D. saccharalis* em relação à inibição das tripsinas digestivas de *S. frugiperda* (~64%) ($F_{1,4}=1204,15$; $p < 0,001$) (Figura 2).

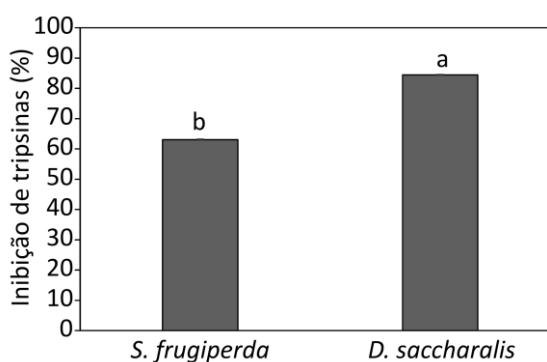


Figura 2. Inibição de tripsinas digestivas (%) de lagartas de *Spodoptera frugiperda* e *Diatraea saccharalis* pelo extrato de folhas de *Coffea racemosa*. Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si por ANOVA ($p \leq 0,05$).

4.2. Filtração molecular do extrato de folhas de *Coffea racemosa*

A filtração molecular do extrato foliar resultou em um perfil de eluição que foi utilizado para o agrupamento de frações de acordo com a absorção a 280 nm e pesos

moleculares similares. Foram observados dois picos de absorbância a 280 nm e, a partir dessa observação, definiu-se que as frações de 1 a 20 como pertencentes ao Grupo 1 e foram descartadas em função de representarem o volume morto da coluna. As frações 21 a 31 (primeiro pico) compuseram o Grupo 2, as frações 32 a 42 (primeira região entre picos) compuseram o Grupo 3, as frações 43 a 53 (segunda região entre picos) compuseram o Grupo 4, as frações 54 a 64 (segundo pico) compuseram o Grupo 5 e as frações 65 a 80 (final da corrida) compuseram o Grupo 6 (Figura 3).

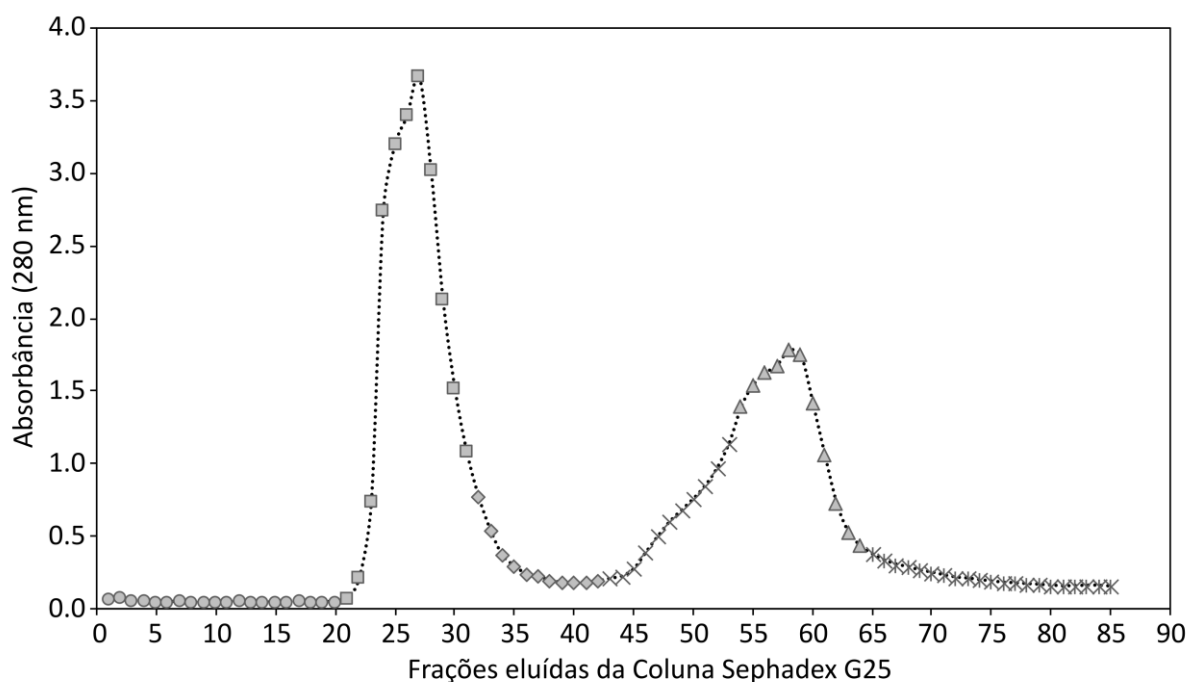


Figura 3. Perfil de eluição gerado pela filtração molecular do extrato de folhas de *Coffea racemosa* utilizando Sephadex G-25 observado em espectrofotômetro regulado no comprimento de onda de 280 nm. Frações 1 a 20 compõem o G1 (°); frações 21 a 31 compõem o G2 (□); frações 32 a 42 compõem o G3 (◇); frações 43 a 53 compõem o G4 (×); frações 54 a 64 compõem o G5 (△); frações 65 a 80 compõem o G6 (*).

A maior concentração de proteínas totais quantificada pelo método de Bradford foi observada em G2 (0,66 µg/mL), o que corrobora o esperado para esse tipo de cromatografia. Não foram detectadas proteínas nas frações G3 e G5, e apenas 0,11 µg/mL em G4 e 0,31 µg/mL em G6. Somando-se o perfil de eluição (Figura 3) com a quantificação de proteínas totais, sugere-se que todas as proteínas eluíram em

G2 e apenas moléculas não proteicas que interferem no ensaio de Bradford foram detectadas nos grupos G4 e G6.

4.3. Efeitos do extrato foliar de *Coffea racemosa* sobre a atividade de tripsinas e o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda*

O fracionamento do extrato foliar de *C. racemosa* resultou em 5 grupos de frações (G2-G6). Ao serem analisados quanto ao poder de inibição de tripsinas digestivas de *S. frugiperda*, observou-se que a inibição de tripsinas digestivas ocorreu apenas G2, G3 e G4 ($F_{5,12}=20,90$; $p<0,0001$) (Figura 4).

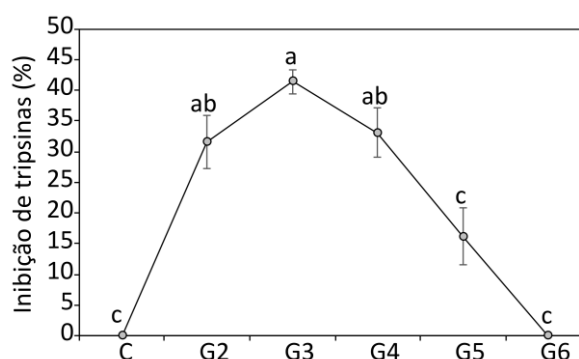


Figura 4. Inibição de tripsinas (%) de *Spodoptera frugiperda* na presença do conteúdo dos grupos de frações do extrato foliar de *Coffea racemosa* (G2-G6) obtidos após filtração molecular em Sephadex G-25. C= inibição de tripsinas na ausência do extrato de *C. racemosa*. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

Em função da inibição de tripsinas ter sido observada no grupo G2, sugere-se que tal inibição ocorra em função de um inibidor proteico. Já as inibições observadas para os grupos G3 e G4, sugere-se que sejam devidas a inibidores não proteicos, pois as frações G3 e G4 não apresentaram proteínas (nulo ou baixo valor pela quantificação por Bradford e eluição após o primeiro pico na cromatografia).

Em termos do desenvolvimento biológico de *S. frugiperda*, o extrato de folhas de *C. racemosa* não resultou na mortalidade larval tanto na forma de extrato bruto (EB) como pelos grupos de frações produzidos ($F_{6,28}=1,60$; $p=0,1829$). Porém, fatores

de desenvolvimento foram afetados pelo consumo do extrato bruto ou dos grupos de frações.

O peso das lagartas de *S. frugiperda* foi avaliado aos 7 dias após o início da alimentação foi reduzido pelo consumo dos grupos G2 e G4 (contém inibição de tripsinas) e G5 (não contém inibição de tripsinas) ($F_{6,245}=9,45$; $p<0,05$) (Figura 5A). Com o passar do tempo de alimentação, observou-se aos 14 dias que tanto o extrato bruto como os grupos G2, G3 e G4 (contém inibição de tripsina) e os grupos G5 e G6 (não contém inibição de tripsina) resultam em redução do peso larval de *S. frugiperda* ($F_{6,246}=11,44$; $p<0,05$) (Figura 5B).

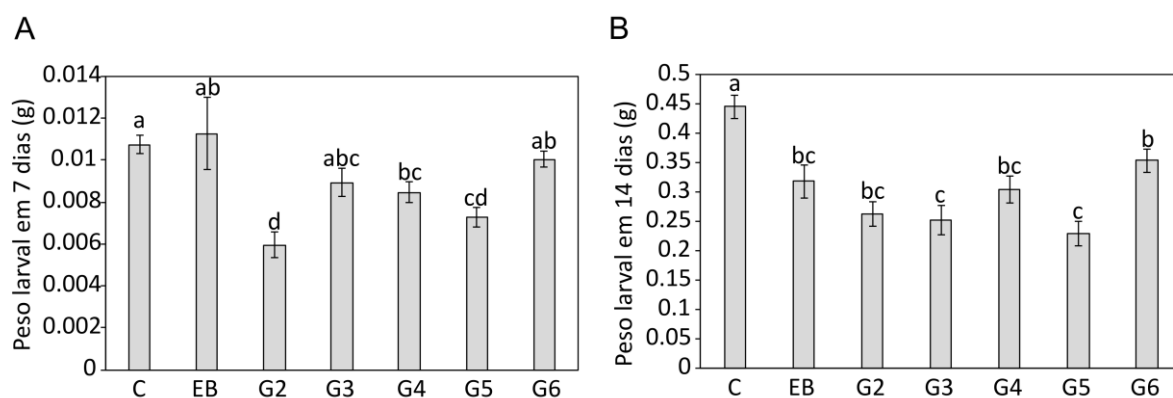


Figura 5. Peso (g) das lagartas de *Spodoptera frugiperda* aos 7 (A) e 14 (B) dias após o início da alimentação com o extrato de folhas de *Coffea racemosa*. C= dieta sem extrato de *C. racemosa*. EB=dieta contendo extrato bruto das folhas de *C. racemosa*. G=dietas contendo grupos de frações do extrato de *C. racemosa* obtidos por filtração molecular. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p>0,05$).

O ganho de peso entre o 7º e 14º dias após o início da alimentação das lagartas de *S. frugiperda* apresentou resultados iguais ao peso observado no 14º dia ($F_{6,246}=11,39$; $p<0,05$), resultado que sugere que os efeitos do consumo dos tratamentos não é claramente observado em 7 dias (Figura 6A). O peso das pupas de *S. frugiperda* foi medido 24h após a ecdise e observou-se redução do peso das pupas para os tratamentos em que houve consumo do extrato bruto EB, G3, G4, G5 e G6 ($F_{6,236}=6,38$; $p<0,05$).

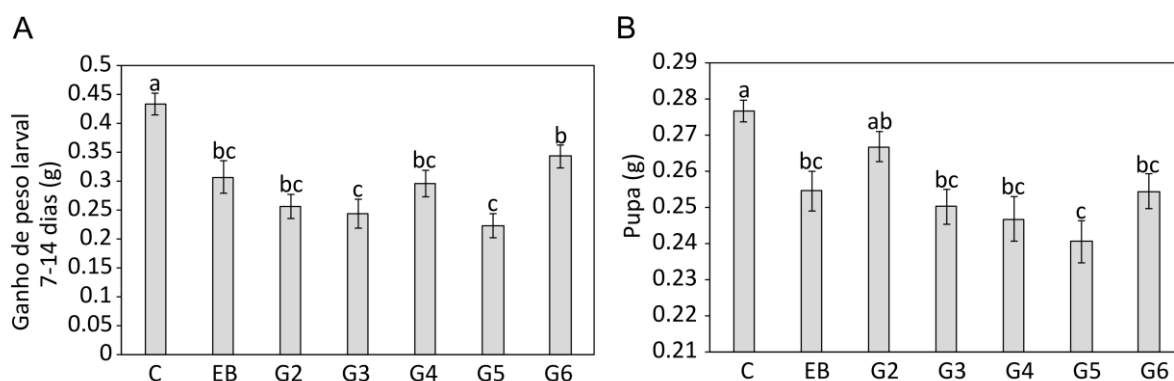


Figura 6. Ganho de peso (g) entre 7 e 14 dias após o início da alimentação das lagartas de *Spodoptera frugiperda* (A) e peso (g) de pupas de *S. frugiperda* (B) em 24 horas após serem formadas a partir de lagartas alimentadas com o extrato de folhas de *Coffea racemosa*. C= dieta sem extrato de *C. racemosa*. EB=dieta contendo extrato bruto das folhas de *C. racemosa*. G=dieta contendo grupos de frações do extrato de *C. racemosa* obtidos por filtração molecular. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p>0,05$).

Em relação à duração do período larval de *S. frugiperda*, todos os tratamentos exceto G6 resultaram em prolongamento da fase larval de aproximadamente 3 dias ao consumir o extrato bruto de folhas de *C. racemosa* ou os grupos de frações obtidos por filtração molecular ($H_6=58,13$; $p<0,05$) (Figura 7A). Em relação à duração do período de desenvolvimento de lagarta neonata a adulto, houve prolongamento similar ao observado para o período larval, com todos os tratamentos exceto G6 implicando em prolongamento do período de desenvolvimento de *S. frugiperda* ($H_6=37,17$; $p<0,05$) (Fig. 7B).

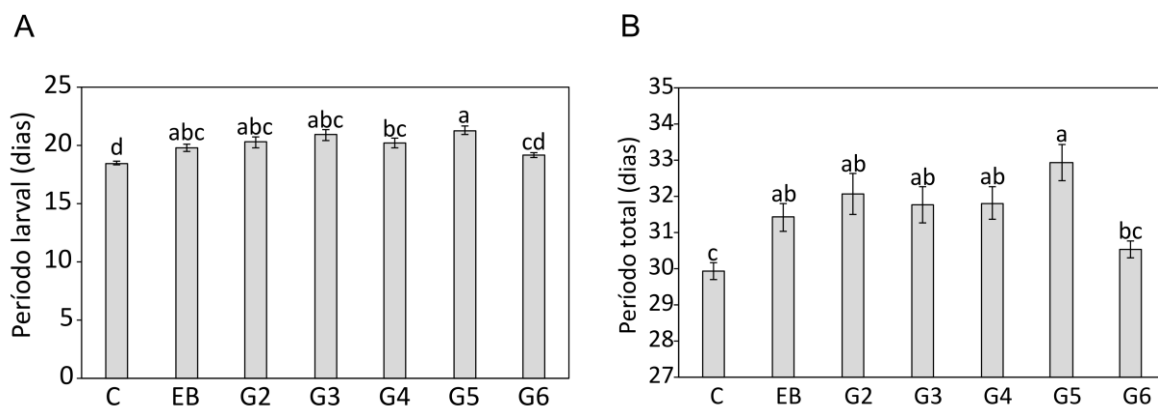


Figura 7. Duração do período larval (A) e duração do período de desenvolvimento de lagartas neonatas a adultos (B) (dias) de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com o extrato de folhas de *Coffea racemosa*. C= dieta sem extrato de *C. racemosa*. EB=dieta contendo extrato bruto das folhas de *C. racemosa*. G=dietas contendo grupos de frações do extrato de *C. racemosa* obtidos por filtração molecular. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Kruskal Wallis ($p>0,05$).

4.4. Efeitos do extrato foliar de *Coffea racemosa* sobre a atividade de tripsinas e o desenvolvimento de *Diatraea saccharalis*

Assim como observado para inibição de tripsinas de *S. frugiperda*, os grupos G2, G3 e G4 inibiram a atividade de tripsinas digestivas de *D. saccharalis* ($F_{5,12}=63,26$; $p<0,05$) (Fig. 8). Porém, diferente de *S. frugiperda*, a inibição das tripsinas de *D. saccharalis* promovida pelo grupo G2 (~35%) foi superior à inibição observada no grupo G3 (~20%) e as inibições promovidas pelos grupos G2 e G3 foram superiores à observada no G4 (~12,5%).

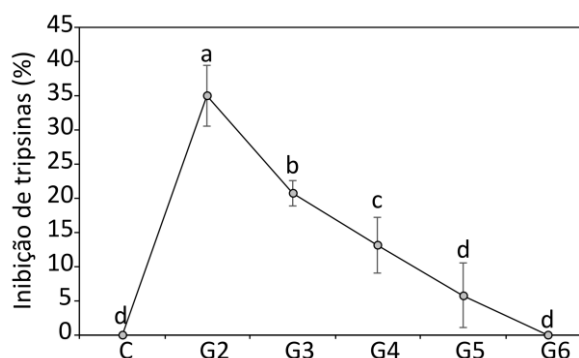


Figura 8. Inibição de tripsinas digestivas (%) de *Diatraea saccharalis* na presença do conteúdo dos grupos de frações do extrato foliar de *Coffea racemosa* (G2-G6) obtidos após filtração molecular em Sephadex G-25. C= inibição de tripsinas na ausência do extrato de *C. racemosa*. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

Diferente de *S. frugiperda*, o consumo do extrato bruto de *C. racemosa* bem como das frações G3, G4 e G5 resultaram em valores de mortalidade larval de *D. saccharalis* (Figura 9).

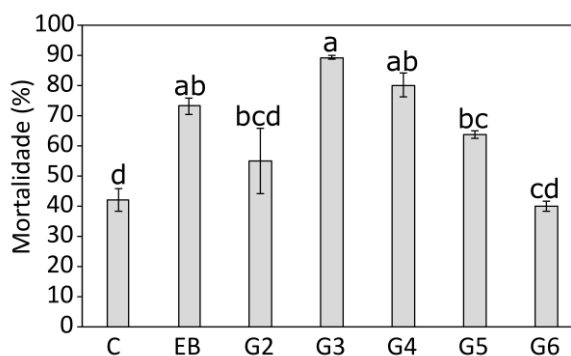


Figura 9. Mortalidade (%) de *Diatraea saccharalis* após o início da alimentação com o extrato de folhas de *Coffea racemosa*. C= dieta sem extrato de *C. racemosa*. EB=dieta contendo extrato bruto das folhas de *C. racemosa*. G=dietas contendo grupos de frações do extrato de *C. racemosa* obtidos por filtração molecular. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p>0,05$).

Entre as lagartas de *D. saccharalis* que sobreviveram ao consumo do extrato bruto e das frações, não foram observadas diferenças significativas em relação ao

controle em termos de peso larval aos 7 dias após o início da alimentação ($F_{6,107}=4,43$; $p<0,05$), peso larval aos 14 dias após o início da alimentação ($F_{6,107}=4,43$; $p<0,05$), ganho de peso entre 7 e 14 dias após o início da alimentação ($F_{6,107}=4,43$; $p<0,05$), peso de pupas ($F_{6,104}=2,18$; $p=0,051^{ns}$), período de desenvolvimento larval ($H_6=7,27$; $p=0,30^{ns}$) e período de desenvolvimento de lagartas neonatas a adultos ($H_6=1,02$; $p=0,99^{ns}$).

5. DISCUSSÃO

Entre os insetos, diferenças de hábitos alimentares levam a especializações do sistema digestivo. Mesmo entre insetos da mesma ordem, a amplitude de hospedeiros utilizada pelo herbívoro pode ser uma consequência da capacidade do sistema digestivo em digerir ou detoxificar determinados substratos. No caso dos lepidópteros em avaliação, observou-se que a atividade de tripsinas digestivas detectada (U/g de intestino) foi superior em lagartas de *S. frugiperda* em relação à atividade observada em *D. saccharalis*. A amplitude de hospedeiros vegetais utilizada por *S. frugiperda* descrita como superior a 300 espécies vegetais (Barros et al., 2010; Bueno et al., 2011; Montezano et al., 2018; Oliveira et al., 2019) é superior à observada para *D. saccharalis* que utiliza-se preferencialmente de plantas da família Poaceae como a cana-de-açúcar, o milho, o sorgo e o arroz como hospedeiros, plantas com baixa concentração de inibidores de proteases em suas folhas (Arrigoni, 2002; Ferreira et al., 2004; Cruz, 2007; Martins et al., 2009; Mendes et al., 2014). Aparentemente, uma maior atividade de tripsinas digestivas é um dos fatores que permitem *S. frugiperda* explorar mais hospedeiros vegetais que *D. saccharalis*.

Adicionalmente, a atividade residual de tripsinas digestivas de *S. frugiperda* foi superior à atividade residual de tripsinas digestivas de *D. saccharalis* quando expostas a um extrato bruto de folhas de *C. racemosa*. Possivelmente, a atividade residual superior de tripsinas em *S. frugiperda* também auxiliou esse inseto a sofrer prejuízos menos intensos ao seu desenvolvimento em relação às lagartas de *D. saccharalis* que apresentaram altos valores de mortalidade ao ingerirem o extrato de *C. racemosa* e os grupos formados após o fracionamento em filtração molecular.

Os ensaios de inibição foram conduzidos com extratos enzimáticos de lagartas não expostas a inibidores de tripsinas e as condições *in vitro* utilizadas não permitiram respostas dos insetos à exposição ao inibidor. Dessa forma, além da atividade residual superior, as lagartas de *S. frugiperda* também podem ter apresentado resultados superiores de tolerância à presença de inibidores de tripsinas em relação a lagartas de *D. saccharalis* em função de serem capazes de alterar sua expressão gênica para superarem o consumo de inibidores de proteases (Paulillo et al., 2000; Brioschi et al., 2007; Oliveira et al., 2013; Souza et al., 2016).

Além da maior amplitude de utilização de hospedeiros, é conhecido o elevado potencial adaptativo de *S. frugiperda* a moléculas e proteínas inseticidas devido à presença de mecanismos de detoxificação que permitem com que a espécie consuma hospedeiros com diferentes aleloquímicos vegetais (Wadleigh e Yu 1987; Jongsma et al. 1995; Brioschi et al. 2007; Li et al. 2007; Fatoretto et al. 2017; Carvalho et al. 2018).

Em contrapartida, os inibidores de proteases exercem atividade antinutricional marcante sobre lagartas neonatas de *D. saccharalis* que resultam em mortalidade, redução do peso larval e deformações nos indivíduos adultos formados a partir de lagartas que ingeriram os inibidores de proteases (Pompermayer et al., 2001; Pompermayer et al., 2003; Paulillo et al., 2012; Ramos et al., 2012). Dessa forma, nota-se que as espécies avaliadas apresentam diferentes tolerâncias ao consumo de inibidores de proteases.

A identidade dos compostos com atividade inseticida continua desconhecida. No presente trabalho, uma purificação parcial por filtração molecular dos compostos de folhas de *C. racemosa* foi realizada e a inibição de tripsinas digestivas foi utilizada como foco das investigações. Na filtração molecular, moléculas de reduzido peso molecular penetram nos poros da resina (no caso, Sephadex G-25), movimentam-se lentamente ao longo da coluna e, conseqüentemente, são eluídas apenas ao final do processo. Por outro lado, moléculas de elevado peso molecular como as proteínas não penetram nos poros da resina, movimentam-se mais rapidamente e são eluídas nas primeiras frações (Gelotte, 1960).

O grupo de frações G2 foi formado por uma mistura de moléculas proteicas de maior peso molecular, entre elas, proteínas associadas com a inibição de proteases dos insetos avaliados. O segundo pico, mais especificamente G4, é composto por

moléculas não proteicas de baixo peso molecular, muito provavelmente, por moléculas fenólicas pois absorveram luz a 280 nm e são conhecidas por serem metabólitos secundários com atividade inseticida.

A mortalidade de *D. saccharalis* não foi correlacionada com a fração proteica (G2, maior poder de inibição de tripsinas de *D. saccharalis*). Valores superiores de mortalidade de *D. saccharalis* foram observados para as frações não proteicas (G3, G4 e G5, sendo G3 e G4 com poder de inibição de tripsinas de *D. saccharalis*). Dessa forma, sugere-se que moléculas não proteicas de *C. racemosa* foram as que mais contribuíram para a mortalidade de *D. saccharalis*, podendo essas serem ativas ou não na inibição de tripsina digestiva de *D. saccharalis*.

Historicamente, as plantas são importantes fontes de moléculas inseticidas que podem ser utilizadas tanto na forma de produtos naturais como no desenvolvimento de produtos sintéticos. A aplicabilidade dos metabólitos secundários no manejo de insetos pragas é bastante variável. Moléculas como a nicotina e piretrina de plantas, por exemplo, serviram como moldes para o desenvolvimento de inseticidas nicotinoides e piretroides. Por isso, a aplicação de processos mais refinados de purificação, com posteriores avaliações biológicas poderão permitir uma melhor identificação das moléculas proteicas e não proteicas relacionadas à toxicidade do extrato de folhas de *C. racemosa* a *D. saccharalis*.

6. CONCLUSÕES

A atividade de tripsinas digestivas no intestino de lagartas de *Spodoptera frugiperda* é superior à atividade de tripsinas digestivas observada no intestino de lagartas de *Diatraea saccharalis*;

A atividade residual de tripsinas após exposição ao extrato de folhas de *Coffea racemosa* foi superior em lagartas de *Spodoptera frugiperda* em relação a lagartas de *Diatraea saccharalis*;

A mortalidade de lagartas de *Diatraea saccharalis* alimentadas com dieta artificial contendo o extrato bruto de folhas de *Coffea racemosa* foi superior à mortalidade de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com dietas contendo o mesmo extrato;

O fracionamento do extrato foliar de *Coffea racemosa* por meio de filtração molecular indicou que moléculas não proteicas do extrato (eluição tardia, não

quantificadas pelo método de Bradford e com atividade de inibição de tripsinas) são os fatores responsáveis pelas altas mortalidades observadas para lagartas de *D. saccharalis*.

REFERÊNCIAS

- Abrol D, Shankar U (2014) Pesticides, Food Safety and Integrated Pest Management. In.: Pimentel D, Peshin R (Eds.) **Integrated Pest Management**. Dordrecht: Springer, p. 167-199. DOI: https://doi.org/10.1007/978-94-007-7796-5_7
- AGROFIT 2023: Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 18 de janeiro de 2023.
- Ahmed E, Arshad M, Khan MZ, Amjad MS, Sadaf HM, Sabir S, Sabaoon NA (2017) Secondary metabolites and their multidimensional prospective in plant life. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry** 6:205-214.
- Alves DR, Oliveira DF, Carvalho GA, Santos MAI (2011) Extrato de *Coffea racemosa* como alternativa no controle do bicho mineiro do cafeeiro. **Ciência e Agrotecnologia** 35:250-258. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000200004>
- Arrigoni EB (2002) Broca da cana-de-açúcar – Importância econômica e situação atual. In.: Arrigoni EB, Dinardo-Miranda LL, Rosseto R (Eds.) **Pragas da cana-de-açúcar - Importância econômica e enfoques atuais**. Piracicaba: STAB, 4p.
- Avellar GS, Cruz I (2016) Monitoramento de adultos de *Spodoptera frugiperda* e *Diatraea saccharalis* em áreas de milho e sorgo. In.: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA PIBIC/BIC JÚNIOR. **Resumos de trabalhos apresentados**. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo.
- Barbehenn RV, Constabel CP (2011) Tannins in plant-herbivore interactions. **Phytochemistry** 72:1551-1565. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.040>
- Barrigossi JAF, Ferreira E, Lanna AC (2004) **Panícula branca em arroz: o que causa?**. Santo Antônio do Goiás: Embrapa, 4p. (Embrapa Arroz e Feijão, Comunicado Técnico, 83).
- Barros EM, Torres, JB, Bueno AF (2010) Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros de importância econômica. **Neotropical Entomology** 39:996-1001. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2010000600023>
- Bass C, Denholm I, Williamson MS, Nauen R (2015) The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 121:78-87. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.04.004>
- Bernardi O, Albernaz KO, Valicente FH, Omoto C (2011) Resistência de insetos-praga a plantas geneticamente modificadas. In.: Bórem A, Almeida GD (Eds.) **Plantas geneticamente modificadas: desafios e oportunidades para regiões tropicais**. Visconde de Rio Branco: Suprema, p. 179-204.

Biondi A, Mommaerts V, Smagghe G, Viñuela E, Zappalà L, Desneux N (2012) The non-target impact of spinosyns on beneficial arthropods. **Pest Management Science** 68:1523-1536. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.3396>

Bonner MR, Alavanja MCR (2017) Pesticides, human health, and food security. **Food and Energy Security** 6: 89-93. DOI: <https://doi.org/10.1002/fes3.112>

Boiça Junior AL, Souza BHS, Ribeiro ZA, Eduardo WI, Nogueira L, Di Bello MM (2016) Resistência de plantas: explorando o potencial de defesa aos insetos. In.: Castilho RC, Busoli AC, Andrade DJ, Rossi GD, Di Bello MM, Brenha JAM (Eds.) **Tópicos em Entomologia Agrícola – IX**. Jaboticabal: Gráfica Multipress, p. 73-94.

Borges Filho RDC, Bernardi D, Sturza VS, Cunha USD, Diez-Rodríguez GI, Sene Pinto A, Nava DE (2018) Importance of sugar for the development of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) on artificial diet. **Journal of Economic Entomology** 111:2693-2698. DOI: <https://doi.org/10.1093/jee/toy286>

Bortoli AS, Vacari AM, Dinardo-Miranda LL, Fracasso JV, Pinto ZV, Corbani RZ, Viel SR (2017) Histórico e impacto econômico do controle biológico aplicado em cana-de-açúcar. In.: Castilho RC, Barilli DR, Truzzi CC (Eds.) **Tópicos em Entomologia Agrícola – X**. Jaboticabal: Gráfica Multipress Ltda, p. 219-243.

Botelho PSM (1985) **Tabela de vida ecológica e simulação da fase larval da *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lep: Pyralidae)**. 110f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Botelho PSM (1992) Quinze anos de controle biológico da *Diatraea saccharalis* utilizando parasitoides. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 27: 255-262.

Botelho PSM, Macedo N (2002) *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*. In.: Parra JRP, Botelho PSM, Ferreira BSC, Bento JMS (Eds.) **Controle Biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. São Paulo: Manole, p. 477-494.

Botelho PSM, Mendes AC, Macedo N (1978) Influences of climatic factors on the population fluctuations of the sugarcane moth borer, *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera: Crambidae). In.: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, **Anais em Congresso**. São Paulo: ISSCT, p. 643-655.

Bueno RCOF, Bueno AF, Moscardi F, Parra JR, Hoffmann-Campo CB (2011) Lepidopteran larvae consumption of soybean foliage: basis for developing multiple-species economic thresholds for pest management decisions. **Pest Management Science** 67: 170-174. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.2047>

Busato GR, Grützmacher AD, Garcia MS, Giolo FB, Martins AF (2002) Consumo e utilização de alimento por *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) originária de diferentes regiões do Rio Grande do Sul, das culturas do milho e do arroz irrigado. **Neotropical Entomology** 31: 525-529. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2002000400003>

Blanco CA, Chiaravalle W, Dalla-Rizza M, Farias JR, García-Degano MF, Gastaminza G, Mota-Sánchez D, Murúa MG, Omoto C, Pieralisi BK, Rodríguez J, Rodríguez-Maciél JC, Terán-Santofimio H, Téran-Vargas AP, Valencia SJ, Willink E (2016) Current situation of pests targeted by Bt crops in Latin America. **Insect Science** 15:131-138. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cois.2016.04.012>

Blumer E (1992) **Efeito do complexo broca-podridões na fermentação etanólica**. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Brioschi D, Nadalini LD, Bengtson MH, Sogayar MC, Moura DS, Silva Filho MC (2007) General up regulation of *Spodoptera frugiperda* trypsins and chymotrypsins allows its adaptation to soybean proteinase inhibitor. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 37:1283-1290. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.07.016>

Broglio-Micheletti SMF, Pereira-Barros JL, Santos AJN, Carvalho LWT, Carvalho LHT, Oliveira CJT (2007) Efeito do número de adultos de *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) liberados em semanas sucessivas para o controle de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae). **Ciência e Agrotecnologia** 31:53-58.

Brasileiro ACM, Carneiro VTC (Eds.) (2015) Manual de transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA, 453p.

Caixeta DF (2010) **Dispersão de machos de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) em cana-de-açúcar**. 48f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Entomologia Agrícola) – Unesp, Jaboticabal.

Carbognin ER (2016) **Modelos de previsão de ocorrência de adultos de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)**. 68 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Entomologia Agrícola) – Unesp, Jaboticabal.

Carneiro AA, Guimarães CT, Valicente FH, Waquill JM, Vasconcelos MJV, Carneiro NP, Mendes SM (2009) **Milho Bt: teoria e prática da produção de plantas transgênicas resistentes a insetos-praga**. Sete Lagoas: EMBRAPA, 25p. (EMBRAPA Milho e Sorgo. Circular Técnica, 135).

Carriere Y, Tabashnik B (2001) Reversing insect adaptation to transgenic insecticidal plants. **Proceeding of the Royal Society of London** 268:1475-1480. DOI: <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1689>

Carvalho FP (2006) Agriculture, pesticides, food security and food safety. **Environmental Science & Policy** 9:685-692. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envsci.2006.08.002>

Carvalho IF, Erdmann, LL, Machado LL, Rosa APSA, Zotti MJ, Neitzke CG (2018) Metabolic resistance in the fall armyworm: an overview. **Journal of Agricultural Sciences** 10: 426-436.

Carvalho RA, Omoto C, Field LM, Williamson MS, Bass C (2013) Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. **PLOS ONE** 8:e62268. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062268>

Casida JE (1980) Pyrethrum flowers and pyrethroid insecticides. **Environmental Health Perspectives** 34:189-202. DOI: <https://doi.org/10.1289/ehp.8034189>

Centro De Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA) e Confederação Nacional Da Agricultura e Pecuária (CNA). PIB do agronegócio brasileiro de 1996 a 2018. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx>. Acessado em 26 de Agosto de 2022.

Costa DCM, Andrade OVS, Martins JOJ, Guerreiro Filho O, Carvalho CHS, Souza, BHS (2018) Infestação do bicho mineiro *Leucoptera coffeella* em cultivares de café arábica no sul de Minas Gerais. In.: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, **Anais de Congresso**. Varginha: Fundação Procafé, p. 314-316.

Costa DP (2009) **Distribuição Espacial de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) em Cana-de-açúcar**. 32p. Dissertação (Mestrado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade) – UFGD, Dourados.

Costa-Lima AM (Ed.) (1950) Insetos do Brasil: Lepidópteros. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia, 420p.

Cheng AX, Lou YG, Mao YB, Lu S, Wang LJ, Chen XY (2007) Plant terpenoides: Biosynthesis and ecological functions. **Journal of Integrative Plant Biology** 79:179-186. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2007.00395.x>

Chormule A, Shejawal N, Sharanabasappa, Kalleshwaraswamy CM, Asokan R, Mahadeva Swamy HM (2019) First report of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera, Noctuidae) on sugarcane and other crops from Maharashtra, India. **Journal of Entomology and Zoology Studies** 7:114-117.

Cruz I (1995) **A lagarta-do-cartucho na cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA, 45p. (EMBRAPA Milho e Sorgo. Circular Técnica, 21).

Cruz I (1999) Lagarta-do-cartucho: enfrente o principal inimigo do milho. **Revista Cultivar** 21:16-18.

Cruz I (2007) **A broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*, em milho, no Brasil**. Sete Lagoas: EMBRAPA, 12p. (EMBRAPA Milho e Sorgo, Circular Técnica, 90).

Cruz I, Figueiredo MLC, Silva RB (2010) Monitoramento de Adultos de *Diatraea saccharalis* Fabr. (Lepidoptera: Crambidae) em Algumas Regiões Produtoras de Milho (*Zea mays* L.) no Brasil. In.: XXVIII CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, **Anais em Congresso**. Goiânia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, p. 533-537.

Da Cunha JPAR, Silva Júnior AD (2010) Volumes de calda e pontas de pulverização no controle químico de *Spodoptera frugiperda* na cultura do sorgo forrageiro. **Engenharia Agrícola** 30:692-699.

Desneux N, Decourtye A, Delpuech JM (2007) The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology** 52:81-106. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091440>

Dew JA (2013) Fall armyworm. **Jornaul of Economic Entomology** 6:361-366.

Dinardo-Miranda LL (2008) Pragás. In.: Dinardo-Miranda LL, Vasconcelos ACM, Landell MGA (Eds.) **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agronômico, p. 349-404. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0006-87052013005000012>

Dinardo-Miranda LL, Fracasso JV, Anjos IA, Garcia J, Costa VP (2012) Influência da infestação de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) sobre parâmetros tecnológicos da cana de açúcar. **Bragantia** 71:342-345. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0006-87052012005000030>

Dinardo-Miranda LL, Fracasso JV, Costa VP, Anjos IA, Lopes DOP (2013) Reação de cultivares de cana-de-açúcar à broca do colmo. **Bragantia** 72:29-34.

Echeverri-Rubiano C, Chica-Ramírez HA, Vargas G (2022) Biology of the Most Widely Distributed Sugarcane Stem Borers, *Diatraea* spp. (Lepidoptera: Crambidae), in Colombia. **Neotropical Entomology** 51: 877-885. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13744-022-00990-7>

El-Latif AOA (2014) In vivo and in vitro inhibition of *Spodoptera littoralis* gut-serine protease by protease inhibitors isolated from maize and sorghum seeds. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 116:40-48. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.09.009>

Emana GD (2007) Comparative studies of the influence of relative humidity and temperature on the longevity and fecundity of the parasitoid, *Cotesia flavipes*. **Journal of Insect Science** 7:1-7. DOI: <https://doi.org/10.1673/031.007.1901>

Erlanger BF, Cohen W, Kokowsky N (1961) The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 95:271-278. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(61\)90145-X](https://doi.org/10.1016/0003-9861(61)90145-X)

Farias JR, Andow DA, Horikoshi RJ, Sorgatto RJ, Fresia P, Santos AC, Omoto C (2014) Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection** 64:150-158. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.06.019>

Farinelli R, Fornasieri Filho D (2006) Avaliação de dano de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em cultivares de milho. **Científica** 34:197-202. DOI: <https://doi.org/10.15361/1984-5529.2006v34n2p197%20-%20202>

Fatoretto JC, Michel AP, Silva Filho MC, Silva N (2017) Adaptive potential of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) limits Bt trait durability in Brazil. **Journal of Integrated Pest Management** 8:1-10. DOI: <https://doi.org/10.1093/jipm/pmx011>

Felton GW, Gatehouse JA (1996) Antinutritive plant defence mechanisms. In: Lehane MJ, Billingsley PF (Eds.) **Biology of the Insect Midgut**. London: Chapman & Hall, p. 373-416. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-94-009-1519-0>

Ferreira E (1998) **Manual de identificação de pragas do arroz**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa: CNPAF, 110 p. (Embrapa – CNPAF. Documentos, 90).

Ferreira E, Barrigossi JAF, Castro EM, Santos AB (2004) Perdas de produção pela broca-do-colo (*Diatraea saccharalis* Fabr. 1794) (Lepidoptera: Pyralidae) em genótipos de arroz de terras altas. **Pesquisa Agropecuária Tropical** 34:99-103.

Ferreira C, Capella NA, Sitnik R, Terra WR (1994) Digestive enzymes in midgut cells, endo and ectoperitrophic contents, and peritrophic membranes of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 26:299-313. DOI: <http://doi.org/10.1002/arch.940260406>

Figueiredo M, Cruz I, Da Silva RB (2010) Aspectos bioecológicos de *Diatraea saccharalis* Fabr. (Lepidoptera: Crambidae) em plantas de milho (*Zea mays* L.). In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, **Anais em Congresso**. Goiânia: Associação Brasileira do Milho e Sorgo, 2010, CD-Rom.

Fogliata SV, Perera MF, Alves-Pereira A, Zucchi MI, Murúa MG (2022) Unraveling the population structure of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*, in Argentina. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 170:530-545. DOI: <https://doi.org/10.1111/eea.13174>

Francischini FJB, Cordeiro EMG, Campos JB, Alves-Pereira A, Viana JPG, Wu X, Wei W, Brown P, Joyce A, Murua G, Fogliata S, Clough SJ, Zucchi MI (2019) *Diatraea saccharalis* history of colonization in the Americas. The case for human-mediated dispersal. **PLOS-ONE** 14:e0220031. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220031>

Gallan DZ (2019) **Estudo da interação entre a broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) e fungos oportunistas *Colletotrichum falcatum* e *Fusarium verticillioides***. 79f. Dissertação (Mestrado em Ciências) –

Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Gallo D, Nakano O, Silveira Neto S, Carvalho RPL, Baptista GS, Berti Filho E, Parra JRP, Zucchi RA, Alves SB, Vendramim JD, Marchini LC, Lopes JRP, Omoto C (Eds.) (2002) Entomologia Agrícola. Piracicaba: FEALQ, 917p.

Gassmann AJ, Carrière Y, Tabashnik BE (2009) Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology** 54:143-163. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.54.110807.090518>

Gelotte B (1960) Studies on gel filtration sorption properties of the bed material Sephadex. **Journal of Chromatography** 3:330-342. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)97007-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)97007-4)

Giúmenes MJ (2011) **Assistência de ar e volumes de aplicação associados a pontas de pulverização no controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) na cultura do milho**. 70 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Unesp, Botucatu.

Giraud M, Hilliou F, Fricaux T, Audant P, Feyereisen R, Le Goff G (2015) Cytochrome P450s from the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*): responses to plant allelochemicals and pesticides. **Insect Molecular Biology** 24:115-128. DOI: <https://doi.org/10.1111/imb.12140>

Georgen G, Lava Kumar P, Sankung SB, Togola A (2016) First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), a new alien invasive pest in West and Central Africa. **PLOS ONE** 11: e0165632. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165632>

Gonzales-Coloma A, Reina M, Diaz CE, Fraga BM (2010) Natural product-based biopesticides for insect control. In: Liu H, Mander L (eds) Comprehensive natural products II. **Elsevier** p. 237-268.

Guan F, Zhang J, Shen H, Wang X, Padovan A, Walsh TK, Tay WT, Gordon KHJ, James W, Czepak C, Otim MH, Kachigamba D, Wu Y (2021) Whole-genome sequencing to detect mutations associated with resistance to insecticides and Bt proteins in *Spodoptera frugiperda*. **Insect Science** 28:627-638. DOI: <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12838>

Guerreiro Filho O, Medina Filho HP, Carvalho A (1991) Fontes de resistência ao bicho mineiro, *Perileucoptera coffeella*, em *Coffea* spp. **Bragantia** 50:45-55.

Glare TR, O'Callaghan MH (Eds.) (2000) *Bacillus thuringiensis*: Biology, Ecology and Safety. New York: Wiley&Sons, 355p.

Hailu G, Niassy S, Bässler T, Ochatum N, Studer C, Salifu D, Agbodzavu MK, Khan ZR, Midega C, Subramanian S (2021) Could fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) invasion in Africa contribute to the displacement of cereal stemborers in maize and sorghum cropping systems. **International Journal of Tropical Insect Science** 41:1753-1762. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42690-020-00381-8>

Harbone JB (1991) Flavonoid Piments. In.: Rosenthal GA, Berenbaum MR (Eds.) **Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites**. San Diego: Academic Press, p. 389-429. DOI: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-597183-6.50016-4>

Harbone JB (1999) Classes and functions of secundar products from plants. In.: Walton NJ, Brown DE (Eds.) **Chemicals from plants: perspectives on plant secondary products**. London: Imperial College press.

Hardke JT, Lorenz III GM, Leonard BR (2015) Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) ecology in southeastern cotton. **Journal of Integrated Pest Management** 6:10. DOI: <https://doi.org/10.1093/jipm/pmv009>

Hegedus D, Erlandson M, Gillott C, Toprak U (2009) New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. **Annual review of entomology** 54:285-302. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.54.110807.090559>

Hegnauer R (1988) Biochemistry, distribution and taxonomic relevance of higher plant alkaloids. **Phytochemistry** 27:2423-2427.

Hensley SD, Hammond Jr AM (1968). Laboratory techniques for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. **Journal of Economic Entomology** 61(6), 1742-1743.

Herlinda S, Suharjo R, Sinaga ME, Fawwazi F, Suwandi S (2021) First report of occurrence of corn and rice strains of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* in South Sumatra, Indonesia and its damage in maize. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences** 21:412-419. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2021.11.003>

Huang T, Jander G, de Vos M (2011) Non-protein amino acids in plant defense against insect herbivores: representative cases and opportunities for further functional analysis. **Phytochemistry** 72(13), 1531-1537. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.03.019>

Isas M, Albarracin EL, Pérez ML, Salvatore A (2016) *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) Species, Egg Parasitoids of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) on Sugarcane (Poales: Poaceae) in Argentina. **Florida Entomologist** 99:133-134. DOI: <https://dx.doi.org/10.1653/024.099.0128>

Jongsma MA, Bakker PL, Peters J, Bosch D, Stiekema WJ (1995) Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. **Proceeding of the National Academy of Sciences** 92:8041-8045. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.92.17.8041>

Joyce AL, White WH, Nuessly GS, Solis MA, Scheffer SJ, Lewis ML, Medina RF (2014) Geografic Population Structure of the Sugarcane Borer, *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) in the Southern United States. **PLOS ONE** 9:e110036. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone0110036>

Kasten Jr P, Precetti AA, Parra JRP (1978) Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural. **Revista de Agricultura** 53(1-2), 68-78.

Kim K, Kabir E, Jahan AS (2017) Exposure to pesticides and the associated human health effects. **Science of the Total Environment** 575:525-535. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.009>

Lattanzio V, Kronn PA, Quideau S, Treutter D (2009) Plant Phenolics – Secondary Metabolites with Diverse Functions. In.: Daayf F, Lattanzio V (Eds.) **Recent Advances in Polyphenol Reserach**. Oxford: Blackwell Publising, 35p.

Lattanzio V (2013) Phenolic Compounds: Introduction. In.: Lattanzio V (Ed.) **Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, p. 1543-1580. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_57

Lee G, Seo BY, Lee J, Kim H, Song JH, Lee W (2020) First report of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae), a new migratory pest in Korea. **Journal of Applied Entomology** 59:73-78. DOI: <https://doi.org/10.5656/KSAE.2020.02.0.006>

Lehane MJ, Billingsley PF (Eds.) (1996) The Biology of Insect Midgut. London: Chapman & Hall. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-94-009-1519-0>

Li X, Baudry J, Berenbaum MR, Schuler MA (2004) Structural and functional divergence of insect CYP6B proteins: from specialist to generalist cytochrome P450. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 101:2939-2944. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0308691101>

Li X, Schuler MA, Barenbaum MR (2007) Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. **Annual Review of Entomology** 52:232-253. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151104>

Long WH, Hensley SD (1972) Insect pests of sugar cane. **Annual Review of Entomology** 17:149-176.

Lopes JRS (1988) **Estudos bioetológicos de *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hym., Trichogrammatidae) para o controle de *Diatraea saccharalis* (Fabri., 1794) (Lep., Pyralidae)**. 141f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Entomologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Lopes AB, Souza BB, Oliveira RAP, Guimarães CRR, Cerqueira FB (2022) Avaliação tecnológica de quatro cultivares de cana-de-açúcar em função da infestação de *Diatraea saccharalis* em Pedro Afonso, TO – estudo de caso. **Research, Society and Development** 11:e3401111335388. DOI: <https://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i13.35388>

Lopes GP, Cruz I, Figueiredo MLC, Redoan ACM, Moreira TL (2015) Efeito da temperatura noturna sobre o desenvolvimento e biologia de *Diatraea saccharalis*. XII CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, **Anais em Congresso**. São Lourenço: Sociedade Brasileira de Ecologia, p. 1-2.

Mahmood I, Imadi SR, Shazadi K, Gul A, Hakeem KR (2016) Effects of pesticides on environment. In: Mahmood I, Imadi SR, Shazadi K, Gul A, Hakeem KR (Eds.) **Plant, soil and microbes**. Cham: Springer, p. 253-269. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-27455-3_13

Macedo N, Botelho PSM (1988) Controle integrado da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Pyralidae). **Brasil Açucareiro** 106:2-14.

Macedo N, Macedo D (2004) As pragas de maior incidência nos canaviais e seus controles. **Visão agrícola** 1:38-46.

Marconato JR (1988) **Aspectos biológicos de *Diatraea saccharalis* (Fabr, 1794) (Lep., Pyralidae) em meio artificial contendo diferentes genótipos de sorgo e milho na forma de colmos secos e triturados**. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Unesp, Jaboticabal.

Martins JFS, Barigossi JAF, Oliveira JV, Cunha US (2009) **Situação do manejo integrado de insetos-praga na cultura do arroz no Brasil**. Pelotas: EMBRAPA, 40p. (EMBRAPA Clima Temperado. Documentos, 290).

Matiello JB, Almeida SR, Ferreira IB (2016) Cultivar de cafeeiros Siriema AS1 confirma sua alta resistência ao bicho mineiro. In.: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, **Anais de Congresso**. Serra Negra: Fundação Procafé.

Matiello JB, De Almeida SR, Ferreira IB (2017) Lançada pela PROCAFÉ, cultivar Siriema se destaca pela resistência ao bicho mineiro e à ferrugem ao longo dos anos. **Notícias Agrícolas**, São Paulo, 22 de nov. de 2017. Disponível em: <https://www.noticiasagricolas.com.br/noticias/cafe/202971-lancada-pela-procafe-cultivar-siriema-se-destaca-pela-resistencia-ao-bicho-mineiro-e-a-ferrugem-ao-longo.html#.Y7cTjXbMLIV>. Acesso em: 05 de jan. de 2023.

Medina Filho HP, Carvalho A, Monaco LC (1977) Melhoramento do cafeeiro: XXXVII. Observações sobre a resistência do cafeeiro ao bicho mineiro. **Bragantia** 36:131-137.

Melo ABP, Parra JRP (1988) Exigências térmicas e estimativas do número de gerações anuais de broca da cana-de-açúcar em quatro localidades canavieiras de São Paulo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 23:691-695.

Mendes SM, Waquil JM, Rodrigues JAS, Sampaio MV, Viana PA (2014) Manejo de pragas na cultura do sorgo. **Informe Agropecuário** 35:73-81.

Mendonça Filho AF, Risco SHB, Costa JMB (1977) Introduction and rearing of *Apanteles flavipes* Cameron (Hym: Braconidae) in Brazil. **Proceedings International Society of Sugarcane Technologists** 1:460-464.

Mendonça AF, Moreno JA, Risco SH, Rocha ICB (1996) Broca comum da cana-de-açúcar. In.: Mendonça AF (Ed.) **Pragas da cana-de-açúcar**. Maceió: Insetos & Cia, p. 49-82.

Montezano D, Specht A, Sosa-Gómez DR, Roque-Specht VF, Sousa-Silva JC, Paula-Moraes SVD, Peterson JA, Hunt TE (2018) Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. **African Entomology** 26:286-300. DOI: <https://hdl.handle.net/10520/EJC-112bc16060>

Nakano O, Neto SS, Carvalho RPL, Baptista GC, Filho EB, Parra JRP, Zucchi RA, Alves SB, Vedramim JD, Marchini LC, Lopes JRS, Omoto C (Eds.) (2002) Entomologia Agrícola. São Paulo: Fealq, 920p.

Nakano O, Silveira Neto S, Zucchi RA (Eds.) (1981) Entomologia Econômica. Piracicaba: Livro Ceres, 303p.

Nascimento TPS (2017) **Influência da temperatura na performance de populações de *Cotesia flavipes* de biofábricas do Brasil**. 67p. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Entomologia Agrícola) – Unesp, Jaboticabal.

Nava DE, Pinto AS, Silva DAS (2009) **Controle biológico da broca da cana-de-açúcar**. Pelotas: EMBRAPA, 28p. (EMBRAPA Clima Temperado. Documentos, 287).

Nerio LS, Olivero-Verbel J, Stashenko E (2010) Repellent activity of essential oils: A review. **Bioresource Technology** 101:372-378. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.048>

Oliveira CDS, Silva CS, Zoz T, Zoz A, Andrade AF, Witt TW (2019) Feeding preference of *Spodoptera frugiperda* on different sorghum genotypes. **Arquivos do Instituto Biológico** 86: e0992018. DOI: <https://doi.org/10.1590/1808-1657000992018>

Oliveira CFR, Macedo MLR (2011) Emprego de inibidores de protease vegetais como ferramenta biotecnológica alternativa no controle de pragas. **Biológicas & Saúde** 1:1-11. DOI: <https://doi.org/10.25242/8868112011508>

Oliveira CFR, Souza TP, Parra JRP, Marangoni S., Silva Filho M.C, Macedo MLR (2013) Insensitive trypsins are differentially transcribed during *Spodoptera frugiperda* adaptation against plant protease inhibitors. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology** 165(1): 19-25. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2013.02.008>

Oliveira CM, Audad AM, Mendes SM, Frizzas MR (2014) Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. **Crop Protection** 56:50-54. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.10.022>

Omoto C, Bernardi O, Salmeron E, Farias JR (2013) Manejo da resistência de *Spodoptera frugiperda* a inseticidas e plantas Bt. Piracicaba: IRAC-BR, 01p.

Omoto C, Bernardi O, Salmeron E, Sorgatto RJ, Dourado PM, Crivellari A, Carvalho RA, Willse A, Martinelli S, Head GP (2016) Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science** 72:1727-1736. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.4201>

Parra JRP, Botelho PSM, Correa-Ferreira BS, Bento JMS (Eds.) (2002) Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores. São Paulo: Editora Manole, 609p.

Parra JR, Milano P, Consoli FL, Zerio NG, Haddad ML (1999) Efeito da nutrição de adultos e da umidade na fecundidade de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** 28: 49-57. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0301-80591999000100005>

Pérez MLP, Easdale C, Iovane RJ, Scandaliaris P, Isa RB, Rodríguez D, Bardin F, Gastaminza G, Romero E, Goebel FR (2022) Damage Distribution and Yield Losses Caused by the Stem Borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) in Northwestern Argentina. **Sugar Tech** DOI: <https://doi.org/10.1007/s12355-022-01213-4>

Pinto AS, Cantori LV, Ivan EAF (2015) Inovações tecnológicas no controle biológico de pragas em cana-de-açúcar. In.: Busoli AC, Castilho RC, Andrade DJ, Rossi GD, Viana DL, Fraga DF, Souza LA (Eds.) **Tópicos em Entomologia Agrícola – VIII**. Jaboticabal: Maria de Lourdes Brandel, p. 125-135.

Pinto AS, Ivan EAF, Cantori LV (2014) Avanços no controle biológico de pragas na cana-de-açúcar. In.: Busoli AC, Souza LA, Alencar JRDCC, Fraga DF, Grigolli JFJ (Eds.) **Tópicos em Entomologia Agrícola – VII**. Jaboticabal: Maria de Lourdes Brandel, p. 121-130.

Pinto CPG, Barilli DR, Silva JB, Santos ALZ, Souza NP, Polanczyk RA, Rossi GD (2018) Fontes potenciais de moléculas inseticidas. In.: Castilho RC, Truzzi CC, Pinto CPG (Eds.) **Tópicos em Entomologia Agrícola – XI**. Jaboticabal: Gráfica Multipress, p. 103-123.

Pisa LW, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, Bonmatin JM, Downs CA, Goulson D, Kreutzweiser DP, Krupke C, Liess M, McField M, Morrissey CA, Noome DA, Settele J, Simon-Delso N, Stark JD, Van Der Sluijs VD, Van Dyck H, Wiemerds M (2015) Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. **Environmental Science and Pollution Research** 22:68-102. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3471-x>

Paulillo LCMS, Sebben AM, Derbyshire MTV, Góes-Neto A, Brotto MAP, Figueira A (2012) Evaluation of in vitro and in vivo effects of semipurified proteinase inhibitors from *Tehobroma* seeds on midgut protease activity of lepidopteran pest insects. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 81:34-53. DOI: <https://doi.org/10.1002/arch.21038>

Piggott MP, Tadle FPJ, Patel S, Gomez KC, Thistleton B (2021) Corn-strain or rice-strain? Detection of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), in northern Australia. **International Journal of Tropical Insect Science** 41:2607-2615. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42690-021-00441-7>

Pitre HN, Hogg DB (1983) Development of the fall armyworm on cotton, soybean and corn (*Spodoptera frugiperda*). **Journal of the Georgia Entomological Society** 18:182-187.

Pogue GM (Ed) (2002) A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). Philadelphia: American Entomological Society, 202p.

Pompermayer P, Falco MC, Parra JRP, Silva Filho MC (2003) Coupling diet quality and Bowman-Birk and Kunitz-type soybean proteinase inhibitor effectiveness to *Diatraea saccharalis* development and mortality. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 109(3), 217-224. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.0013-8703.2003.00107.x>

Pompermayer P, Lopes AR, Terra WR, Parra JRP, Falco MC, Silva-Filho MC (2001) Effects of soybean proteinase inhibitor on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 99:79-85. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2001.00804.x>

Portela GLF, Pádua LEM, Branco RTPC, Barbosa AO, Silva PRR (2010) Flutuação populacional de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) em cana-de-açúcar no município de União-PI. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias** 3:303-307.

Prasad ER, Dutta-Gupta A, Padmasree K (2010) Insecticidal potential of Bowman-Birk proteinase inhibitors from red gram (*Cajanus cajan*) and black gram (*Vigna mungo*) against lepidopteran insect pests. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 98:80-88. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.05.003>

R Core Team (2020). **R**: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Ramiro DA, Guerreiro Filho O, Queiroz-Voltan RB, Matthiesen SC (2004) Caracterização anatômica de folhas de cafeeiros resistentes e susceptíveis ao bicho mineiro. **Bragantia** 63:363-372. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0006-8705004000300006>

Ramos VD, Cabrera OG, Camargo ELO, Ambrósio AB, Vidal RO, Silva DS, Guimarães LC, Marangoni S, Parra JRP, Pereira GAG, Macedo MLR (2012) Molecular cloning and insecticidal effect of *Inga laurina* trypsin inhibitor on *Diatraea saccharalis* and *Heliothis virescens*. **Comparative Biochemistry Physiology** 156: 148–158. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2012.07.007>

Rani L, Thapa K, Kanojia N, Sharma N, Singh S, Grewal AS, Srivastav AL, Kaushal J (2021) An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. **Journal of Cleaner Production** 283:124657. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124657>

Rattan RS (2010) Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. **Crop protection** 29:913-920. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.05.008>

Roe RM, Hammond AM, Reagan TE, Hensley SD (Eds) (1981) A bibliography of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Fabricius), 1887-1980. USDA Agriculture Research Service, **Agriculture Research Manual** 20:1-2.

Rossato Junior JAS (2012) ***Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae) e *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae) em cana-de-açúcar: impacto na qualidade da matéria-prima, açúcar e etanol**. 109f. Tese (Doutorado em Agronomia – Entomologia Agrícola) – Unesp, Jaboticabal.

Rossi GD (2015) O processo digestivo da fase larval de lepidópteros-praga como alvo para o desenvolvimento de táticas de controle. In.: Busoli AC, Castilho RC, Andrade DJ, Rossi GD, Viana DL, Fraga DF, Souza LA (Eds.) **Tópicos em Entomologia Agrícola – VII**. Jaboticabal: Gráfica Multipress, p. 71-82.

Rupasinghe SG, Wen Z, Chiu T, Schuler MA (2007) *Helicoverpa zea* CYP6B8 and CYP321A1: different molecular solutions to the problem of metabolizing plant toxins and insecticides. **Protein Engineering, Design & Selection** 20:615-624. DOI: <https://doi.org/10.1093/protein/gzm063>

Ryan CA (1990) Protease Inhibitors in Plants: Genes for Improving Defenses Against Insects and Pathogens. **Annual Review of Phytopathology** 28:425-449. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.py.28.090190.002233>

Sandoval SS, Senô KCA (2010) Comportamento e controle de *D. saccharalis* na cultura da cana-de-açúcar. **Nucleus** 7:243-257. DOI: <https://doi.org/10.3738/1982.2278-311>

Sarmiento RA, Aguiar RWS, Aguiar RASS, Vieira SMJ, Oliveira HG, Holtz AM (2002) Revisão da biologia, ocorrência e controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) em milho no Brasil. **Bioscience Journal** 18:41-48.

Savary S, Willocquet L, Pethybridge SJ, Esker P, McRoberts N, Nelson A (2019) The global burden of pathogens and pests on major food crops. **Nature ecology & evolution** 3:430-439. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y>

Silva W, Freire MGM, Parra JRP, Marangoni S, Macedo MLR (2011) Evaluation of the *Adenanthera pavonina* seed proteinase inhibitor (ApTI) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of *Diatraea saccharalis*. **Process Biochemistry** 47:257-263. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.11.002>.

Souza NP (2019) **Bioatividade de um inibidor de tripsinas digestivas presente em folhas de *Coffea racemosa* Lour. sobre imaturos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae).** 37p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Agrônômica) – Unesp, Jaboticabal.

Souza TP, Dias RO, Castelhana EC, Brandão MM, Moura DS, Silva-Filho MC (2016) Comparative analysis of expression profiling of the trypsin and chymotrypsin genes from Lepidoptera species with different levels of sensitivity to soybean peptidase inhibitors. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology** 196:67-73. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2016.02.007>

Suby SB, Soujanya PL, Yadava P, Patil J, Subaharan K, Prasad GS, Babu KS, Jat SL, Yathish KR, Vadassery J, Kalia VK, Bakthavatsalam N, Shekhar JC, Rakshit S (2020) Invasion of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) in India: nature, distribution, management and potential impact. **Current Science** 119:44-51. DOI: <http://krishi.icar.gov.in/jspui/handle/123456789/43056>

Schoonhoven LM, Van Loon JJA, Dicke M (Eds.) (2005) Insect-plant biology. Oxford: Oxford University Press.

Sponsler DB, Grozinger CM, Hitaj C, Rundlöf M, Botías C, Code A, Lonsdorf EV, Melathopoulos AP, Smith DJ, Suryanarayanan S, Thogmartin WE, Williams NM, Zhang M, Douglas MR (2019) Pesticides and pollinators: A socioecological synthesis. **Science of the Total Environment** 662:1012-1027. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.016>

Srinivasan A, Giri AP, Gupta VS (2006) Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases. **Cellular & Molecular Biology Letters** 11:132-154. DOI: <https://doi.org/10.2478/s11658-006-0012-8>

Srivastava AK, Kesavachandran C (Eds.) (2019) Health Effects of Pesticides. London: CRC Press, 182p. DOI: <https://doi.org/10.1201/9780429058219>

Stangarlin JR, Kuhn OJ, Toledo MV, Portz RL, Pascholati SF (2011) A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis** 10:18-46. DOI: <https://doi.org/10.181888/sap.v10i.5268>

Steppuhn A, Gase K, Krock B, Halitschke R, Baldwin IT (2004) Nicotine's defense function in nature. **Plos Biology** 2:e217. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020217>

Storer NP, Babcock JM, Schlenz M, Meade T, Thompson GD, Bing JW, Huckaba RM (2010) Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology** 103:1031-1038. DOI: <https://doi.org/10.1603/ED10040>

Stupiello JP (2005) O complexo broca-podridão vermelha. **STAB - Açúcar, Alcool e Subprodutos** 24:14.

Tabashnik BE, Brévault T, Carrière Y (2013) Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. **Nature Biotechnology** 31:510-521. DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt.2597>

Tavares RM, Da Silva JER, Alves GS, Alves TC, Silva SM, Cunha JPA (2017) Tecnologia de aplicação de inseticidas no controle da lagarta-do-cartucho na cultura do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo** 16:30-42. DOI: <https://doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v16n1p30-42>

Terra WR, Ferreira C, Baker JE (1996) Compartmentalization of digestion. In: Lehane MJ, Billingsley PF (Eds.) **Biology of the Midgut**. London: Chapman & Hall, p. 206-235. DOI: https://doi.org/10.1007/978-94-009-1519-0_8

Terra WR, Ferreira C (2005) Biochemistry of digestion. **Comprehensive molecular insect science** 4:171-224.

Tholl D (2015) Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants. **Advances in Biochemical Engineering Biotchnology** 148:63-106. DOI: https://doi.org/10.1007/10_2014_295

Thompson HM (2003) Behavioural effects of pesticides in bees—their potential for use in risk assessment. **Ecotoxicology** 12:317-330. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1022575315413>

Treutter D (2006) Significance of flavonoids in plant resistance: a review. **Environmental Chemistry Letters** 4:147-157. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10311-006-0068-8>

Transgênicos: CTNBio aprova nova variedade de cana resistente à broca. **Estadão**, São Paulo, 18 de dez. de 2018. Disponível em: <https://www.canalrural.com.br/noticias/agricultura/cana/transgenicos-variedade-cana-broca/>. Acesso em 4 de jan. de 2023.

Valicente FH (2015) **Manejo integrado de pragas na cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA, 13p. (EMBRAPA Milho e Sorgo, Circular Técnica, 208).

Veloso VRS, Nakano O (1983) Determinação do número de estruturas frutíferas do algodoeiro danificadas por lagartas de *S. frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae) em diferentes épocas de desenvolvimento da cultura. **Pesquisa Agropecuária Tropical** 12/13:117-126.

Vizzoto M, Krolow AC, Weber GEB (2010) **Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância**. Pelotas: EMBRAPA, 16p. (EMBRAPA Clima Temperado, Documento, 316).

Wadleigh RW, Yu SJ (1988) Detoxification of isothiocyanate allelochemicals by glutathione transferase in three lepidopterous species. **Journal of Chemical Ecology** 14:1279-1288. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01019352>

Waquil JM, Viana PA, Cruz I (2002) **Cultivo do milho: Manejo Integrado de Pragas (MIP)**. Sete Lagoas: EMBRAPA, 16p. (EMBRAPA Milho e Sorgo, Comunicado Técnico, 50).

Wordell Filho JA, Ribeiro LP, Chiaradia LA, Madalóz JC, Nesi CN (2016) **Pragas e doenças do milho: diagnose, danos e estratégias de manejo**. Florianópolis: Epagri, 84p. (Epagri, Boletim Técnico N° 170).

Yamamoto I (1999) Nicotine to Nicotinoids: 1962 to 1997. In: Yamamoto I, Casida JE (eds) Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor. **Springer** p. 3-27. DOI: https://doi.org/10.1007/978-4-431-67933-2_1

Yu SJ (1991) Insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology** 39:84-91. DOI: [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(91\)90216-9](https://doi.org/10.1016/0048-3575(91)90216-9)