

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

MARIANA DE MACÊDO COSTA

**Caracterização química e avaliação das atividades
antimicrobianas da cutícula do inseto adulto de *Rhynchophorus
palmarum***

Maceió/AL

2016

MARIANA DE MACÊDO COSTA

**Caracterização química e avaliação das atividades
antimicrobianas da cutícula do inseto adulto de *Rhynchophorus
palmarum***

Dissertação de Mestrado submetida
ao Programa de Pós Graduação em
Ciências Farmacêuticas da
Universidade Federal de Alagoas,
como requisito para obtenção do grau
de Mestre em Ciências
Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Luciano
Aparecido Meireles Grillo.

Coorientador: Prof. Dr. Antônio
Euzébio Goulart Santana.

Maceió/AL

2016

Folha de Aprovação

AUTOR (A): MARIANA DE MACEDO COSTA

Caracterização química e avaliação das atividades antimicrobianas da cutícula do inseto adulto de *Rhynchophorus palmarum*

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

(Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo. UFAL) (Orientador)

Banca Examinadora:

(Dr. Irinaldo Diniz Basílio Júnior. UFAL) (Examinador 1)

(Dr. Henrique Fonseca Goulart. UFAL) (Examinador 2)

A Deus, aos meus pais, Paulo Costa e Renalva Costa

AGRADECIMENTOS

Sempre a Cristo, que me sustenta em todos os momentos e o maior mestre que alguém pode conhecer.

Ao prof. Dr. Luciano Grillo, pela orientação, apoio e confiança.

Ao prof. Dr. Euzébio Santana, assim como ao prof. Dr. Henrique Goulart, pela orientação, acolhimento e enorme ajuda.

Aos meus pais, Paulo e Renalva, que simplesmente, são as pessoas que mais devo e agradeço por todas as conquistas que tive e que terei em minha vida.

Ao meu namorado, Eduardo, que é o melhor companheiro de vida que eu poderia ter, e que em todos os momentos me incentiva e me faz crescer junto com ele.

As minhas irmãs, Paula e Lívia, que me dão o melhor sorriso, companhia, incentivo e carinho.

Minha família, que são a melhor torcida que alguém pode ter na vida. Assim como minha segunda família, que são meus sogros, meus cunhados e co cunhados.

Aos Primigos, meus primos e amigos que me divertem tanto, torcem e vibram comigo.

As minhas amigas de faculdade e de vida, Isabella, Andréia, Paulinha, Suanne, Thayná e também ao meu grande amigo Lucas!

A minha amiga irmã Paola.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, Camila, Josiel, Thomas, João e Robert, assim como ao pessoal da Tecnano, Professora Dr^a Camila Dornelas, Janaína, Val, Thamires, Rafael, Diogo e Ingrid pelas grandiosas ajudas e por fazerem parte de maneira intensa e agradável.

Agradeço infinitamente aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais (LPqRN), que deram aquela força! Kelly, Thiago, Demétrios, Bira, prof. Alessandro e os demais.

Agradeço também ao Anderson, por ter sido tão prestativo comigo e ter me ajudado bastante com os insetos.

“...Estamos vivos. Somos Inteligentes. Precisamos saber”

Stephen Hawking.

RESUMO

A principal função dos lipídios cuticulares em insetos é limitar a perda de água através da superfície. Porém também estão envolvidos em vários tipos de comunicação química entre espécies e redução da penetração de inseticidas, produtos químicos e toxinas além de fornecer proteção contra o ataque de microorganismos, parasitas e predadores. Numerosas espécies de insetos transmissores de doenças altamente virulentas de plantas, desempenham um papel crítico como pragas agrícolas, como é o caso do *Rhynchophorus palmarum* que é vetor no nematoide transmissor da doença Anel vermelho responsável por causar danos à economia agrícola de palmeiras, em especial o coqueiro, em diversas regiões do país. No entanto, a susceptibilidade ou resistência de várias espécies de insetos a infecção pode resultar de vários fatores, incluindo as diferenças de estrutura e composição do exoesqueleto, assim como a presença de compostos antimicrobianos na cutícula. O papel dos lipídios de superfície de acolhimento na patogênese de insetos ainda é pouco compreendida. A determinação do perfil de lipídeos cuticulares é, portanto, de grande importância para a compreensão da suscetibilidade do inseto ou a resistência à infecção. Este estudo teve como objetivo caracterizar o perfil cuticular do inseto adulto *R. palmarum* macho e fêmea, e avaliar a presença de atividade antimicrobiana. As análises foram executadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa das frações cuticulares em hexano (extrato I) e diclorometano (extrato II e III). Foram identificados os principais constituintes cuticulares, como hidrocarbonetos, álcoois, cetona e aldeído, tanto em macho quanto em fêmea, incluindo a presença de alcanos (C_{25} ; C_{27} ; C_{43}), trimetil-alceno (C_{40}), identificado no extrato II do inseto fêmea, hidrocarboneto insaturado ($C_{20:5}$) no extrato I fêmea e macho, e alceno metil-ramificado ($C_{24:6}$) apenas no extrato II da fêmea. Foram identificados 10 ésteres de ácidos graxos de C_{14} a C_{23} , com variação entre os sexos em $C_{22:0}$, $C_{18:1}$, $C_{21:0}$ e $C_{20:2}$. Apresentou quantidade relevante de C_{16} e C_{18} , comum no extrato de lipídeos cuticulares (II) e internos (III). A quitina extraída da cutícula, e o seu derivado quitosana, foram caracterizados em estudo por infravermelho e por difração de raio-X. Os extratos da cutícula apresentaram inibição satisfatória contra *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* e *Candida tropicalis*.

Palavras-chave: *Rhynchophorus palmarum*. Lipídeos. Cutícula. CG-EM. Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

The main function of cuticular lipids in insects is to limit water loss through the surface. However they are also involved in various types of chemical communication between species and reduced penetration insecticides chemicals, and toxins as well as provide protection against the attack of microorganisms, parasites and predators. Numerous species of insect vectors of highly virulent diseases of plants, play a critical role as agricultural pests as in the case of *Rhynchophorus palmarum* which is vector in nematode transmitter red ring disease is responsible for causing damage to the agricultural economy of palm trees, in particular coconut in various regions of the country. However, the susceptibility or resistance of various insect species, infection can result from several factors, including differences in structure and composition of the exoskeleton, and the presence of antimicrobial compounds in the cuticle. The role of the host surface lipids in the pathogenesis of insects is still poorly understood. The determination of cuticular lipids profile is therefore of great importance to understanding insect susceptibility or resistance to infection. This study aimed to characterize the cuticular profile adult insect *R. Palmarum* male and female, and evaluate the presence of antimicrobial activity. The analyzes were performed by gas chromatography-mass spectrometry of the hexane fractions (extract I) and dichloromethane (extract II and III). the main cuticular components were identified as hydrocarbons, alcohols, ketone and aldehyde, both in male and in female, including the presence of alkanes (C₂₅; C₂₇; C₄₃) trimethyl-alkane (C₄₀) identified in the extract II female insect unsaturated hydrocarbons (C_{20:5}) in the extract I female and male, and methyl branched alkene (C_{24:6}) only in female extract II. They identified 10 fatty acid esters of C₁₄ to C₂₃, with variation between the sexes in C_{22:0}, C_{18:1}, C_{21:0} and C_{20:2}. Showed relevant amounts of C₁₆ and C₁₈, the common cuticular lipids extract (II) and internal (III). The extracted chitin cuticle, chitosan and derivative thereof, in the study were characterized by IR and X-ray diffraction. The extracts of cuticle were satisfactory inhibition against *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* and *Candida tropicalis*.

Keywords: *Rhynchophorus palmarum*. Lipids. Cuticle. GC-MS. Antimicrobial activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Dano direto causado pelas larvas de <i>Rhynchophorus palmarum</i> no coqueiro Cocos nucifera.	21
Figura 2- Sintoma interno característico da doença do anel vermelho.	22
Figura 3- Feromônio de agregação de <i>Rhynchophorus palmarum</i>	22
Figura 4- Dimorfismo sexual do <i>Rhynchophorus palmarum</i> (A) rostro liso no inseto adulto fêmea (B) rostro com pelos rígidos no inseto adulto macho (C) inseto adulto fêmea.	24
Figura 5- Etapas do ciclo de vida do <i>Rhynchophorus palmarum</i>	25
Figura 6- Esquema do exoesqueleto (cutícula) dos insetos.	26
Figura 7- Esquema do curso da diferenciação cuticular em embrião de <i>Drosophila melanogaster</i> . O painel superior ilustra secções da epiderme embrionária durante a diferenciação da cutícula. E o painel inferior apresenta a vista de cima sobre o esquema mostrado no painel superior.	27
Figura 8- Estrutura primária de quitina (N-acetil- β -D-glicosamina), onde n é o grau de polimerização.	33
Figura 9- Representação esquemática das estruturas polimórficas de quitina, com as setas representando as cadeias poliméricas no sentido da hidroxila no carbono 4 para a hidroxila no carbono 1.	34
Figura 10- Representação das estruturas primárias de quitina e quitosana, onde n é o grau de polimerização.	35
Figura 11 – Fórmula estrutural das moléculas de (a) hexano e (b) diclorometano	39
Figura 12- Esquema do método de extração dos componentes cuticulares dos insetos macho e fêmea.	40
Figura 13- Processo de extração dos compostos cuticulares. (a) inseto macho e fêmea imerso em solvente, respectivamente; (b) da esquerda para a direita, extrato I e II do inseto fêmea e extrato I e II do inseto macho.	41
Figura 14- Ilustração do procedimento de preparo das amostras para a cromatografia gasosa.	42
Figura 15- Reação de transesterificação de lipídeos.	43
Figura 16- Mecanismo geral de produção de quitosana a partir de quitina.	47
Figura 17- Material resultante da extração e desacetilação de quitina. Da direita pra esquerda, quitosana e quitina devidamente identificadas e armazenadas em tubo do tipo ependorff.	47
Figura 18- Identificação e quantificação das classes químicas dos componentes cuticulares I e II encontrados nos insetos adultos (a) fêmea e (b) macho de <i>Rhynchophorus palmarum</i>	51
Figura 19- Estrutura química da cera Triacitanoilpalmitato formado por um éster de ácido palmítico com o álcool triacntanol.	52
Figura 20– Espectroscopia no infravermelho de quitina isolada da cutícula do inseto <i>Rhynchophorus palmarum</i> (gráfico) e atribuições de bandas relevantes (tabela).	61
Figura 21- Espectroscopia no infravermelho do derivado quitosana a partir da quitina isolada da cutícula do inseto <i>Rhynchophorus palmarum</i>	63
Figura 22– Picos de DRX das amostras de quitina. (a) quitina isolada de insetos adultos de <i>Rhynchophorus palmarum</i> (b) quitina comercial.	64

Figura 23- Picos de DRX das amostras de quitosana. (a) quitosana isolada e (b) quitosana comercial.	65
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Resumo quantitativo da extração: número e massa de inseto; massa de extrato. Extração por imersão do inseto em hexano por 10 segundos (I); extração por imersão do inseto em diclorometano por 5 minutos (II); extração por imersão do inseto em diclorometano por 10 dias (III).....	48
Tabela 2- Ésteres metílicos de ácidos graxos identificados após transesterificação de extratos da cutícula externa e interna diferenciando inseto macho e fêmea por análise em CG-MS.	55
Tabela 3- Ésteres metílicos de ácidos graxos identificados após transesterificação de extratos da cutícula externa e interna diferenciando inseto macho e fêmea por análise em CG com padrão interno.	56
Tabela 4- Determinação da concentração mínima inibitória (CIM) dos extratos brutos (I, II e III) em bactérias.....	58
Tabela 5- Determinação da concentração mínima inibitória (CIM) dos extratos brutos (I, II e III) em fungos.....	59
Tabela 6- Principais atribuições de bandas de quitina identificadas por espectroscopia no infravermelho em espécies de insetos.....	62

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1- Equação utilizada para calcular o índice de retenção (IR) em programa com rampa de temperatura.	44
--	----

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ATCC- American Type Culture Collection

CCD- cromatografia em camada delgada

CG-DIC- cromatografia gasosa com detector de ionização em chama

CG-EM- acoplada ao espectro de massa

CGL- cromatografia de gás-líquido

CIM- concentração inibitória mínima

CL- cromatografia líquida

CLAE- cromatografia líquida de alta eficiência

CL-EM- cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa

CLSI- Manual Clinical and Laboratory Standards Institute (antigo NCCLS)

DRX- Difração Raio-X

ESENFAR- Escola de Enfermagem e Farmácia

HDL- lipoproteína de alta densidade

HPLC – high performance liquid chromatography

I_{CR}- índice de cristalinidade

IFAL- Instituto Federal de Alagoas

IQB- Instituto de Química e Biotecnologia

IR- índice de retenção

KI- índice de Kovats

LPqRN- Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais

MH- Mueller Hinton

NIST- National Institute of Standards and Technology

Pi- padrão interno

PUFAs- ácidos graxos poli-insaturados

RTA- Reflexão Total Atenuada

SOSIFTS- smart omni-sampler infrared Fourier transform spectroscopy

SOTIFTS- smart omni-transmission infrared Fourier transform spectroscopy

TAGs- triglicerídeos

TecNano- Laboratório de Tecnologia de Nanosistemas Carreadores de Substâncias Ativas

TR- tempo de retenção

UFC/ml- unidades formadoras de colônia por ml

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	Insetos como modelo experimental	19
2.2	<i>Rhynchophorus palmarum</i>: O Modelo	20
2.2.1	Origem e distribuição	20
2.2.2	Broca-do-olho-do-coqueiro	20
2.2.3	Impactos na cultura do coqueiro	23
2.2.4	Biologia	23
2.3	Cutícula dos insetos	25
2.3.1	Formação e diferenciação	25
2.3.2	Lipídeos cuticulares e sua importância	27
2.3.3	Atividade antimicrobiana	29
2.3.4	Quitina e Quitosana	32
2.4	Caracterização do perfil cuticular	36
2.4.1	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa	36
3	OBJETIVOS	38
3.1	Objetivo geral	38
3.2	Objetivos específicos	38
4	METODOLOGIA	39
4.1	Insetos	39
4.2	Extração de compostos químicos cuticulares dos insetos	39
4.3	Preparo das Amostras para a Cromatografia Gasosa	41
4.4	Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização em Chamas (CG/DIC)	42
4.5	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)	42
4.6	Transesterificação dos Extratos Lipídicos	43
4.7	Identificação dos Compostos Químicos	43
4.8	Quantificação relativa por área percentual	45
4.9	Atividade Antimicrobiana	45
4.9.1	Concentração inibitória mínima (CIM)	45

4.10	Extração de Quitina Cuticular	46
4.11	Desacetilação de quitina (quitosana)	47
4.12	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de fourier.....	47
4.13	Difração Raio-X (DRX).....	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	48
5.1	Extração de compostos químicos da cutícula	48
5.2	Identificação de compostos cuticulares por CG-EM.....	50
5.3	Transesterificação dos extratos cuticulares e internos para identificação de metil ácidos graxos por CG-EM.....	53
5.4	Atividade antimicrobiana.....	57
5.4.1	Lipídeos Cuticulares	57
5.5	Caracterização de quitina e quitosana	60
5.5.1	Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier	60
5.5.2	Difração de Raio-X (DRX)	63
6	CONCLUSÃO.....	67
7	REFERÊNCIAS	69
8	APÊNDICE A – CROMATOGRAMAS ANÁLISE DE IDENTIFICAÇÃO COM PADRÃO DE ESTERS METÁLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS (PADRÃO EM PRETO E EXTRATO EM ROSA).....	76

1 INTRODUÇÃO

A cutícula do inseto representa a primeira barreira contra inseticidas de contato biológico ou químico, e principalmente resistente à degradação enzimática e exposições à água. Dessa forma, surgiu o crescente interesse, sobre o seu papel na absorção de produtos químicos agrícolas e na prevenção de microorganismos de se fixar e penetrar no tegumento do inseto (NAPOLITANO; JUAREZ 1997).

Massuda e Trigo (2014) comentam em estudo, que a cutícula além de fornecer defesa física, pode conter produtos químicos originado a partir da planta hospedeira, bem como derivados destes compostos produzidos pelas larvas.

Os lipídios estão envolvidos em vários tipos de comunicação química entre as espécies e reduzem a penetração de inseticidas, produtos químicos e toxinas, assim como fornecem proteção contra o ataque de microrganismos, insetos parasitas, e predadores (GOLEBIOWSKI, *et al.* 2010). Entretanto, as composições cuticulares de insetos podem variar a depender da espécie, fase de desenvolvimento, sexo, idade e meio (SZAFRANEK, *et al.* 2012, p. 39).

A cutícula dos insetos, também é conhecida como exoesqueleto quitinoso, pois a sua região mais interna, é composta principalmente por quitina, por isso é considerada um dos principais componentes da cutícula dos insetos (MERZENDORFER; ZIMPOCH, 2003). A quitina consiste em um amino polissacarídeo natural comumente encontrado em invertebrados, formando componentes estruturais no exoesqueleto de artrópodes ou nas paredes celulares de fungos e leveduras (RINAUDO, 2006). É um composto bastante visado de alguns invertebrados, como lagostas, camarão, krill, caranguejo para produzir quitina comercial e derivados como a quitosana. Em insetos, porém, a quitina só foi isolada e caracterizada a partir de algumas poucas espécies de insetos (KAYA, *et al.* 2014b).

Estudos relacionados a fundamentos ecológicos a respeito do inseto *R. palmarum* são bem conhecidos, no entanto, muito pouco se sabe a respeito da sua composição lipídica, especificamente da camada cuticular e sua importância, assim como a sua composição interna quitinosa e lipídica, a fim de propor uma investigação da biologia de artrópodes, como também a pesquisa de substâncias

bioativas, aperfeiçoamento de técnicas para análise de compostos orgânicos, e a investigação para possíveis tratamentos para combate da praga. Diante desse fato, o trabalho se propôs a identificar e caracterizar o perfil de componentes da cutícula do inseto *R. palmarum* e avaliar a presença de atividade biológica desses cuticulares identificados, incluindo componentes lipídicos e quitinosos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Insetos Como Modelo Experimental

Estudos em insetos estão cada vez mais sendo ampliados, na busca de modelos alternativos que possam ser fáceis de manter e infectar, além de passíveis de manipulação genética, e que permitam mimetizar aspectos de defesa de vertebrados após infecção (INSUA, *et al.* 2013).

Os insetos representam um dos grupos mais importantes do reino animal, quer sob o aspecto econômico, ou sob o aspecto médico (LEHANE, 1991). A classe Insecta constitui o grupo mais numeroso dos artrópodes, e compreende cerca de 70% de todas as espécies animais conhecidas, sendo a classe que obteve maior sucesso evolutivo dentre as espécies eucarióticas. Um dos fatores que contribuíram para o seu sucesso foi o fato de manterem um ciclo de vida altamente especializado, onde adultos e larvas se desenvolvem, em sua grande maioria, com hábitos alimentares diferentes. Um fator que contribuiu muito para o sucesso adaptativo do grupo foi, sem dúvida, a presença de asas, que possibilitou a conquista dos ambientes mais diversos. Esta característica lhes permitiram uma maior eficiência na busca do alimento e defesa contra predação, além de garantir o fluxo gênico das espécies através da migração (MARANHÃO, 1977). Além disso, muitas espécies de insetos se reproduzem facilmente e apresentam um ciclo de vida curto, que pode ser acompanhado em todas as fases, possibilitando com isso, um bom modelo para o desenvolvimento de ensaios experimentais. Os insetos têm outra vantagem em relação aos outros grupos, são pequenos e apresentam órgãos que podem ser facilmente manipulados.

Por apresentarem maior resistência a intervenções cirúrgicas, devido ao fato de não necessitarem sofrer incubação para irrigação com oxigênio; por possuírem um sistema nervoso menos complexo, entre outras características, os insetos constituem um grupo de escolha para diversos tipos de estudos dentre eles, genéticos, bioquímicos, celulares e moleculares (GRILLO, 2005).

Alguns estudos, utilizando insetos como modelo, geraram descobertas que podem ser aplicadas aos vertebrados. Com a finalidade de conhecer mais sobre os

mecanismos biológicos que acontecem no desenvolvimento de insetos e fornecer informações para o desenvolvimento de novas formas de controle biológico para insetos-pragas.

2.2 *Rhynchophorus palmarum*: O Modelo

2.2.1 Origem e distribuição

Sabe-se que o gênero *Rhynchophorus* tem ocorrência em quase toda a região tropical do planeta. Mas a espécie *Rhynchophorus palmarum* é típica da América, ocorre desde a Argentina até a Califórnia, incluindo as Antilhas (FERREIRA; WARWICK; SIQUEIRA, 1998). Principalmente na América do Sul e Central, onde a espécie é considerada a principal praga do coqueiro, óleo de palma e cana de açúcar (ESPARZA-DÍAZ, *et al.* 2013).

No Brasil, diversas regiões são afetadas pelo *R. palmarum*, dentre estas, alguns estados já foram relatados, como: Amazonas, Pará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, Rio Grande do Norte, Alagoas, Sergipe e Mato Grosso do Sul (CYSNE, *et al.* 2013a).

Diversos países relataram enormes danos às culturas em plantações de palmeiras, entre eles, incluem Costa Rica, Colômbia, Venezuela e Brasil. O inseto *R. palmarum* foi classificado como uma das maiores pragas importantes em plantações de palmeiras comerciais (SANTANA, 2014).

2.2.2 Broca-do-olho-do-coqueiro

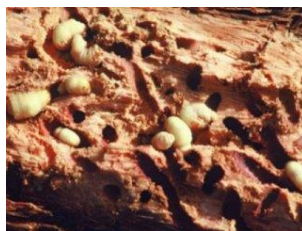
O coqueiro da espécie *Cocos nucifera* L., assim como outras 22 espécies da família Arecaceae, podem ser consideradas plantas hospedeiras do *Rhynchophorus palmarum*, além de outras 12 famílias botânicas. Entretanto, a Arecaceae apresenta o maior número de espécies hospedeiras. Exemplos de plantas hospedeiras (ou fonte alimentares do inseto praga), são: a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), a banana (*Musa* spp. L.) o dendê (*Elaeis guineenses* Jacq.), o mamão (*Carica papaya* L.), o abacaxi (*Ananas comosus* L.), a palma do óleo (*Elaeis guineenses*), entre outras. Com tudo, o inseto só é considerado praga nas palmeiras, devido aos consideráveis danos já relatados. As outras culturas

relatadas, são fontes alternativas de alimento, por isso ele pode ser considerado inseto polífago (CYSNE, *et al.* 2013b).

Os insetos são normalmente atraídos pela exsudação da seiva e os odores da fermentação, principalmente para a oviposição nas cicatrizes recém abertas na planta pelo corte provocado pelos próprios insetos ou outro dano. Além disso, existe um forte fator de atração do inseto pela planta hospedeira além da fonte de alimento, quando o inseto encontra a planta hospedeira, o macho passa a exalar feromônios de agregação, que atraem machos e fêmeas, que, por sua vez, se agrupam sobre a fonte de alimento, e com isso, o macho pode detectar a fêmea para realizar a cópula (FERREIRA; WARWICK; SIQUEIRA, 1998).

A ação nociva das pragas pode ser observada desde a implantação da cultura do coqueiro. Após penetrar na parte apical da planta, atraídos pelos odores da fermentação produzidos pelas plantas infestadas ou estressadas, a fêmea faz a postura dos ovos nas cicatrizes recém-abertas. As larvas, ao eclodirem, passam a alimentar-se dos tecidos meristemáticos, que é tecido responsável pelo crescimento e desenvolvimento da planta, onde constroem galerias (**Figura 1**) por toda parte da planta, e por isso a colebroca, como é chamada, ocasiona atraso no desenvolvimento vegetativo e retardamento do início da produção, podendo ocasionar a morte da planta (DUARTE; LIMA, 2001). Devido ao dano direto causado pelas larvas, o *Rhynchophorus palmarum* é popularmente conhecido como Broca-do-olho-do-coqueiro, bicudo ou como broca-do-coqueiro.

Figura 1- Dano direto causado pelas larvas de *Rhynchophorus palmarum* no coqueiro *Cocos nucifera*.



Fonte: FERREIRA; WARWICK; SIQUEIRA, 1998.

O inseto adulto é considerado uma das importantes pragas da cultura do coqueiro por ser vetor do nematóide *Bursaphelenchus cocophilus*, agente causal de uma doença mortal para esta planta conhecida como o Anel vermelho (**Figura 2**),

que também é responsável por perdas significativas das plantas em pequenas e grandes propriedades (FERREIRA; MICHEREFF FILHO, 2002).

Figura 2- Sintoma interno característico da doença do anel vermelho.

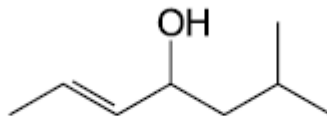


Fonte: FERREIRA, *et. al*, 2014.

A medida mais prática e comum adotada, consiste na erradicação pelo corte e queima das plantas infestadas pela doença do anel vermelho, porém as formas jovens da broca do olho do coqueiro podem permanecer vivas no interior da planta que não foi queimado, além de acelerar o processo de fermentação pela queima ineficiente, e por consequência, atrair ainda mais insetos reinfestando as plantas sadias.

A descoberta do feromônio de agregação do *R.palmarum*, denominado rincoforol (6-metil-2-hepten-4-ol) (**Figura 3**), permitiu o uso da coleta massal dos insetos, se tornando o manejo de escolha para o controle da praga. A técnica consiste no uso do feromônio sintético (rincoforol) associado a uma isca vegetal (por exemplo, cana-de-açúcar) com poder de fermentação, que age como sinergista, depositados em armadilhas no meio ambiente (FERREIRA, *et al.* 2014).

Figura 3- Feromônio de agregação de *Rhynchophorus palmarum*.



6-Metil-2-hepten-4-ol (Rincoforol)

Fonte: NAVARO, *et al.*, 2002.

O controle biológico também pode ser uma outra medida adotada por meio de parasitoides e fungos entomopatogênicos. Há algum tempo, o uso do controle biológico tem sido feito com o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (FERREIRA, *et al.* 2014). Em condições laboratoriais, o Óleo de Neem Puro®

mostrou-se eficiente no controle de adultos da broca-do-olho-do-coqueiro (SABINO, *et al.* 2014). Porém, nenhuma técnica totalmente eficaz foi posta em prática para controle permanente desta praga, tanto pela captura, quanto por utilização de agentes químicos.

2.2.3 Impactos na cultura do coqueiro

A agricultura exerce grande importância na economia do Brasil, sendo a cocoicultura uma fração significativa dentro da economia agrícola nacional. Em dados do IBGE de 2013, estimou-se que a cultura do coco ocupou uma área de aproximadamente 260 mil ha com produção de aproximadamente dois bilhões de frutos dispersos por quase todo Brasil. No entanto, verificou-se uma redução total da área em aproximadamente 8.000 ha a um nível de produtividade constante nacionalmente nos últimos anos com 7,0 mil e 7,4 mil frutos/ha entre 2003 e 2013. Essa produtividade estagnada, mesmo diante das variações regionais de produtividade, é caracterizada pelos chamados riscos fitossanitários decorrente das pragas e doenças (ALMEIDA, *et al.* 2015).

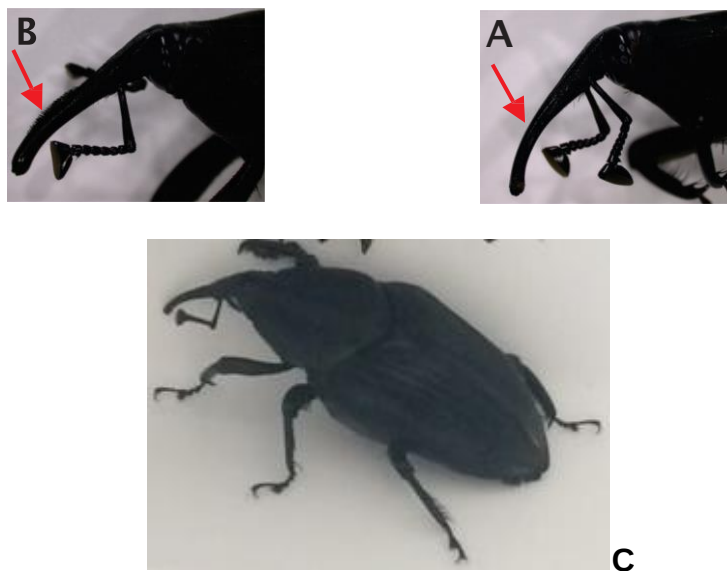
A broca-do-olho-do coqueiro, assim como a doença do anel vermelho tem incidência em todas as regiões do Brasil. Em especial, na região nordeste, a cultura do coqueiro (*Cocus nucifera* L.) é de fundamental importância para a economia dos Estados. Porém sua exploração é limitada pela presença do inseto-praga (DUARTE, *et al.* 2003). Em Alagoas, ações em pesquisa identificaram e priorizaram, dentre os problemas que mais causam prejuízos à produtividade dos coqueirais alagoanos, as pragas e doenças. Alagoas possui condições naturais propícias ao cultivo do coqueiro, entretanto a incidência de pragas e doenças nos coqueirais constitui um problema limitante a essa exploração, respondendo, de maneira significativa, pelo depauperamento geral da cultura e também pela baixa produtividade registrada (ARAGÃO, 2003).

2.2.4 Biologia

O inseto pertence a maior ordem de animais existente, (**Ordem:** *Coleoptera*; **Família:** *Curculionidae*), conhecida como a ordem dos besouros ou cascudos. O *Rhynchophorus palmarum* (**Figura 4**), é caracterizado principalmente por seu par de asas anterior endurecido, chamadas de élitros, que deixa exposta a parte

terminal do abdômen. Consiste em um besouro de cor preta opaca aveludada, caracterizado por apresentar um rostro (bico recurvado) forte, e com antenas em forma de cotovelo (FERREIRA; MICHEREFF FILHO, 2002).

Figura 4- Dimorfismo sexual do *Rhynchophorus palmarum* (A) rostro liso no inseto adulto fêmea (B) rostro com pelos rígidos no inseto adulto macho (C) inseto adulto fêmea.

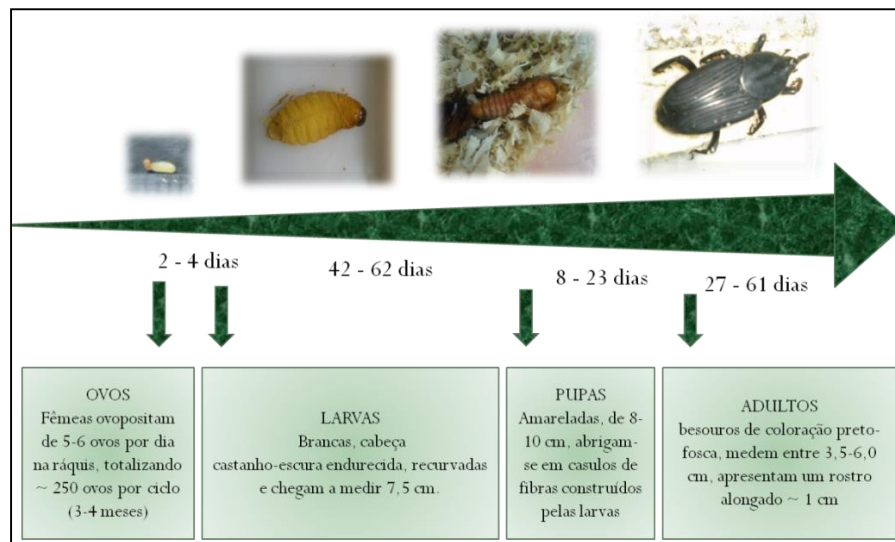


Fonte: SEPÚLVEDA-CANO; RUBIO-GÓMEZ, 2009; Laboratório de bioquímica e fisiologia de insetos - LBFI.

Como outros insetos da família *Curculionidae*, este também é caracterizado por seu aparelho bucal (sugador labial) modificado em forma de rostro. O rostro caracteriza o dimorfismo sexual (**Figura 4A e Figura 4B**). No inseto fêmea, o rostro é mais comprido, delgado e curvo; no macho, apresenta pêlos rígidos em forma de escova, sendo responsável pela liberação do feromônio de agregação durante a fase reprodutiva (**Figura 4C**) (SEPÚLVEDA-CANO; RUBIO-GÓMEZ, 2009). O adulto pode medir de 2 a 6 cm de comprimento e sua forma larvar se alimenta da gema apical da planta, mostrado na **Figura 1**, o que pode acarretar em um dano fatal para o vegetal (SÁNCHEZ-SOTO, NAKANO, 2002).

O inseto apresenta metamorfose completa (todas as fases) com hábitos diurnos. O ciclo de vida, varia entre 132 a 215 dias, sendo dividido em quatro etapas: ovo; larva; pupa e adulto (**Figura5**) (NEGRISOLI JÚNIOR, 2011; CYSNE, 2013a).

Figura 5- Etapas do ciclo de vida do *Rhynchophorus palmarum*.



Fonte: BATISTA, 2014.

Os ovos são lisos e apresentam coloração branco creme. A larva pode se desenvolver por até 10 ínstaes e pode medir até 7,5 cm de comprimento e 2,5 cm de largura. Seu corpo apresenta 13 anéis enrugados, uma cabeça escura avermelhada e aparelho bucal desenvolvido. No momento em que a larva empupa, ela tece um casulo com fibras vegetais da própria planta hospedeira. A pupa passa a apresentar membro de adulto e permanece no interior do casulo até emergir na forma adulta. Na fase adulta, as fêmeas podem iniciar o acasalamento a partir do quinto dia após a saída do casulo e realizar uma ovopostura de, em média, 250 ovos durante todo o seu ciclo de vida (CYSNE, 2013a).

2.3 Cutícula dos Insetos

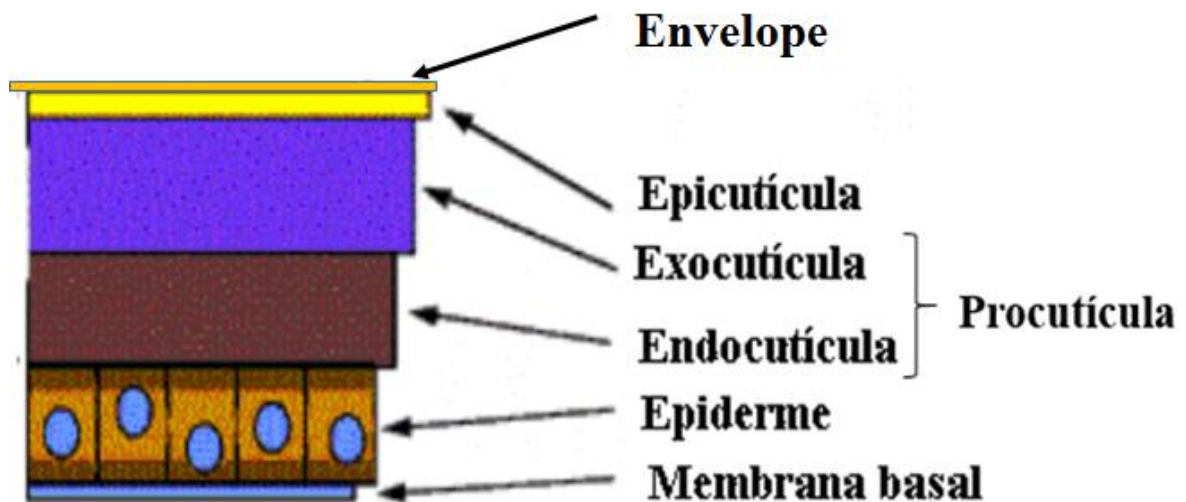
2.3.1 Formação e diferenciação

A superfície externa dos insetos, denominada cutícula, abrange todos os tecidos expostos, incluindo o corpo, o intestino grosso e traqueia. A cutícula fornece proteção, sustentação e auxilia na locomoção do inseto. Consiste numa matriz extracelular apical produzida pela epiderme e traqueia durante a embriogênese, e sofre um processo de renovação durante a muda e a metamorfose. (MOUSSIAN, 2010).

A natureza hidrofóbica da cutícula proporciona ao inseto a primeira barreira de proteção contra a desidratação, agentes químicos e microrganismos invasores.

A distribuição dos componentes cuticulares é referente a uma espécie específica e a arquitetura da região estratificada (MOUSSIAN, 2010). A cutícula pode ser dividida em três camadas: cutícula externa (ou envelope) à prova d'água, epicutícula rica em proteínas, e a procutícula (exo e endocutícula) a qual apresenta uma estrutura quitinosa no interior, que liga a região cuticular com a membrana plasmática apical das células epidérmicas através da chamada zona de montagem (**Figura 6**) (MOUSSIAN, *et al.* 2006).

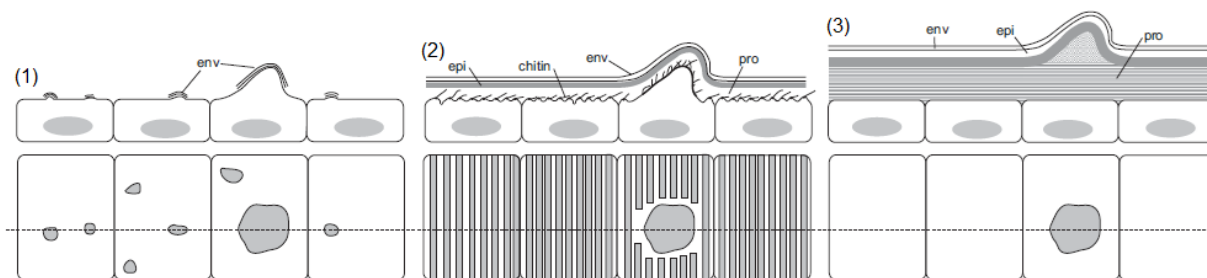
Figura 6- Esquema do exoesqueleto (cutícula) dos insetos.



Fonte: adaptada de DAFFRE, 2013.

Moussian e colaboradores (2006) propuseram a diferenciação da cutícula estudando embriões de *Drosophila melanogaster*, por identificação de três fases. A primeira inicia-se no embrião, a partir da membrana plasmática apical a qual faz saliências (manchas cinzentas) em posições aleatórias formando os fragmentos do envelope (**Figura 7-1**). Em seguida, ondulações longitudinais regulares emergem (Cinza), subdividindo a superfície apical em quitina (**Figura 7-2**), e finalmente, a epi- e procutícula engrossam simultaneamente e conseqüentemente ocorre a diferenciação (**Figura 7-3**).

Figura 7- Esquema do curso da diferenciação cuticular em embrião de *Drosophila melanogaster*. O painel superior ilustra secções da epiderme embrionária durante a diferenciação da cutícula. E o painel inferior apresenta a vista de cima sobre o esquema mostrado no painel superior.



Fonte: MOUSSIAN, 2010.

A procutícula do inseto é a divisão mais espessa da cutícula, e mais espessa do que a procutícula larval, subdivide-se em uma parte superior, chamada de exocutícula, e uma zona inferior, chamada endocutícula. A epicutícula é um complexo de matriz extracelular construído por meio de atividade paralela e cooperativa do citoplasma, associada à membrana e a processos extracelulares. O envelope consiste numa camada de cera que pode entrar em choque pelo processo de fixação (MOUSSIAN, 2010).

Um dos papéis dos lipídios epicuticulares dos insetos é servir como uma grande barreira contra a perda de água e, por isto, a dessecação tem sido frequentemente abordada. Além da sua participação nos processos de comunicação química como feromônios de agregação, atração sexual, e, como afrodisíacos, também é bem conhecido (KÜHBANDNER, *et al.* 2012).

2.3.2 Lipídeos cuticulares e sua importância

Os lipídeos são nutrientes importantes na dieta, e fundamentais para todos os sistemas biológicos, pois exercem importantes funções na homeostasia energética, fisiologia reprodutiva e participam de uma variedade de caminhos de sinalização, e, além disso, estão inclusos em inúmeros aspectos da biologia celular (SESSLER; NTAMBI, 1998).

O estudo da composição lipídica em sistemas eucariontes evidencia a sua extrema complexidade. Pois uma célula individual pode ter mais de 1.000 lipídios diferentes, e um organismo ou tecido, entre 10.000 e 100.000 lipídios diferentes. A relevância funcional dessa imensa diversidade de lipídios ainda não é clara. Dentre as classes de lipídios, uma grande variedade de ácidos graxos com diferentes

cadeias podem ser associados, contribuindo para uma porção significativa da diversidade lipídica observada. Em estruturas de membrana, a composição de ácidos graxos de fosfolipídios pode influenciar bastante membrana, tais como espessura, fluidez, tensão, curvatura, e formação de microdomínios. E em demais regiões, pode haver enzimas lipase a qual pode clivar triglicerídios e fosfolipídios, liberando os respectivos ácidos graxos livres que podem funcionar como moléculas de sinalização importantes no metabolismo do organismo. Entre os ácidos graxos, os poli-insaturados (PUFAs) e seus derivados de sinalização, os eicosanóides e endocanabinóides, estão envolvidos numa variedade de processos biológicos, incluindo a inflamação e respostas imunes, neurorecepção, desenvolvimento e a maioria dos processos de reprodução (VRABLIK, WATTS, 2013).

Nos insetos existe uma capacidade de utilizar eficientemente os lipídios como substratos para reprodução, embriogênese, metamorfose e vôo, extremamente importante para o seu desenvolvimento, proteção e perpetuação da espécie. Neste sentido, os lipídios são utilizados como um meio de comunicação através da liberação de ferormônios; regulação de uma variedade de processos fisiológicos por hormônios; proteção contra um ambiente dessecante pela presença de ceras cuticulares; e constituintes celulares presentes em membranas (GILBERT; CHINO, 1974).

Os lipídios cuticulares em insetos variam em composição e quantidade dependendo da espécie e estágio de desenvolvimento. Com tudo, a composição de ácidos graxos de um microrganismo é determinada pelo tipo de via biossintética da espécie. Desta forma, a análise da composição lipídica é rotineiramente utilizada para a identificação e diferenciação de microorganismos. Os perfis específicos de ácidos graxos e de fosfolipídios totais da célula também têm sido utilizados para estimar biomassa microbiana e fornecer informações sobre a diversidade e estado nutricional dos microrganismos. Podem variar dependendo do ciclo de vida e da atividade metabólica, e são influenciados por inúmeros fatores ambientais e de estresse (GOLEBIEWSKI, *et al.* 2010).

Acredita-se que os lipídios da dieta são responsáveis por uma pequena parte da cutícula, para a maioria das espécies. E que o principal local de biossíntese de

hidrocarbonetos cuticulares ocorre nas células associadas com a camada epidérmica ou corpo adiposo periférico, especificamente nos *oenocytes*, geralmente encontrado dentro do tegumento abdominal e identificado como local para síntese de hidrocarbonetos. Os hidrocarbonetos sintetizados são então carregados até a lipofirina na hemolinfa e transportado para locais de deposição. Sendo que para transferir estes compostos para outras partes do corpo, pressupõe-se que haja uma lipoproteína de alta densidade (HDL) responsável por essa transferência (BLOMQUIST, BAGNÈRES, 2010, p. 35-37).

A importância dada a cutícula dos insetos corresponde ao perfil de componentes presentes na camada de cera sobre a cutícula que é composta por mistura complexa de hidrocarbonetos de cadeia longa, ácidos graxos, álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas que protege insetos da dessecação, assim como, alguns destes compostos, também têm papéis secundários como feromônios de contato (GINZEL, *et al.* 2006).

Hidrocarbonetos são os principais componentes cuticulares de insetos, nesta classe estão inclusos hidrocarbonetos saturados e insaturados de cadeia linear e hidrocarbonetos metil-ramificados. As classes químicas normalmente encontradas, são os ésteres de cera, aldeídos de cadeia longa, álcoois, ácidos graxos livres, cetonas e acilgliceróis (GOLEBIEWSKI, *et al.* 2013a). As composições cuticulares de insetos podem variar a depender da fase de desenvolvimento, sexo, idade e meio ambiente que vivem (SZAFRANEK, *et al.* 2012).

2.3.3 Atividade antimicrobiana

A partir do início da década de 1970, foram demonstrados estudos sobre os efeitos dos ácidos graxos sobre a resposta imune, como suas atividades antimicrobianas e antifúngicas (FERREIRA, *et al.* 2012).

A relação estrutura atividade dos ácidos graxos encontra-se intimamente relacionada a estrutura e forma com que ele se apresenta no meio. Os ácidos graxos são constituídos de uma estrutura hidrocarbonada apresentando em uma extremidade um grupo carboxil (-COOH) e, na outra extremidade, um grupo metil (-CH₃). Com isso, a atividade pode variar a depender do comprimento da cadeia de carbono e a presença, número, posição e orientação de ligações duplas. No

entanto, são sugeridas algumas tendências gerais, como a presença do grupo -OH do grupo carboxil ser importante para a atividade antibacteriana. Além disso, são relatados em literatura algumas relações estrutura atividade, como por exemplo, ácidos graxos de cadeia média e longa insaturada que tendem a ser mais ativos contra bactérias Gram-positivas do que Gram Negativas. Em geral, ácidos graxos insaturados tendem a ter uma maior potência do que ácidos graxos saturados com o mesmo comprimento da cadeia de carbono. Sendo que ácidos graxos monoinsaturados, apresentaram uma atividade mais significativa entre 14 ou 16 átomos de carbono. E para ácidos graxos saturados, existe uma maior atividade em 10 ou 12 átomos de carbono, porém, a eficácia antibacteriana tende a diminuir à medida que o comprimento da cadeia fica mais longo ou mais curto. Entretanto, ainda não se sabe exatamente como os ácidos graxos exercem as suas atividades antimicrobianas, mas pela sua principal função estar relacionada a estrutura de membrana, assim como precursores de mensageiros intracelulares e geração de ATP, o alvo principal parece ser a membrana celular bacteriana e os vários processos essenciais que ocorrem dentro e na membrana. O mecanismo de ação pode estar envolvido no rompimento da cadeia de transporte de elétrons, vazamento de metabólitos celulares, lise celular, indução de autólise, inibição da biossíntese de ácidos graxos, interferência na fosforilação oxidativa, formação de produtos de peroxidação ou auto-oxidação, inibição da absorção de nutrientes e inibição enzimática (DESBOIS; SMITH, 2010).

É notável a existência de uma ação química de proteção externa e interna em seres vivos. Os ácidos graxos, em especial, exercem efeito potencial sobre a germinação de esporos de fungos e a sua diferenciação. Dessa forma, é possível que haja presença de ação tóxica, fungistática, ou ocasionalmente, para algumas espécies patogênicas, efeito estimulatório (GOŁEBIOWSKI, *et al.* 2012a).

A partir do conhecimento explorado pela medicina popular, em especial a medicina tradicional chinesa, o extrato de corpos de insetos são amplamente utilizados para tratar doenças purulentas superficiais como infecções de garganta, ouvido, furúnculo, carbúnculo, cancro e muitas outras doenças. A barreira de lipídeos cuticulares presentes em insetos é composta de uma matriz diversificada

de compostos com muita variação no conteúdo e na composição. No entanto, estas variações normalmente se estendem por diferentes estágios de desenvolvimento (larva, pupa e adulto) e estágio larvar do inseto (PEDRINI, *et al.* 2013; GOŁEBIOWSKI, 2012a). Mas além de um conhecimento empírico, sabe-se que a atividade antimicrobiana de lipídeos cuticulares presente nos insetos é frequentemente descrita em alguns estudos (KERWIN, 1981; GOŁEBIOWSKI, 2008b, 2012b; URBANEK, 2012).

Em particular, os ácidos graxos livres podem ser responsáveis pela resistência à infecção fúngica como detectado em *Bombyx mori* e em *Hyphantria cunea*. O estudo identificou a ação de ácidos graxos de cadeia curta (C₆ a C₁₂) capaz de inibir a germinação de conídios e crescimento de hifas de *Beauveria bassiana* e *Pacilomyces fumoso-roseus* (SALTO, 1983). Os ácidos graxos foram desenvolvidos para exercer profundo controle fisiológico sobre o desenvolvimento de conídios. Em combinação com quitina, quitosana, ácido oleico (C_{18:1}), consistentemente, induziu germinação de conídios vegetativos. O ácido palmitoleico (C_{16:1}), ácido linoleico (C_{18:2}) e ácido linolênico (C_{18:3}) foram tóxicos para os conídios em ampla gama de concentrações. Ácidos graxos cuticulares são tóxicos e fungistáticos, mas também podem ter ação estimuladora. Por exemplo, o ácido palmitoleico aumenta o crescimento micelial, mas é tóxico para os conídios de *Erynia variabilis* (KERWIN, 1984).

Os ácidos graxos constituem uma importante fonte de energia, além de desempenhar um papel fundamental na transdução de sinais, bem como na acilação de proteínas necessárias para o crescimento do organismo, diferenciação, reprodução e homeostase. Esta pode ser uma razão explicável à ação de ácidos graxos e álcoois de cadeia média e curta que demonstraram toxicidade para fungos filamentosos, como descrito anteriormente, incluindo alguns isolados especificamente, a partir da cutícula do inseto. Porém, a toxicidade de ácidos graxos de cadeia longa ainda é desconhecida. (GOŁEBIOWSKI, *et al.* 2012a).

A suscetibilidade ou resistência de várias espécies de insetos a invasão de fungos pode resultar de vários fatores, incluindo diferenças na estrutura e

composição do exoesqueleto, a presença de compostos antifúngicos na cutícula, bem como a eficiência de reações de defesa celular e humoral do inseto. Acredita-se que o perfil lipídico epicuticular do inseto hospedeiro pode ser um dos fatores fundamentais que determinam susceptibilidades ou resistência ao ataque de fungos (GOLEBIEWSKI, 2012a). O tegumento quitinoso esclerotizado de um inseto forma uma barreira eficaz contra a invasão primária pela maioria dos microorganismos, por isso, a via de infecção de insetos através do canal alimentar é bastante comum (GILLESPIE, *et al.* 2000).

No entanto, apesar de outros microorganismos insetopatogênicos necessitarem ser ingeridos para iniciar doença (como por exemplo, vírus, bactérias, nematódeos e protozoários), fungos entomopatogênicos, como *Metarhizium anisopliae*, *Conidiobolus coronatus* e *Beauveria bassiana* invadem, principalmente, por penetração através da cutícula do inseto. Essa invasão ocorre de determinadas formas a depender da espécie do inseto e seus componentes cuticulares. E uma vez que foi estabelecido que a abrasão a cutícula por si só é suficiente para induzir níveis reforçados de atividade antimicrobiana na cutícula e gordura corporal, pode-se dizer que o exoesqueleto de insetos parece participar ativamente das respostas imune humoral (BREY, 1993).

2.3.4 Quitina e Quitosana

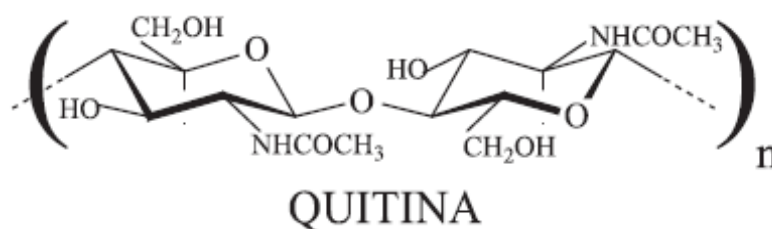
O *Rhynchophorus palmarum*, assim com os demais animais artrópodes, tem como característica um exoesqueleto quitinoso, chamado de cutícula. A região não quitinosa da cutícula oferece proteção através de diferentes compostos como quinonas, lipídios e proteínas. Já a região mais interna, é composta principalmente por quitina, por isso é considerado um dos principais componentes da cutícula dos insetos (MERZENDORFER, ZIMMICH, 2003).

A quitina foi identificada pela primeira vez em 1811, isolada de cogumelos pelo professor francês Henri Braconnot, o qual a nomeou como fungina. Pouco tempo depois, em 1823, Odier isolou da carapaça dos insetos uma substância insolúvel em água e solventes orgânicos que ficou conhecida como quitina, sendo este nome derivado da palavra grega *Chiton*, que significa carapaça ou caixa protetora (RAVI KUMAR, 2000). No entanto, acreditava-se que esta quitina isolada

de insetos fosse a mesma encontrada nas plantas, mas somente em 1843, Payen diferenciou a quitina da carapaça dos insetos por conter nitrogênio em sua estrutura, que seria ausente na quitina de planta que é a celulose (ALMEIDA, *et al.* 2009).

A quitina é o amino polissacarídeo natural mais comum. É um polímero linear formado por unidades de *N*-acetil- β -D-glicosamina (**Figura 8**), unidas por ligações β 1-4, produzido principalmente por fungos, artrópodes e nematóides. Em insetos, é um importante componente estrutural, pois apoia as cutículas da epiderme e traqueia, bem como a matriz peritrófica que reveste o epitélio intestinal. Na cutícula, é encontrada apenas na camada da procutícula, incluindo exo e endocutícula. (MERZENDORFER, ZIMOCH, 2003). O resíduo *N*-acetil-D-glicosamina é composto por três grupos funcionais reativos, um grupo amino (ligado ao carbono 2) e dois grupos hidroxila, primário (ligado ao carbono 3) e secundário (no carbono 6).

Figura 8- Estrutura primária de quitina (*N*-acetil- β -D-glicosamina), onde **n** é o grau de polimerização.



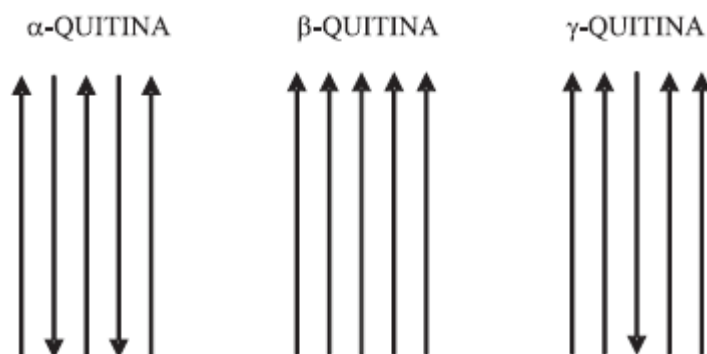
Fonte: CAMPANA-FILHO, *et al.* 2007.

Depois da celulose, a quitina é o biopolímero mais abundante na natureza, comumente encontrada em invertebrados, como em cascas de crustáceos e cutícula de insetos. A quitina exerce papel importante na cutícula de insetos por conferir, junto a outras proteínas, principalmente *resilin* (rica em glicina e prolina), flexibilidade em determinadas regiões dobráveis da cutícula; no crescimento e desenvolvimento do inseto, no processo de muda (ecdise) pela capacidade de remodelar as estruturas quitinosas devido a capacidade de sintetizar e degradar quitina de forma controlada durante esse processo. Além de propriedades estruturais, a quitina apresenta propriedades protetoras contra danos mecânicos, toxinas e patógenos na matriz peritrófica (membrana do intestino médio) do inseto, além de auxiliar o processo digestivo (MERZENDORFER; ZIMOCH, 2003).

A quitina, em geral, pode apresentar três diferentes estruturas polimórficas, conhecidas como α -, β - e γ - quitina. No entanto a α -quitina é a estrutura em

destaque na cutícula de insetos, característica de estruturas rígidas e resistentes, diferente da β - e γ - quitina presente em estruturas flexíveis. A α -quitina é conhecida por apresentar suas cadeias poliméricas em disposição antiparalela (**Figura 9**), e por isso proporcionar a formação de ligações de hidrogênio inter- e intra-cadeias (CAMPANA-FILHO, *et al.* 2007).

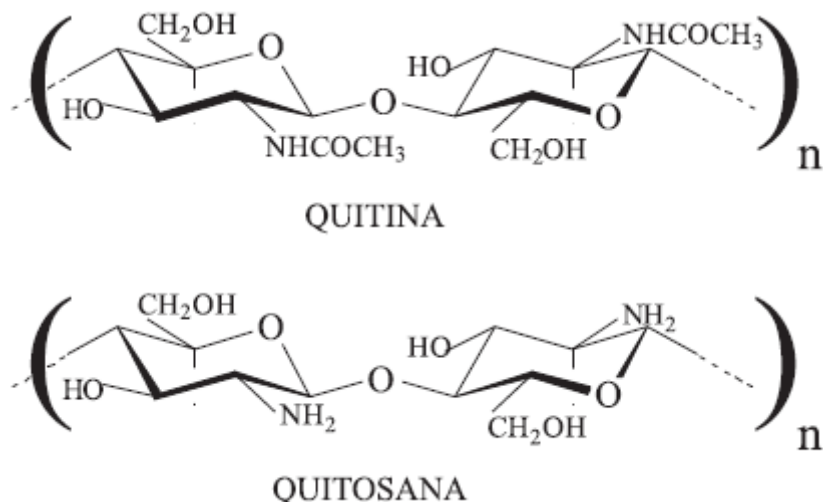
Figura 9- Representação esquemática das estruturas polimórficas de quitina, com as setas representando as cadeias poliméricas no sentido da hidroxila no carbono 4 para a hidroxila no carbono 1.



Fonte: CAMPANA-FILHO, *et al.* 2007.

A quitina pode fornecer um derivado importante por desacetilação (derivado N-desacetilado), chamado quitosana (**Figura 10**). A quitosana é considerada um material de grande interesse industrial, tecnológico e farmacêutico, pois apresenta características importantes para diversas aplicações, em especial para aplicações biomédicas, como o seu caráter básico, a biocompatibilidade em meio fisiológico, além de ser biodegradado em um resíduo não tóxico. Como a quitosana não é presente de forma abundante no meio ambiente, ela pode ser facilmente derivada através da desacetilação da quitina. Este derivado é um polissacarídeo semi cristalino, um copolímero de $\beta(1\rightarrow4)$ -D-glucosamina e $\beta(1\rightarrow4)$ -N-acetil-D-glucosamina (BATTISTI, CAMPANA-FILHO, 2008; CROISIER, JÉRÔME, 2013).

Figura 10- Representação das estruturas primárias de quitina e quitosana, onde n é o grau de polimerização.



Fonte: BATTISTI, CAMPANA-FILHO, 2008.

Resíduos como a casca de alguns invertebrados, como lagostas, camarão, krill, caranguejo e lulas são comumente gerados, e com isso, estes podem ser reutilizados para produzir quitina comercial e derivados como a quitosana. Em insetos, porém, a quitina só foi isolada e caracterizada a partir de algumas espécies como, *Bombyx mori* (bicho-da-pupa exuvia), *Bombus terrestris* (zangão), *Musca domestica* (larvas de mosca), *Holotrichia parallela* (besouro), *Hogna radiata* e *Geolucosa vultuosa* (KAYA, et al. 2014b).

A formação do derivado quitosana a partir de quitina ocorre em meio fortemente ácido, para hidrolisar a maioria dos grupos acetamida do polímero de quitina. Essa reação proporciona regiões com presença de grupos amino na estrutura da quitosana, diferenciando da quitina. Devido a essas regiões, a quitosana passa a apresentar propriedades mais interessantes, diferentes da quitina. Pois os grupos aminos ao longo da estrutura da quitosana podem ser protonados em meio ácido ($\text{pH} < 6$) conferindo cargas positivas na estrutura, que proporcionam a sua solubilidade em meio aquoso, porém dependente de pH. Além disso, essa região se torna alvo para formação de diferentes complexos, e consequentemente desperta grande interesse em diversas áreas da indústria e pesquisa (CROISIER; JÉRÔME, 2013).

2.4 Caracterização do Perfil Cuticular

2.4.1 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

A cromatografia gasosa consiste num método físico de separação de componentes de uma mistura através de uma fase móvel gasosa inerte sobre um solvente estacionário (AQUINO NETO, NUNES, 2003, p. 71). O primeiro espectrômetro de massa foi construído em 1918 por A. J. Dempster, mas foi somente nas décadas de 1980 e 1990 que houve o desenvolvimento de técnicas de ionização de compostos de alto peso molecular, além da acessibilidade, alta resolução e confiabilidade, que permitiu o uso da espectrometria de massa uma técnica indispensável em diversos campos de atuação (LAMPMAN, *et al.* 2010, p. 399).

A análise do perfil cuticular em insetos por cromatografia gasosa foi aplicada pela primeira vez na década de 1960, com o desenvolvimento da cromatografia de gás-líquido (CGL). Grande parte dos trabalhos publicados que lidam com este tipo de estudo fazem uso, preferencialmente, de análise por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (CG-DIC) ou acoplada ao espectro de massa (CG-EM), em vez de cromatografia líquida (CL), cromatografia em camada delgada (CCD) ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Isso se justifica pelo fato da CG isolar e identificar os constituintes da mistura de cera de um complexo, a fim de se obter informação sobre a sua composição qualitativa e quantitativa. A cutícula além de conter basicamente, hidrocarbonetos, ácidos graxos, álcoois, triglicerídeos e ésteres, apresenta uma camada de ceras em sua superfície, na qual evidencia o primeiro passo para o desenvolvimento de métodos de controle de insetos por meio da análise e identificação das ceras e demais constituintes da sua superfície (SZAFRANEK, *et al.* 2012).

O objetivo da CG é resolver os constituintes da mistura do complexo de cera, a fim de obter informações sobre a sua composição, ocorrendo de duas formas: (1) análises de cera cuticular intacta (extratos ou frações); (2) análise de derivação química de grupos funcionais (SZAFRANEK, *et al.* 2012). Porém, para as análises qualitativas e quantitativas, a cromatografia gasosa nem sempre permite uma identificação definitiva dos analitos, assim como a espectrometria de massa

também não fornece conclusões da estrutura dos componentes. Por isso, torna-se necessário o uso das técnicas acopladas como a (CG-EM) e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (CL-EM).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

- Caracterizar o perfil químico da cutícula do inseto adulto macho e fêmea de *Rhynchophorus palmarum*, e avaliar a presença de atividade antimicrobiana.

3.2 Objetivos Específicos:

- Extrair compostos da cutícula do inseto macho e fêmea de *Rhynchophorus palmarum*;
- Caracterizar o perfil cuticular no inseto macho e fêmea;
- Caracterizar o perfil lipídico através da identificação dos ésteres metílicos de ácidos graxos do inseto adulto;
- Identificar a atividade antimicrobiana de extratos cuticulares por quantificação da concentração inibitória mínima (CIM)
- Isolar e caracterizar a quitina da cutícula de *Rhynchophorus palmarum*;
- Testar a quitina cuticular do inseto na obtenção de um derivado quitosana.

4 METODOLOGIA

Toda a metodologia descrita foi realizada nas unidades de pesquisa da Universidade Federal de Alagoas – campus A. C. Simões, no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos (LBFI), Laboratório de Pesquisa em Tratamento de Feridas (LpTF), Laboratório de Tecnologia de Nanosistemas Carreadores de Substâncias Ativas (*TecNano*), localizados na Escola de Enfermagem e Farmácia (ESEN FAR), como também no Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais (LPqRN), situado no Instituto de Química e Biotecnologia (IQB).

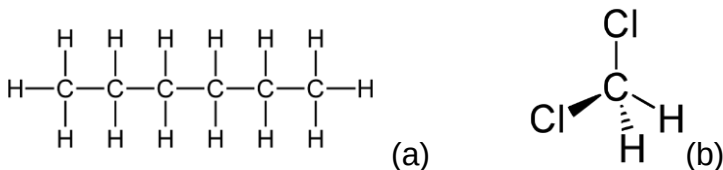
4.1 Insetos

O inseto adulto de *Rhynchophorus palmarum*, utilizado para realização desta pesquisa, foi coletado em diferentes regiões do Estado de Alagoas por meio de armadilhas com o rincoforol (feromônio sintético), fornecido pela empresa Interacta Química Ltda (Campus A. C. Simões - Universidade Federal de Alagoas) e iscas alimentares (cana de açúcar). As armadilhas foram mantidas em região cedida pelo Instituto Federal de Alagoas (IFAL) situado próximo ao município de Satuba e em diversos pontos do litoral sul, no município de Feliz Deserto.

4.2 Extração de compostos químicos cuticulares dos insetos

As extrações foram desenvolvidas no laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos. O método para extração das amostras cuticulares do inseto consistiu num procedimento químico relativamente simples. Realizou-se por aplicação de solventes apolares em todo o corpo do inseto. Os solventes utilizados foram hexano e diclorometano (**Figura 11**), de muito baixa e baixa polaridade, respectivamente, obedecendo a ordem de extração de compostos lipídicos dos externos aos mais internos. A metodologia empregada foi adaptada com base na descrita por Golebiowski, 2012a.

Figura 11 – Fórmula estrutural das moléculas de (a) hexano e (b) diclorometano.



Os solventes utilizados permitiram a separação de compostos conforme sua polaridade e localização na cutícula do inseto. O hexano foi utilizado na primeira etapa da extração, por se tratar de um solvente apolar e dissolver mais fácil e rápido as moléculas lipídicas da camada de cera que representa a camada mais externa protetora da cutícula, já o diclorometano, por ser classificado como um solvente polar aprótico, solvata tanto moléculas apolares como algumas polares (catiônicas), e por isso permitiu realizar a extração de componentes lipídicos mais internos por um processo de extração mais longo em até 10 dias.

A metodologia para extração de cuticulares, exposta no Fluxograma 1, foi a mesma para machos e fêmeas, separadamente. Cada inseto, foi submetido a imersão em 5 ml de hexano por 10 segundos (extrato I), em seguida o mesmo foi imerso em 10 ml de diclorometano por 5 minutos (extrato II), e por último, os insetos foram reunidos em 20 ml de diclorometano por 10 dias (extrato III) (**Figura 12 e Figura 13**). O produto final correspondeu aos extratos I e II, de componentes cuticulares, e o extrato III de lipídeos internos.

Figura 12- Esquema do método de extração dos componentes cuticulares dos insetos macho e fêmea.

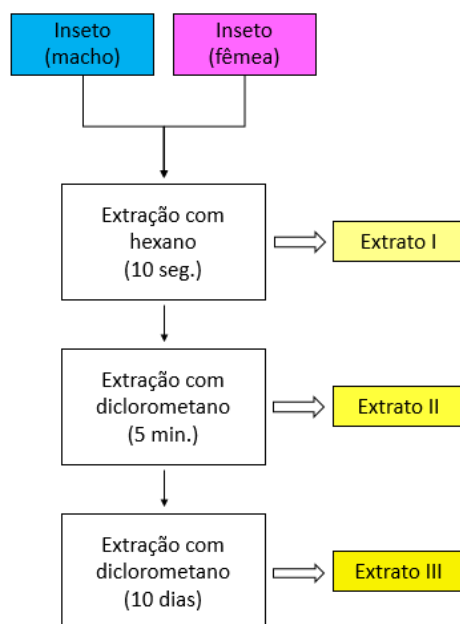
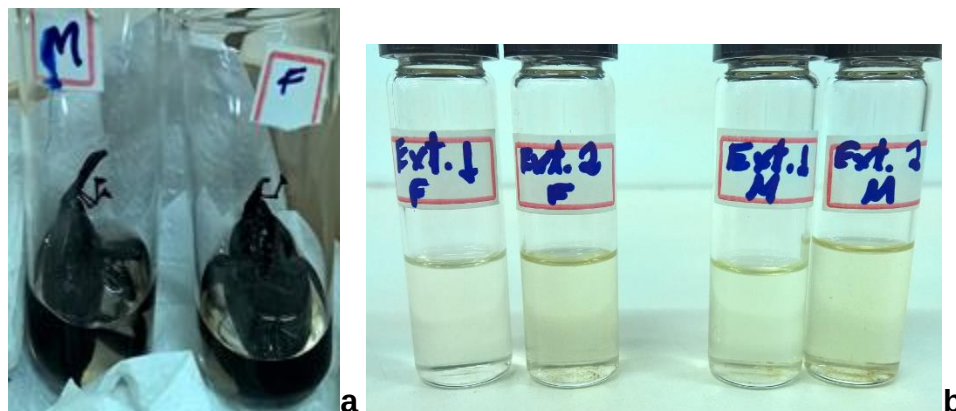


Figura 13- Processo de extração dos compostos cuticulares. **(a)** inseto macho e fêmea imerso em solvente, respectivamente; **(b)** da esquerda para a direita, extrato I e II do inseto fêmea e extrato I e II do inseto macho.



Fonte: autor, 2016.

As extrações foram realizadas em recipientes de vidro e os solventes evaporados por fluxo de nitrogênio para concentrar a amostra. Para a caracterização do perfil químico da cutícula, empregou-se a técnica por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM - QP5050A Shimadzu). Utilizou-se uma quantidade suficiente de 5 insetos de cada sexo, imersos em solventes com alto grau de pureza (grau HPLC – High Performance Liquid Chromatography), realizado em triplicata com três lotes diferentes de insetos. A extração de cuticulares para a realização do teste de atividade antimicrobiana, foram necessários cerca de 120 insetos.

4.3 Preparo das Amostras para a Cromatografia Gasosa

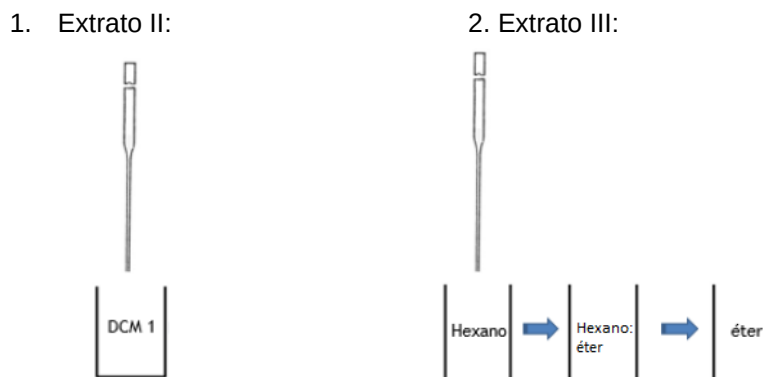
Para que a amostra extraída fosse analisada por cromatografia gasosa, inicialmente, foi necessário um processo de filtração dos extratos I e III. Isso ocorreu em virtude de as amostras serem uma mistura de compostos desconhecidos e visualmente bastante concentrada, rica em lipídeos de cadeia longa com baixa volatilidade. O extrato I (10 segundos), por ser uma amostra visivelmente menos concentrada, e por conter possíveis compostos mais voláteis, não foi necessário filtrar.

A filtração do extrato II, ocorreu em pipeta Pasteur contendo pequena quantidade de sílica (cobrindo aproximadamente 1 cm da pipeta). Primeiro a coluna

foi preparada com 1 ml de diclorometano, em seguida, 0,5 ml o extrato II foi filtrado na coluna, sem diluir (**Figura 14**).

O extrato III, primeiro foi evaporado, e depois 1 mg do material foi resuspenso em hexano, filtrado em sílica, e depois foram feitas duas eluições, uma em 1 ml hexano:éter (1:1), e outra em 1 ml de éter (**Figura 14**).

Figura 14- Ilustração do procedimento de preparo das amostras para a cromatografia gasosa.



Fonte: autor.

4.4 Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização em Chamas (CG/DIC)

Foram realizadas injeções (1µL) das frações dos extratos em CG/DIC (GC-2010 Plus, Shimadzu) equipado com coluna de fase apolar Rtx-1 (Dimetil polisiloxano) de comprimento de 30 m, 0,25 mm de diâmetro. As corridas foram realizadas em modo de injeção split. As condições usadas para a análise foram: temperatura do injetor a 250°C, a temperatura inicial do forno de 50°C fixado por 5 min, com uma rampa de aquecimento de 5°C/min até a temperatura final de 250°C por 10 min.

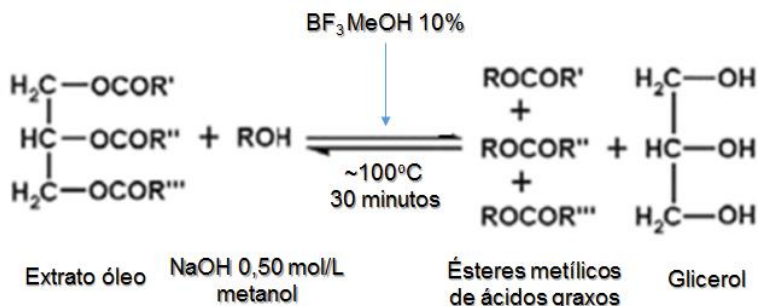
4.5 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)

As amostras dos extratos foram injetadas em equipamento de cromatografia gasosa acoplada a um espectro de massas, modelo QP5050A da Shimadzu, utilizando impacto de elétrons como modo de ionização, e com modo de injeção split equipado com coluna apolar DB-5. A coluna foi condicionada a uma temperatura inicial de 140°C constante por 3 min e com gradiente de aumento de temperatura de 4°C/min até a temperatura final de 300°C por 5min, com temperatura de interface de 200°C.

4.6 Transesterificação dos Extratos Lipídicos

Empregou-se uma reação de transesterificação por Catálise Ácida utilizando Trifluoreto de Boro em Metanol (BF_3 MeOH 10%) (**Figura 15**). Foram pesados aproximadamente 25 mg ($\pm 0,1$ mg) do extrato óleo, adicionados 1,5 mL de solução de NaOH 0,50 mol/L em metanol. A mistura foi aquecida em banho a aproximadamente 100°C por 5 minutos e em seguida resfriada a temperatura ambiente. Foram adicionados 2,0 mL de uma solução de BF_3 em metanol (10%), aquecido novamente a aproximadamente 100°C por 30 min. em seguida resfriou-se o tubo em fluxo de água corrente e foi adicionado 1 mL de hexano. Agitou-se vigorosamente por 30 segundos, em seguida foram adicionados 5,0 mL de solução de solução brine. A amostra esterificada foi levada à geladeira e deixada em repouso para melhor separação das fases. Após a coleta do sobrenadante, foi realizada a separação de fases por mais 2 vezes com hexano. Por fim a amostra foi analisado no CG/FID (JOSEPH; ACKMAN, 1992 apud MILINSK, 2007, p. 26).

Figura 15- Reação de transesterificação de lipídeos.



4.7 Identificação dos Compostos Químicos

Para análise qualitativa do perfil cuticular dos insetos, os espectros de massa dos picos isolados por cromatografia gasosa, foram inicialmente analisados junto as bibliotecas anexadas ao programa do equipamento de espectro de massas (LabSolution – GCMSolution versão 2.7, Shimadzu Corporation). As bibliotecas anexadas foram NIST (National Institute of Standards and Technology) e Wiley, que são consideradas base de dados de referência padrão para identificação de compostos químicos através de uma análise de similaridade da fragmentação entre os espectros de massas observados e relatados na base de dados.

A cromatografia gasosa (CG) e cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massa (CG-EM) são técnicas amplamente empregadas para a identificação de compostos orgânicos. No entanto é difícil utilizar apenas a análise por espectros de massa. Por isso, os parâmetros de índice de retenção (IR) são úteis em combinação com a espectrometria de massa.

O sistema de análise por índice de retenção, foi sugerido por Kovats para caracterizar compostos químicos diferentes em uma escala de tempo específico, por isso é conhecido também como índice de Kovats (KI). De acordo com Kovats, o índice do analito (IR) é a sua retenção relativa entre os *n*-alcanos mais próximos que eluem imediatamente antes e depois do analito alvo. No entanto o IR varia ligeiramente com a temperatura, e de maneira significativa com a fase estacionária da coluna. Para calcular o IR (Kovats) dos compostos cuticulares isolados dos insetos, foi aplicada a equação (**Equação 1**) empregada para um programa com rampa de aquecimento (BABUSHOK, LINSTROM, ZENKEV, 2011).

Equação 1- Equação utilizada para calcular o índice de retenção (IR) em programa com rampa de temperatura.

$$I_x = 100n + 100(t_x - t_n)/(t_{n+1} - t_n),$$

Onde, t_n e t_{n+1} são tempos de retenção de referência de *n*-alcanos eluidos imediatamente antes e depois composto "X", e t_x é o tempo de retenção do composto.

Através do cálculo do índice de retenção (ou índice de Kovats - KI) para cada composto separado em CG-EM, pode-se comparar os valores aproximados de KI já descritos registrados na base de dados Pherobase (online). Nesta base de dados, foi possível determinar o composto pelo valor aproximado do KI, de acordo com a coluna de separação utilizada no processo cromatográfico.

Para confirmar identificações dos ésteres metílicos de ácidos graxos foram conduzidas co injeções com padrões químicos sintéticos analisado por CG/DIC. Foi utilizada uma mistura de padrões de ésteres metílicos de C₄ a C₂₄ (FEME Mix C₄ a C₂₄ 100 mg Supelco Analytical - Sigma-Aldrich). A sobreposição dos picos analisada confirmou a presença dos ésteres metílicos.

4.8 Quantificação relativa por área percentual

A quantificação relativa foi feita com base em um padrão interno. Esse padrão não deve nunca interferir na análise, ou seja, o pico desse padrão deve aparecer em um tempo de retenção distinto dos demais picos da amostra. Com isso, o padrão tridecano foi adicionado a amostra contendo os componentes cuja massa pretende determinar. (LANÇAS, 2004). Para tal, foi preparada uma concentração de 1 mg/ml da amostra e 1 mg/ml do padrão interno (Pi), em seguida foram transferidos 50 µl da amostra junto a 1 µl do padrão interno. Desses 51 µl, 1 µl foi injetado no CG-EM. Sabendo que em 1 µl da solução injetada tem-se 1,96. 10⁻⁵ mg do padrão, foi possível calcular a quantidade em miligramas de cada pico da amostra pela proporção da área do pico do padrão pela área do pico da amostra.

4.9 Atividade Antimicrobiana

4.9.1 Concentração inibitória mínima (CIM)

Para análise da atividade antimicrobiana, foi realizado o teste de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de diluição em placa conforme recomendação do CLSI (Manual Clinical and Laboratory Standards Institute - antigo NCCLS) (2003) e por adaptação da literatura (CHAIBUB, *et al.* 2013). Os microorganismos gram positivos e gram negativos inicialmente utilizados foram: *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 14990); *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); *Escherichia coli* (ATCC 14942); *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 31488); *Salmonella entérica* (ATCC 14028); *Candida albicans* (ATCC 10231); *Candida tropicalis* (ATCC 13083). Todos os inóculos microbianos testados foram mantidos em meio de cultura ágar Muller Hinton em laboratório e em condições apropriadas para conservação. O teste foi realizado com os três extratos brutos cuticulares e objetivou avaliar a concentração mínima do extrato em meio de cultura capaz de inibir totalmente o crescimento do microorganismo testado.

Para a preparação do meio contendo o extrato, foi estritamente necessária a associação de um agente emulsificante (cremofor – Tween 80), pelo fato da amostra ser bastante oleosa e necessitar de um agente capaz de torna-la miscível em meio

aquoso. Por tanto o processo ocorreu ao associar Tween 80 (2%) em cada concentração de extrato testado, e incorporado ao ágar Mueller Hinton (MH) aquecido.

Os inóculos microbianos foram preparados na concentração do tubo nº 0,5 da escala de MacFarland (15×10^8 UFC/mL), e posteriormente diluídos 1:10 (v/v) em solução salina estéril a 0,9% (m/v), obtendo-se 10^7 UFC/mL, e desta um volume de 5 μ L (10^4 UFC/mL) foi pipetado na placa de petri semeado com a ajuda de uma alça de platina. O meio semeado foi incubado a temperatura de 37°C por 24 horas (bactérias) e 48 horas (fungos). A CIM foi considerada a menor concentração do extrato que inibiu o crescimento microbiológico. Para o controle negativo foi considerado a associação de Tween 80 (2%) ao ágar Mueller Hinton (MH) aquecido.

4.10 Extração de Quitina Cuticular

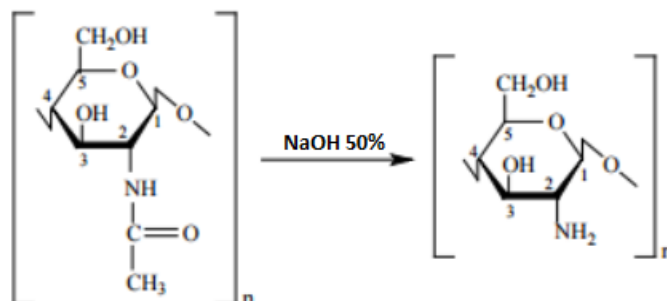
A extração da quitina do exoesqueleto do inseto de *Rhynchophorus palmarum* ocorreu em 3 passos: pré tratamento; desmineralização e desproteínização. No pré tratamento os insetos foram lavados com água destilada e congelados. O descongelamento foi feito a temperatura ambiente, e dissecados, removendo todo o conteúdo interno permanecendo apenas a cutícula. A cutícula foi mantida em estufa a 50°C durante 2 dias. Depois de secos, foi triturada em moinho de facas até pó. Na desmineralização, foi coletado 5 g do pó em 250 mL de solução de HCl 1 mol L^{-1} a 100°C por 30 min. sob agitação constante. Em seguida, o material foi submetido à filtração a vácuo e lavagem do sobrenadante com água destilada até atingir a neutralização. O sólido obtido (material desmineralizado) foi mantido em estufa por 12 h a temperatura de 50°C. E por fim, a desproteínização foi realizada utilizando um tratamento alcalino com solução de NaOH 1 mol L^{-1} (250 mL) a 80 ° C durante 24 h, e o produto foi lavado com água destilada até neutralidade (LIU, et al. 2012).

O material filtrado de quitina ainda sofreu um processo de descoloração mantido em solução de clorofórmio, metanol e água (numa proporção de 1: 2: 4) durante 1 h. Após a descoloração, o material foi filtrado e lavado com água destilada pela última vez, e seco em estufa de secagem a 60 ° C (KAYA, et al. 2014a).

4.11 Desacetilação de quitina (quitosana)

A quitina foi desacetilada para obtenção do derivado quitosana por tratamento com solução concentrada de NaOH (50% m/v) na proporção 1:20, a 100 °C durante 3 h (**Figura 16**). Em seguida o derivado quitosana foi lavado com água deionizada até atingir neutralidade (KAYA, *et al.* 2014a).

Figura 16- Mecanismo geral de produção de quitosana a partir de quitina.



Fonte: autor, 2016.

O material resultante foi seco em estufa a 40°C durante 24 h. A **Figura 17** mostra as amostras de quitina extraída da cutícula do inseto *Rhynchophorus palmarum* e a quitosana obtida da quitina.

Figura 17- Material resultante da extração e desacetilação de quitina. Da direita pra esquerda, quitosana e quitina devidamente identificadas e armazenadas em tubo do tipo ependorff.



Fonte: autor, 2016.

4.12 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier

Os espectros de infravermelho de quitina extraída dos insetos adultos de *Rhynchophorus palmarum* e quitosana, foram realizados em espectrômetro Thermo Scientific modelo Nicolet iS10. A análise foi realizada no intervalo de frequência

entre 4000 - 400 cm^{-1} . Para análise da quitina foi feito pellets com KBr (brometo de potássio) (smart omni-sampler infrared Fourier transform spectroscopy - SOSIFTS), enquanto a análise de quitosana foi em RTA (Reflexão Total Atenuada) (smart omni-transmission infrared Fourier transform spectroscopy - SOTIFTS).

4.13 Difração Raio-X (DRX)

Os espectros de difração de raio-X das amostras de quitina e quitosana foram medidos em equipamento DRX-7000 da Shimadzu, série Q305452, a 40 kV, 30 mA e 2θ de ângulo de leitura a partir de 5° a 45° , com uma velocidade de varredura de $1^\circ/\text{minuto}$ e passo de $0,02^\circ$. O perfil de DRX foi utilizado para identificação do material através do perfil de estrutura cristalina por comparação com o padrão comercial de quitina da casca de camarão e quitosana (Sigma aldrich) e com os dados publicados em literatura.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Extração de compostos químicos da cutícula

A extração de compostos químicos da cutícula dos insetos adultos de *Rhynchophorus palmarum* foi realizada com os solventes apolares, hexano e diclorometano, para obtenção final de três extratos brutos acompanhando a ordem de extração de componentes mais externos para os mais internos. A **Tabela 1**, lista o número de insetos adultos utilizados para a extração, assim como a sua respectiva massa em gramas, o rendimento de lipídeos por extrato e o teor de lipídeos por grama do corpo do inseto.

Tabela 1- Resumo quantitativo da extração: número e massa de inseto; massa de extrato. Extração por imersão do inseto em hexano por 10 segundos (I); extração por imersão do inseto em diclorometano por 5 minutos (II); extração por imersão do inseto em diclorometano por 10 dias (III)

<i>Estágio</i>	<i>Número de insetos</i>	<i>Massa dos insetos (g)</i>	<i>Extratos</i>	<i>Massa dos lipídeos (g)</i>	<i>Teor de lipídeos (mg/g corpo do inseto)</i>
Adultos	120	152,24	I	0,36	2,34
			II	0,49	3,28
			III	1,93	12,65

Fonte: autor, 2016.

Inicialmente, as extrações foram realizadas para análises qualitativas através do processo de separação por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (CG DIC), e em seguida, análise foi complementada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) para a identificação da composição química. Para isso as extrações foram executadas com apenas cinco insetos adultos e em solventes com alto grau de pureza (HPLC), sendo esta quantidade de insetos suficiente para efetuar este tipo de análise.

No entanto, para obtenção de uma quantidade de massa de extrato bruto suficiente para análise em testes de atividade antimicrobiana, foram necessários 120 insetos adultos íntegros sem distinção de sexo. Com isso, foram obtidos 356 mg na extração I, 49 mg na extração II e 1,9 g na extração III. O total quantitativo de lipídeos cuticulares e internos do inseto adulto foi 855 mg e 1,9 g, o qual corresponde 0,56 e 1,25% da massa total de insetos (**Tabela 1**). Considerando que o extrato III apresentou um valor de massa bastante superior as duas primeiras, isso pelo fato de ser um processo extrativo mais intenso, com o intuito de extrair lipídeos internos, diferente da extração I e II (10 seg. e 5 min., respectivamente), e com isso, apresentou aspecto de cor amarelo mais intenso (concentrado) e volume do extrato seco mais abundante com relação as outras extrações.

Na literatura (GOLEBIOWSKI, *et al.* 2012a; GOLEBIOWSKI, *et al.* 2012b; GOLEBIOWSKI, 2012c; GOLEBIOWSKI, *et al.* 2013a; GOLEBIOWSKI, *et al.* 2008b), verificou-se que metodologia empregada neste estudo é bastante descrita com ênfase para extração de lipídeos, caracterizando os extratos I e II com a presença de lipídeos cuticulares e o extrato III com lipídeos internos. Lipídios de cutícula podem conter ésteres de cera e, adicionalmente, aldeídos, hidrocarbonetos e álcool de cadeia longa (GOLEBIOWSKI, *et al.* 2011).

Posteriormente, a extração dos insetos adultos foi realizada por distinção entre em macho e fêmea, separadamente, para investigar possíveis diferenciações no perfil cuticular.

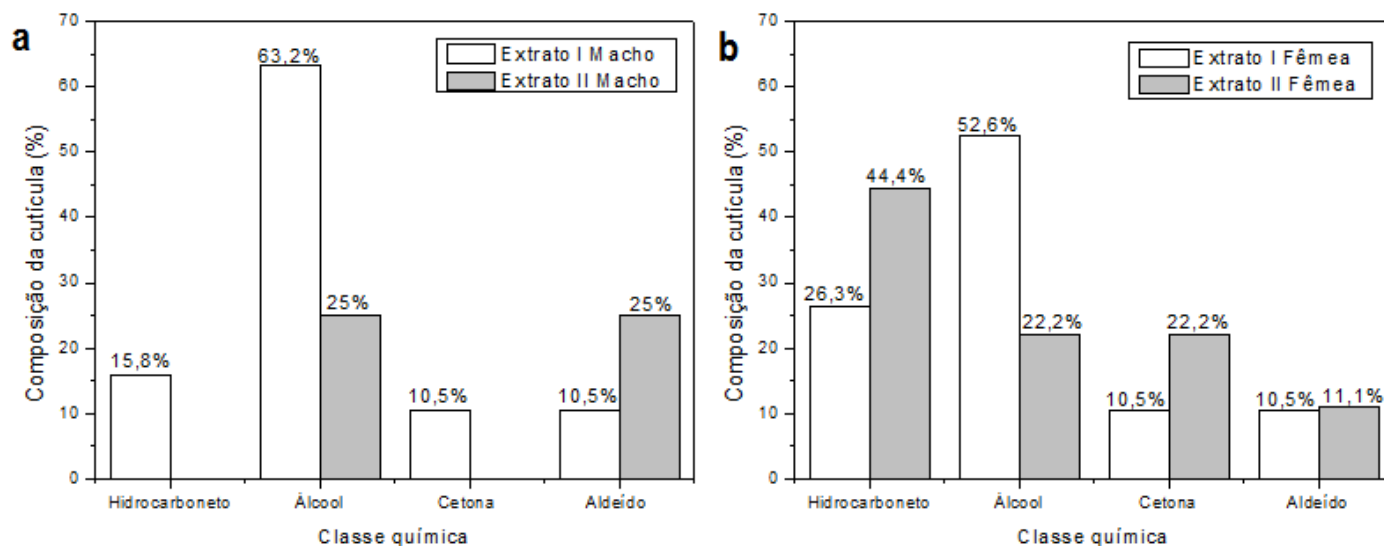
5.2 Identificação de Compostos Cuticulares por CG-EM

Os produtos das extrações I (10 seg. em hexano), II (5 min. em diclorometano) e III (10 dias em diclorometano) de insetos macho e fêmea, foram submetidos inicialmente a CG DIC para observação inicial dos possíveis grupos funcionais que seriam encontrados, para estabelecer uma concentração mínima suficiente para caracterização do perfil cuticular e possível identificação dos componentes, e para adequação das condições de corrida aplicada no equipamento para melhor separação e identificação dos picos cromatográficos. Após análise, adequação do método, e da concentração das amostras, foi realizada análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) para estabelecer parâmetros qualitativos do perfil cuticular em relação aos sexos.

De modo geral, as ceras cuticulares identificadas em insetos adultos de *R. palmarum* são constituídas por misturas complexas de compostos não polares de cadeia longa. O perfil cuticular pode ser analisado conforme a distribuição das classes químicas durante o processo de extração dos componentes da cutícula e diferenciando os sexos (**Figura 18**). De acordo com a identificação realizada por espectrometria de massa, os principais componentes da cutícula são os álcoois seguidos dos hidrocarbonetos, aldeídos e cetonas. No entanto o perfil de componentes na cutícula da fêmea apresentou maior complexidade que no macho.

Entre os componentes cuticulares identificados no inseto macho (**Figura 18a**), a porcentagem de álcool (63,2%) foi maior que a porcentagem de hidrocarbonetos no extrato I. No extrato II, não foi possível avaliar a presença de hidrocarbonetos, assim como os compostos cetona, provavelmente pelo fato de corresponderem uma pequena quantidade na cutícula do inseto macho, e por isso, suficientes para serem extraídos em hexano por 10 segundos (extrato I). No entanto, foram identificados álcool e aldeído na mesma proporção (25%). O perfil cuticular no inseto fêmea (**Figura 18b**), apresentou uma quantidade maior de hidrocarbonetos em relação ao macho com 44,4% no extrato II, porém a cutícula no inseto fêmea compreende uma quantidade maior de álcoois (52,6%) seguido de hidrocarbonetos, cetonas e aldeídos.

Figura 18- Identificação e quantificação das classes químicas dos componentes cuticulares I e II encontrados nos insetos adultos (a) fêmea e (b) macho de *Rhynchophorus palmarum*.

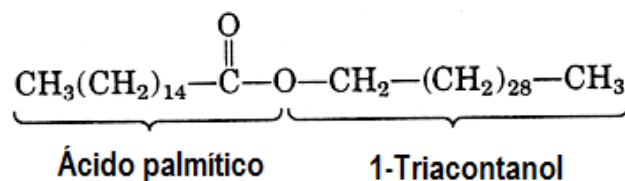


Fonte: autor, 2016.

Estrutura cuticular da fêmea identificada no extrato I e II revelou uma composição mais complexa por compor maior quantidade e variedade de compostos químicos exclusiva nesta, em relação ao que foi identificado na cutícula do inseto macho. Esses dados condizem ao que se sabe sobre a principal função dos lipídios no metabolismo dos insetos, o qual se faz extremamente importante para metamorfose, ovogênese e vôo, entretanto, apenas a fêmea exerce o papel na ovogênese, já que consiste nela o papel de ovoposição, e com isso, exigir um melhor arcabouço protetor.

A camada mais externa da cutícula conhecida como envelope, consiste em uma camada de cera, que são ésteres de ácidos graxos saturados e insaturados de cadeia longa (C_{14} a C_{36}) com álcoois de cadeia longa (C_{16} a C_{30}) que proporciona ao inseto um importante papel na impermeabilização e consistência firme da cutícula (**Figura 19**) (NELSON; COX, 2014, p. 362).

Figura 19- Estrutura química da cera Triacontanoilpalmitato formado por um éster de ácido palmítico com o álcool triacontanol.



Fonte: NELSON; COX, 2014, p. 362.

A superfície externa da epicutícula é coberta por uma camada rica em lipídeos, geralmente composta de hidrocarbonetos, juntamente com quantidades variáveis de álcoois, e revelada uma grande quantidade de álcoois de alto peso molecular (GOLEBIEWSKI, *et al.* 2012b). Componentes álcoois primários de alto peso molecular de C₁₇ a C₂₂ alifáticos saturados e aldeídos de C₁₉ a C₂₂ foram identificados na cutícula de abelhas adultas (DONZÉ, *et al.* 1998). Em insetos sugadores de sangue como o *Triatoma infestans* (barbeiro), foram identificados hidrocarbonetos saturados, principalmente de cadeia linear de C₂₁ a C₃₃, juntamente com álcoois de cadeia linear de 20 a 30 carbonos sendo dois álcoois específicos no sexo feminino, docosanol (C₂₂) e eicosanol (C₂₀). Álcoois de cadeia longa também foram relatadas nas secreções do *Cochonilhas Bemisia tabaci* e *Trialeurodes vaporariorum* (GOLEBIEWSKI, *et al.*, 2012b). Em *Musca domestica* os lipídeos cuticulares de machos e fêmeas continha álcoois saturados de C₁₂ a C₂₈. E além destes insetos, outras espécies foram registradas com um perfil cuticular que apresenta uma variação de álcoois de 8 a 34 átomos de carbono (GOLEBIEWSKI, *et al.* 2012b). No presente estudo, os lipídeos cuticulares em *R. palmarum* apresentam álcoois primários de cadeia longa saturados, C₁₈ e C₂₈, e insaturados, C_{18:2} e C_{18:1}. Foram identificados também aldeído com 14 carbonos e cetona C₁₉ e C₁₅ metil-ramificado.

Em geral, os hidrocarbonetos são os principais constituintes da epicutícula dos insetos e ocorrem frequentemente como misturas complexas de cadeia linear e componentes metil-ramificado, com cadeias de alquila saturadas e insaturados (CALDERÓN-FERNÁNDEZ; JUÁREZ, 2013). A composição de hidrocarbonetos cuticulares é complexa e desempenham um papel na impermeabilização da cutícula

inseto e comunicação química, onde são necessárias substâncias químicas relativamente não-voláteis (BLOMQUIST; BAGNÈRES, 2010). O perfil de hidrocarbonetos encontrados na cutícula do inseto *R. palmarum* foi avaliado com a presença de alcanos (C_{25} ; C_{27} ; C_{43}), trimetil-alcano (C_{40}) identificado no extrato II do inseto fêmea, hidrocarboneto insaturado ($C_{20:5}$) no extrato I fêmea e macho, e alceno metil-ramificado $C_{24:6}$ apenas no extrato II da fêmea. Existe uma variedade grande de hidrocarbonetos identificados em cutícula de insetos descrito em literatura, porém existe rara presença de alceno metil ramificado (CALDERÓN-FERNÁNDEZ, JUAREZ, 2013; ZHANG, *et al.* 2014; VANÍCKOVÁ, *et al.* 2014; NELSON, *et al.* 2003).

Nelson e colaboradores (2003) identificam que alcanos metil-ramificados constituem 20% dos lipídeos externos em *Semidalis flint* (Neuroptera: Coniopterygidae), incluindo mono-, di-, tri- e tetrametil-ramificado. E entre os metil-alcanos, existe uma série de heptacosanos que variam em quantidade no macho (66,5%) e na fêmea (58,2%).

No entanto, a composição de lipídios cuticulares varia em todos os níveis de organização em insetos, dentre as espécies e dentro dos indivíduos, assim como pode depender do estágio de desenvolvimento (GOŁEBIOWSK, *et al.* 2014; CHAO, *et al.* 2010). O perfil cuticular de outros insetos, incluindo os insetos da ordem coleóptera, tem sido descrito em vários tipos de estudo (GOŁEBIOWSKI, *et al.* 2011) como forma de investigação biológica e aperfeiçoamento de técnicas de separação e identificação de compostos, assim como também, visando estabelecer o primeiro passo para o desenvolvimento de métodos de controle de insetos praga, como é o caso da broca do olho do coqueiro (*R. palmarum*).

5.3 Transesterificação dos Extratos Cuticulares e Internos para Identificação de Metil Ácidos Graxos por CG-EM

A presença de triacilgliceróis (TAGs) e outros derivados de ácidos gordos não voláteis ocorrem em grandes quantidades em tecidos internos de insetos, especialmente nos adipócitos do corpo gorduroso, porém podem estar contidos em menor quantidade na cutícula. No entanto TAGs e derivados de ácidos graxos não

voláteis não são detectáveis por técnicas de cromatografia gasosa padrão (CG), por isso, se faz uso de transesterificação em ésteres metílicos dos ácidos graxos mais voláteis que permite simular a presença de derivados ácidos graxos não voláteis por análise em CG-EM (KÜHBANDNER; RUTHER, 2015).

Por essa razão, o extrato III de lipídeos internos não forneceu picos relevantes na separação por cromatografia gasosa, suficientes para análise da fragmentação molecular pelo espectro de massas. Apenas após a transesterificação do extrato, em éster metílico do ácido graxo, foi possível identificar o perfil lipídico do inseto adulto. Sendo o mesmo processo realizado nos extratos cuticulares de 5 min. (II).

A transesterificação realizada com BF_3 -metanol (10%) forneceu derivados mais voláteis que resultou em uma resolução eficiente dos lipídeos de interesse. Com isso, foi revelada a presença de ésteres metílicos de ácidos graxos tanto no extrato cuticular (extrato II), quanto no extrato cuticular de lipídeos internos (extrato III). A probabilidade de identificar ácidos graxos no extrato cuticular I (10 segundos em hexano) é bastante reduzida, pois o tempo de extração não seria suficiente para eluir acilgliceróis, o que torna característica a presença predominante de hidrocarbonetos, álcoois e cetonas identificado no extrato cuticular I compondo a primeira barreira de defesa, referente a camada de cera na cutícula do inseto. Por esta razão, a reação de transesterificação ocorreu apenas para os extratos II e III.

Após a transesterificação, os ésteres metílicos foram analisados por CG-EM (**Tabela 2**). A identificação ocorreu através da similaridade dos espectros de massas de acordo com as bibliotecas NIST e Wiley, o tempo de retenção e o índice de Kouvats (KI) calculado e comparado com a base de dados Pherobase. Nesta análise permitiu avaliar um possível perfil de ésteres de ácidos graxos com 17 e 19 carbonos na cutícula externa da fêmea e do macho, e na interna uma variação de C15 a C19 tanto no macho quanto na fêmea, e quase nenhuma diferença na composição entre os sexos.

Tabela 2- Ésteres metílicos de ácidos graxos identificados após transesterificação de extratos da cutícula externa e interna diferenciando inseto macho e fêmea por análise em CG-MS.

CUTÍCULA EXTERNA					
FÊMEA			MACHO		
*TR (min.)	Fórmula	Similaridade (%)	*TR (min.)	Fórmula	Similaridade (%)
19100	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	91	19100	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	97
23220	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	86	23225	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	95
23820	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	88	23280	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	94
29300	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	81	29300	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	83
31460	C ₁₉ H ₃₈ O ₃	89	-	-	-
CUTÍCULA INTERNA					
FÊMEA			MACHO		
*TR (min.)	Fórmula	Similaridade (%)	*TR (min.)	Fórmula	Similaridade (%)
14100	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	95	14095	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	95
19130	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	97	19110	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	98
23255	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	97	23060	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	93
23075	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	88	23230	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	96
23825	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	96	23815	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	97

*Tempo de retenção do composto na coluna medido em minutos.

Fonte: autor, 2016.

Os compostos analisados por CG-EM foram então confirmados por análise da separação dos compostos dos extratos cuticulares em comparação com os padrões por CG, onde a sobreposição dos picos permitiu identificar de fato a presença dos ésteres metílicos de ácidos graxos constituinte nos insetos (**Tabela 3**).

Tabela 3- Ésteres metílicos de ácidos graxos identificados após transesterificação de extratos da cutícula externa e interna diferenciando inseto macho e fêmea por análise em CG com padrão interno.

Compostos Cutícula (*FM)		Compostos Internos (*FM)	
Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
C _{16:1}	C _{16:1}	C _{14:1}	C _{14:1}
C _{18:1n9c}	C _{18:1n9c}	C _{16:0}	C _{16:0}
C _{18:2n6c}	C _{18:2n6c}	C _{16:1}	C _{16:1}
C _{21:0}	C _{22:0}	C _{18:1n9c}	C _{18:1n9t}
C _{20:2}	C _{23:0}	C _{18:2n6c}	C _{18:1n9c}
C _{23:0}	-	C _{20:2}	C _{18:2n6c}
-	-	-	C _{20:2}

*Fórmula molecular do ésteres metílicos de ácidos graxos identificados.

Fonte: autor, 2016.

O perfil lipídico do inseto *R. palmarum* foi caracterizado pela presença total de 10 ésteres metílicos de ácidos graxos que variou de C₁₄ a C₂₃, considerando que existem 7 compostos presentes no extrato de lipídeos externo e 7 no extrato interno. Foi observada semelhança entre os metil ésteres de ácidos graxos identificados nos lipídeos cuticulares e internos, como o palmitato de metila (C_{16:0}), oleato de metila (C_{18:1}), linoleato de metila (C_{18:2}) e cis-11,14- eicosadienoato de metila (C_{20:2}), porém, beenoato de metila (C_{22:0}), heneicosanoato de metila (C_{21:0}) e tricosanoato de metila (C_{23:0}), foram característicos no extrato cuticular e miristoleado de metila (C_{14:1}), palmitato de metila (C_{16:0}) e elaidato de metila (C_{18:1n9t}) no extrato interno. O perfil lipídico da fêmea diferencia do macho pela presença do beenoato de metila (C_{22:0}) no extrato cuticular e elaidato de metila (C_{18:1n9t}) no interno, e apenas o macho constitui heneicosanoato de metila (C_{21:0}) e cis-11,14- eicosadienoato de metila (C_{20:2}) na cutícula.

Gilbert e Chino (1974) já relatava a presença de ésteres metílicos dos ácidos graxos em insetos, com quantidades relativamente alta de palmitato, estearato e oleato. Dados obtidos acerca do perfil lipídico neste inseto corroboram os estudos realizados em espécies e ordens diferentes de inseto como em *Calliphora vomitória*

(Diptera), onde os lipídeos internos identificados variaram de C_{8:0} a C_{24:0} para os insetos adultos macho e fêmea com quantidade relevante de C_{16:0}, C_{16:1} e C_{20:0} (GOLEBIEWSKI, *et al.* 2013a). Em *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Bruchidae) foram identificados teores relativos de ésteres de ácidos graxos, também presente em conteúdo de lipídeos cuticulares deste inseto contendo derivados de C_{16:0} e C_{18:0} (GOLEBIEWSKI, *et al.* 2008a). Em estudo com *Drosophila subquinaria* and *D. recens*, a derivatização dos extratos revelou a presença de ácidos graxos em comum com ambos os sexos e espécies, e em semelhança com o inseto *R. palmarum*. Foram identificados ácido mirístico (C₁₄), ácido palmítico (C₁₆), ácido palmitoleico (C_{16:1}), ácido oleico (C_{18:1}), e ácido esteárico (C₁₈) (CURTIS, *et al.* 2013).

Em estudo apresentado por Kühbandner e Ruther (2015), os ésteres metílicos de ácidos graxos identificados permite simular a presença de derivados de ácidos graxos não voláteis. Eles confirmaram a composição lipídica na cutícula em seis espécies de insetos a partir de quatro ordens diferentes com composição cuticular bastante semelhante ao *R. palmarum* com excessão para heneicosanoato de metila (C_{21:0}) e tricosanoato de metila (C_{23:0}) característicos do extrato cuticular desta espécie no inseto macho.

Numa análise quantitativa inicial desses compostos identificados, avaliou-se que os ésteres metílicos de ácidos graxos que se repetem (C₁₆, C₁₈ e C₂₀), apresentam maior quantidade na fração de lipídeos internos do que na a fração cuticular.

5.4 Atividade Antimicrobiana

5.4.1 Lipídeos Cuticulares

O teste foi realizado com os dois principais grupos de bactérias, as gram positivas, *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 14990); *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), e as gram negativas, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); *Escherichia coli* (ATCC 14942); *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 31488); *Salmonella entérica* (ATCC 14028). O mesmo teste foi aplicado em duas espécies de fungo não

filamentosos do mesmo gênero, *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Candida tropicalis* (ATCC 13083).

O resultado da concentração mínima inibitória (CIM) dos extratos frente as bactérias testadas (**Tabela 4**) foi elucidado apenas para *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Os extratos cuticulares I e II, apresentaram a mesma CIM para as bactérias, com exceção da *E. coli*, que não foi inibida pelo extrato II, e *Klebsiella pneumoniae*, que não foi inibida pelo extrato I. Já o extrato III, desenvolveu um resultado mais eficaz, com uma CIM de 10µg/mL para *S. epidermidis* e 12,5 µg/mL para *Klebsiella pneumoniae*, entretanto, não houve resposta contra *E. coli*. E em relação a todas as bactérias testadas, dentre as quatro gram negativas, duas foram inibidas, e entre as duas gram positivas, uma foi inibida.

Tabela 4-Determinação da concentração mínima inibitória (CIM) dos extratos brutos (I, II e III) em bactérias.

Inóculo microbiano	Concentração Inibitória Mínima- CIM (µg/mL)		
	Extrato I	Extrato II	Extrato III
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	20	20	10
<i>Escherichia coli</i>	20	>20	>20
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>20	20	12,5
<i>Enterococcus faecalis</i>	>20	>20	>20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>20	>20	>20
<i>Salmonella entérica</i>	>20	>20	>20

Fonte: autor, 2016.

A resposta dos extratos frente a *Candida albicans* e *Candida tropicalis* foi positivo apenas na presença do extrato III, pelo qual foi identificada uma CIM de 10µg/mL. Os extratos cuticulares I e II, não conseguiram inibir de maneira eficaz tais fungos testados (**Tabela 5**).

Tabela 5- Determinação da concentração mínima inibitória (CIM) dos extratos brutos (I, II e III) em fungos.

Inóculo microbiano	Concentração Inibitória Mínima- CIM (µg/mL)		
	Extrato I	Extrato II	Extrato III
<i>Candida albicans</i>	>20	>20	10
<i>Candida tropicalis</i>	>20	>20	10

Fonte: autor, 2016.

De acordo com o que preconiza o CLSI (2012) uma substância é considerada susceptível até 4µg/mL e resistente a partir de 32µg/mL, o que caracteriza a cutícula do inseto *R. palmarum* com uma atividade intermediária entre 12,5 e 20µg/mL contra os microorganismos testados.

Apesar dos extratos cuticulares (I e II), não apresentarem atividade contra *Candida* sp., sabe-se que extratos da cutícula de insetos apresentam ação antibacteriana e antifúngica, como por exemplo os ácidos graxos cuticulares identificados em Lepidopteros capaz de inibir a germinação de conídios e o crescimento de hifas em fungos (SALTO, 1982). Assim como, compostos lipídicos cuticulares e internos de quatro espécies de dípteros apresentaram atividade bactericida e antifúngica contra 18 cepas de referência de bactérias e fungos (GOLEBIOWSKI, *et al.* 2013a). Em estudo semelhante, testes de atividade antimicrobiana de álcoois isolados da *Musca domestica* demonstrou atividade contra bactérias Gram positivas e fraca atividade contra *Candida* sp., enquanto cepas bacterianas Gram negativas foram resistentes. O álcool 1-tetradecanol (C_{14:0}) foi muito eficaz contra bactérias gram positivas (*B. subtilis*, *R. lipolytica* e *A. niger*, e uma menor atividade contra bactérias Gram-negativas (*E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. vulgaris*), sendo a atividade semelhante em todos os álcoois restantes (GOLEBIOWSKI, *et al.* 2012b). A partir dessas evidências é admissível supor que exista atividade antimicrobiana nos extratos da cutícula do *R. palmarum* contra outras cepas microbianas além dessas testadas.

O perfil lipídico identificado no *R. palmarum* foi semelhante ao perfil de ácidos graxos apresentado por Bogus e colaboradores (2010) identificados na cutícula de três espécies de insetos (*Dendrolimus Pini*; *Calliphora vicina*; *Galleria mellonella*) que representam diferentes susceptibilidades a infecção por *Conidiobolus*

coronatus (fungo entomopatogênico). Os ácidos graxos de cadeia longa (C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, C20:0 e C20:1), inibiram o crescimento fúngico, e a esporulação, além de altas concentrações de outros ácidos graxos de cadeia menor (C7:0, C8:0, C9:0, C10:0, C12:0, C18:2 e C18:3) inibirem a germinação de esporos e crescimento de hifas retardado por C5:0, C6:0, C6:2, C14:0, C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C20:0 e C20:1.

Staphylococcus aureus e *Staphylococcus epidermidis* constituem os dois principais patógenos oportunista deste gênero. *S. epidermidis*, é bastante difundido em todo o ecossistema cutâneo, enquanto que *S. aureus* ocorre principalmente em superfícies mucosas. É comum uma resposta natural protetora para esses tipos de microorganismos, e em especial os ácidos graxos, como o ácido linolênico (C18:2) identificado que permitem a manutenção da integridade da barreira de permeabilidade da epicutícula e a proteção contra agentes químicos e enzimáticos (FERREIRA, *et al.* 2012). A atividade antimicrobiana existe tanto em componentes internos quanto em externos, seja por resposta imediata ao ataque de microrganismos ou não.

Este trabalho confirma a determinação de gorduras encontradas em lipídios cuticulares que pode efetivamente contribuir para o conhecimento sobre os mecanismos de defesa do inseto.

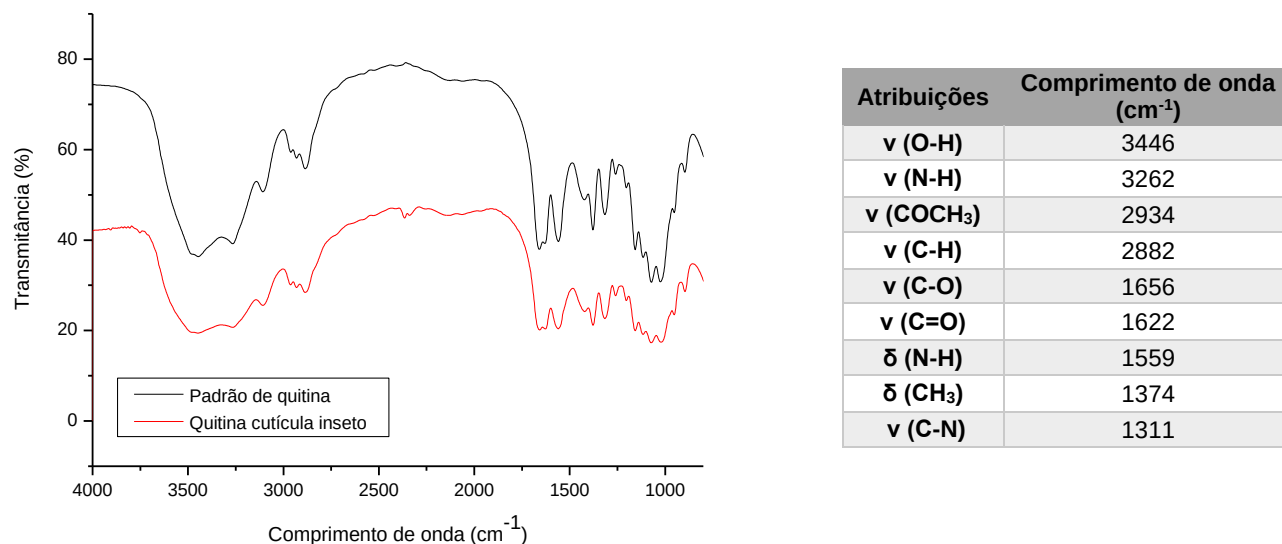
5.5 Caracterização de Quitina e Quitosana

5.5.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier

O espectro de absorção no Infravermelho da quitina cuticular de insetos de *Rhynchophorus palmarum*, mostrado na **Figura 20**, apresenta bandas de absorção características de quitina. Segundo Liu e colaboradores (2012), os espectros de quitina são caracterizados por três bandas amida significativas: 1654, 1560 e 1310 cm^{-1} , que correspondem ao estiramento de C = O (amida I), o de N-H (amida I) e C-N (amida III), respectivamente. Sendo que as bandas em 1654 e 1627 cm^{-1} é representativo de estiramento C=O e de deformação N-H de amida I atribuídas à os dois tipos de ligações de H formadas por grupos amida no alinhamento antiparalelo

presente na região cristalina de α -quitina. As atribuições relevantes que caracterizam as ligações da estrutura da α -quitina isolada da cutícula do inseto estão detalhadas na **Figura 20**.

Figura 20– Espectroscopia no infravermelho de quitina isolada da cutícula do inseto *Rhynchophorus palmarum* (gráfico) e atribuições de bandas relevantes (tabela).



Fonte: autor, 2016

Para diferenciar as estruturas polimórficas de β e α -quitina através dos espectros no infravermelho, deve-se examinar a região onde ocorrem as bandas de deformação axial de C=O. No espectro de α -quitina, observa-se uma banda em 1652 cm⁻¹ e um pequeno ombro em 1619 cm⁻¹. A banda é atribuída apenas aos grupos C=O envolvidos em ligações hidrogênio intermoleculares com grupos NH, enquanto o ombro abrange também a contribuição das ligações hidrogênio intramoleculares C=O·····HOCH. De fato, o desdobramento da banda de amida I é observado no espectro da α -quitina, o que não ocorre no caso da β -quitina (CAMPANA-FILHO, *et al.* 2007). No espectro de infravermelho da quitina, foram observadas a presença das bandas características de α -quitina em 1656 e 1622 e 1559 cm⁻¹, respectivamente. Assim confirma-se a estrutura da quitina característica da cutícula de insetos presente também nesta espécie de inseto em estudo.

Existem muitos estudos referentes a extração e caracterização de quitina, porém muitas vezes em crustáceos como o caranguejo, camarão e lagostim, por

onde é extraída e bem caracterizada a forma α -quitina (ZHANG, *et al.* 2000). Em insetos, a α -quitina tem sido relatada em algumas espécies, incluindo a sua caracterização por espectroscopia no infravermelho, citadas na **Tabela 6**.

Tabela 6- Principais atribuições de bandas de quitina identificadas por espectroscopia no infravermelho em espécies de insetos.

Origem	ν (O-H)	ν (C=O)	ν (N-H) amida II	ν (C=O de grupo N- acetil)	δ (N-H de grupo N- acetil) amida I	Referências
<i>Rhynchophorus palmarum</i>	3446	1656	3262	1622	1559	Estudo atual.
<i>Holotrichia parallela</i>	3424	1654	3262	1624	1560	LIU, <i>et al.</i> 2012
<i>Bombyx mori</i> (pupa)	3434	1656	3262	1626	1557	PAULINO, <i>et al.</i> 2006.
<i>Bombyx mori</i> (larva e pupa)	3447	1656	-	1625	1556	ZHANG, <i>et al.</i> 2000
Cigarra	3500	1650	3250	1617	-	SAJOMSANG; GONIL, 2010

Fonte: autor, 2016.

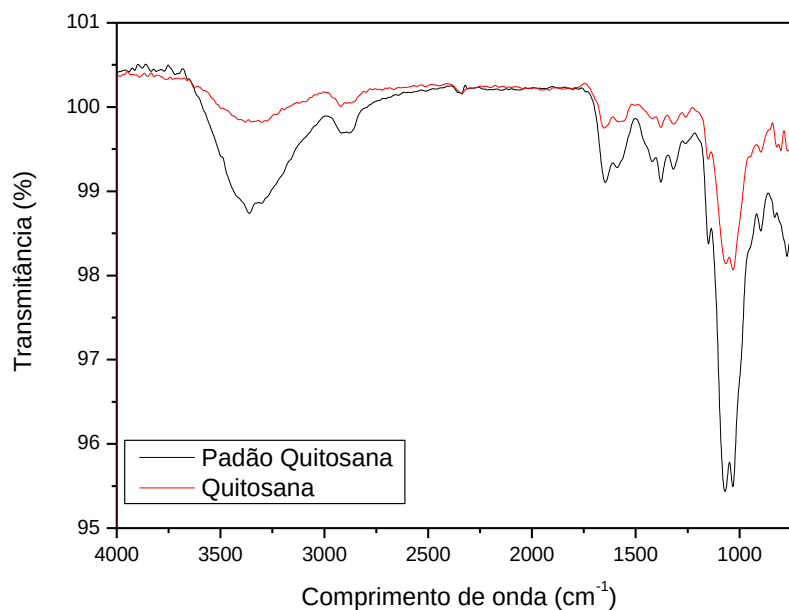
A banda em 1622 cm^{-1} (ν C=O) indica a quitina no estado cristalino e a outra em 1656 cm^{-1} (ν C=O) aparece, provavelmente, indicando um estado amorfo. Porém ambas são atribuídas às vibrações da banda de amida I, sendo a banda em 1656 cm^{-1} corresponde à amida I do alongamento de C=O, e a banda em 1622 cm^{-1} atribuída ao alongamento de C-N (grupo n-acetil) da vibração do grupo sobreposto C=O, vinculado ao grupo OH por ligação H, da ocorrência de ligação de hidrogênio intramolecular (CO-H-OCH₂) caracterizando arranjos antiparalelos de α -quitina (PAULINO, *et al.* 2006; SAJOMSANG, GONIL, 2010).

A banda observada em 3446 cm^{-1} corresponde à vibração de estiramento dos grupos hidroxila. A presença desse pico com certa intensidade, permitiu observar duas bandas em 1622 e 1656 cm^{-1} . A banda a 1311 cm^{-1} corresponde ao estiramento C-N e a uma deformação CO-NH e o grupo CH₂ (amida III), devido à formação de um grupo CO-NH. A banda em 1374 cm^{-1} corresponde a uma deformação simétrica do grupo CH₃, e em 1559 cm^{-1} corresponde a deformação N-H de amida I.

A técnica de espectroscopia no infravermelho é útil para comprovar a hidrólise dos grupamentos acetila da estrutura da quitina, através da redução da banda de estiramento da carbonila da amida (CANELLA; GARCIA, 2001). As bandas características em infravermelho para o derivado quitosana são observadas em 1654 e em 1584 cm^{-1} , respectivamente (KAYA, *et al.* 2014a).

No espectro de infravermelho da quitosana mostrado na **Figura 21**, pode-se observar a banda a 1656 cm^{-1} (ν C=O), que decresce na mesma proporção em que a banda a 1564 cm^{-1} (ν N-H) cresce, indicando assim que o material formado aumentou o seu grau de desacetilação. O espectro mostra a evolução das bandas a 1655 cm^{-1} (amida I). Segundo Canella e Garcia (2001), quando a reação ocorre entre 100 e 120°C em uma concentração entre 40 - 50% de NaOH, ocorre um aumento da desacetilação observada até o máximo de 80% em 4-5 h.

Figura 21-Espectroscopia no infravermelho do derivado quitosana apartir da quitina isolada da cutícula do inseto *Rhynchophorus palmarum*.



Fonte: autor, 2016.

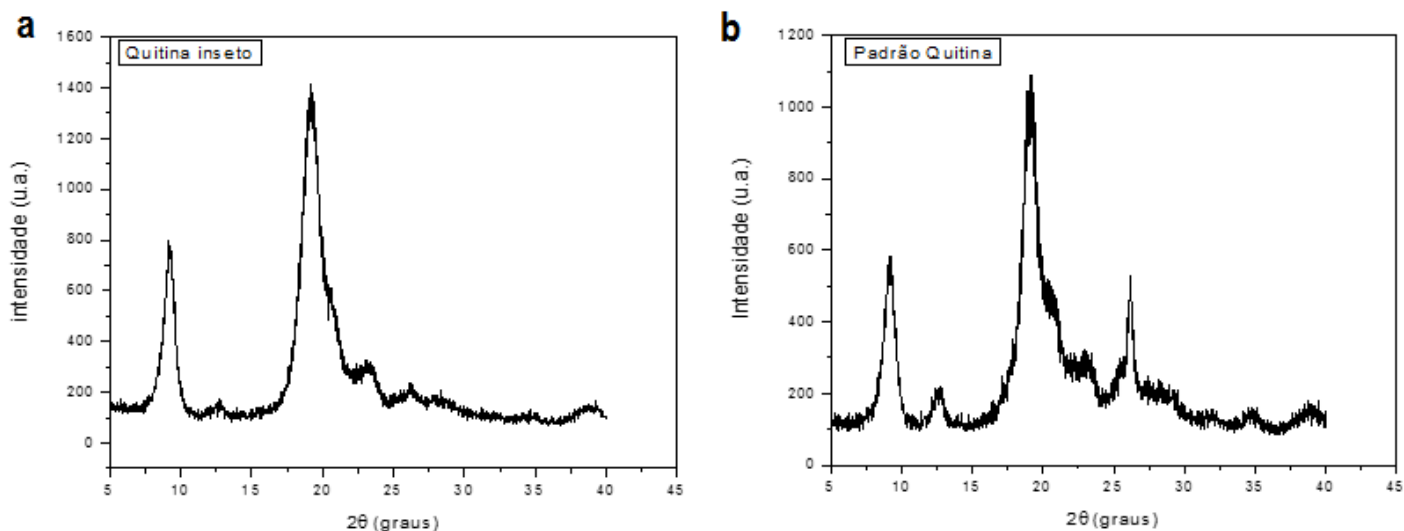
5.5.2 Difração de Raio-X (DRX)

A análise em DRX da quitina extraída da cutícula do inseto *Rhynchophorus palmarum*, permitiu observar picos de difração característicos de quitina e seu

derivado quitosana. No difratograma de quitina (**Figura 22a**), foram observados picos em 9,2°, 12,73°, 19,14°, 20,5°, 23,3° e 26,4°. Para análise mais precisa, foi possível analisar picos de DRX em quitina comercial (**Figura 22b**), a qual apresentou picos em 9°, 12°, 19°, 20°, 23° e 26°. Considerando os picos observados como resultado da análise por XRD de quitinas isoladas a partir da cutícula do inseto, este resultado também pode ser visto em estudos anteriores com grande semelhança a este (KAYA, *et al.* 2014a; BATTISTI; CAMPANA-FILHO, 2008; LIU, *et al.* 2012; SAJOMSANG; GONIL, 2010; ABDU; NAGY; ELSABEE, 2008).

Para a caracterização de quitina do tipo α , são considerados quatro reflexões cristalinas principais que ocorrem em 9,6; 19,6; 21,1 e 23,7 ° (JANG, *et al.* 2004). O que caracteriza a presença de uma α -quitina na cutícula do inseto *R. palmarum* de acordo com os resultados expressos nos difratogramas observados na **Figura 22**. Segundo Jang e colaboradores (2004), esses resultados indicam que a α -quitina apresenta uma estrutura cristalina mais rígida justificada pelas interações inter e intra cadeias (em folhas ou empilhadas). Os valores do índice de cristalinidade (I_{CR}) da quitina isolada dos insetos adultos foi de 27,57%, que correspondeu ao composto de quitina comercial (I_{CR} = 26,73%).

Figura 22– Picos de DRX das amostras de quitina. (a) quitina isolada de insetos adultos de *Rhynchophorus palmarum* (b) quitina comercial.

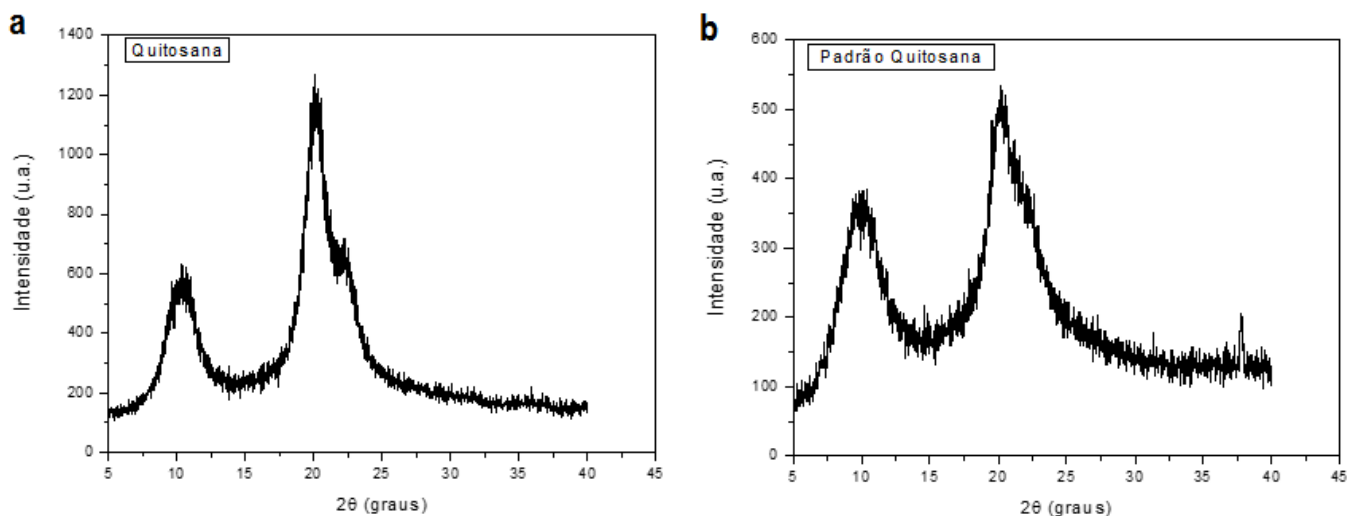


Fonte: autor, 2016.

A cristalinidade da quitina, dependendo da fonte, pode fornecer características estruturais de três tipos de polimorfismo, α ; β e γ . O perfil de DRX para β -quitina apresenta duas bandas de reflexão cristalina em $9,1^\circ$ e $20,3^\circ$, o que indica que a cristalinidade de β -quitina é bem menor que α -quitina, apresentada anteriormente, pois a estrutura da cadeia β é paralela, diferente da estrutura antiparalela da α -quitina, e com isso menos cristalinidade. Porém, a cristalinidade da estrutura da γ -quitina apresenta perfil mais semelhante a α , pois o DRX de γ -quitina apresenta picos máximos em $9,6^\circ$ e $19,8^\circ$, que pode caracterizar um arranjo de estrutura paralela e antiparalela (JANG, *et al.* 2004). Sendo essas estruturas determinadas pela existência de ligação de hidrogênio inter e intra cadeia caracterizada anteriormente por análise em infravermelho.

A análise em DRX de quitosana (**Figura 23a**) obtida da quitina isolada da cutícula do inseto, apresentou picos de reflexões cristalinos compatíveis com o descrito em literatura (KAYA, *et al.* 2014a; BATTISTI; CAMPANA-FILHO, 2008). Os picos característicos de quitosana apareceram em $2\theta = 10,43^\circ$ e $2\theta = 20,1^\circ$, que correspondem aos picos de quitosana comercial (**Figura 23b**) visualizados em $10,1^\circ$ e $20,17^\circ$. Os dois picos de análises XRD da quitosana apresentado foram observados como sendo semelhantes aos derivados de organismos, tais como camarão, lagosta e caranguejo (KAYA, *et al.* 2014).

Figura 23- Picos de DRX das amostras de quitosana. (a) quitosana isolada e (b) quitosana comercial.



Fonte: autor, 2016.

O índice de cristalinidade (I_{CR}) da quitosana isolada a partir da quitina do inseto *Rhynchophorus palmarum*, apresentou 15,86%. E pelo valor de I_{CR} identificado, observa-se que a quitosana perdeu grau de cristalinidade comparado com 27,57% de I_{CR} da quitina, isso pode ser justificado pelo processo de desacetilação da quitina em quitosana, ou seja, a perda do grupamento acetila ($-COCH_3$) na estrutura da quitina formando quitosana, influenciou nos reflexos cristalinos deste composto, além de aumentar o grau de desacetilação. Por tanto, pode-se dizer que quanto maior o grau de desacetilação, menor o grau de cristalinidade do composto. Pois para que o composto seja chamado de quitosana, a quitina desacetilada deve conter pelo menos 60% de resíduos de D-glucosamina ao longo da cadeia, ao invés de N-acetil-D-glucosamina, correspondendo assim a um grau de desacetilação de 60. E com a presença de grupos aminos, mais a redução da cristalinidade, proporciona à quitosana diferenças importantes entre a quitina como o aumento da solubilidade em solução aquosa ácida. Pelo fato de que o efeito dos resíduos de grupos amino de D-glucosamina ser protonado e proporcionar melhora na solubilidade do composto; e a diminuição do grau de cristalinidade facilitar a solubilização (CROISIER; JÉRÔME, 2013).

6 CONCLUSÃO

No presente estudo foi desenvolvida a extração de lipídeos cuticulares e internos de insetos adultos de *Rhynchophorus palmarum*, assim como a caracterização e diferenciação do perfil cuticular entre insetos macho e fêmea, através de métodos aplicados em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). Foram identificados os principais constituintes cuticulares, como hidrocarbonetos, álcoois, cetona e aldeído. Nesse contexto, foi observada grande similaridade no perfil cuticular entre machos e fêmeas, foi avaliado diferentes quantidades de classe química de compostos variando em menor quantidade na cutícula do inseto macho em relação a fêmea.

O conteúdo do extrato lipídico interno e cuticular, foi submetido a transesterificação a fim de propor ésteres metílicos de ácidos graxos mais voláteis e com melhor resolução em CG-EM. Com isso, pode-se identificar, quantificar e diferenciar o perfil lipídico cuticular e interno do inseto fêmea e macho. O perfil lipídico da fêmea diferenciou do macho pela presença de C_{22:0} no extrato cuticular e C_{18:1n9t} no interno, e no macho pela presença de C_{21:0} e C_{20:2} na cutícula. O perfil lipídico do inseto variou de C₁₄ a C₂₃ com total de 10 ésteres metílicos de ácidos graxos identificados. Em uma prévia análise quantitativa, verificou-se que componentes semelhantes, como C₁₆ e C₁₈, estão em maior quantidade na fração de lipídeos internos do que na a fração cuticular.

A cutícula do inseto afeta a infecção fúngica por ação fungicida ou fungistática devido a presença de lipídios cuticulares e pela barreira de quitina presente no exoesqueleto do inseto. Nos testes de atividade antimicrobiana, os extratos da cutícula apresentaram inibição contra *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, confirmando a capacidade antimicrobiana e protetora de lipídeos cuticulares e internos.

E em associação ao estudo de cuticulares, foi realizada a extração de quitina da cutícula dos insetos adultos, que confere grande parte da cutícula interna (procutícula) e representa um importante componente estrutural na carapaça de insetos e crustáceos. A quitina foi então elucidada por caracterização em estudo por infravermelho e difração de raio-X, afirmando sua real presença na cutícula de R.

palmarum. A quitina extraída, foi desacetilada a fim de testar a possibilidade de obter o derivado quitosana, assim, este foi também caracterizado pelas mesmas metodologias empregadas anteriormente, e com isso pode-se comprovar a formação de um derivado mais solúvel que apresenta grande interesse industrial e tecnológico.

Esta foi a primeira vez que a composição química cuticular foi analisada e identificada neste inseto. Foram alcançados resultados bastante satisfatórios e em consonância com o descrito na literatura de insetos.

Uma vez estabelecida a real capacidade antimicrobiana na cutícula desse inseto, pretende-se ainda quantificar os metil ésteres de ácidos graxos identificados, com o intuito de contribuir para estudos futuros de possíveis estratégias inseticidas por interferência na barreira química composta pela cera já descrita nesse trabalho.

7 REFERÊNCIAS

- ABDOU, S.; NAGY, S. A.; ELSABEE, M. Z. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. **Bioresource Technology**. p. 1359–1367, 2008.
- ALMEIDA, A. M. B. D. *et al.* Susceptibilidade de *rhynchophorus palmarum* à ação de *metarhizium anisopliae* e compatibilidade do entomopatógeno com agrotóxicos utilizados na cultura da banana. **Arq. Inst. Biol.**, 2010.
- ALMEIDA, M.R.M; GALVÃO, D.M.O; OYOLA, A.M.V. FERREIRA, J.M.S. **Relatório de avaliação dos impactos das tecnologias geradas pela embrapa: Armadilha PET – Sistema de Captura**. Aracaju/SE, 2015.
- AQUINO NETO, F. R.; NUNES, D. S. E. S. **Cromatografia princípios básicos e técnicas afins**. Rio de janeiro: Interciência Ltda, 2003.
- ARAGÃO, W. M. Coco Pós-colheita. **Embrapa Informação Tecnológica**, Aracaju, SE , p. 76, 2003.
- BABUSHOK, V. I.; LINSTROM, P. J.; ZENKEV, I. G. Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 40, 2011. ISSN 4.
- BATISTA, D. P. C. **Preparação de microcompósito polimérico e sua avaliação como matriz para bioinseticidas entomopatogênicos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2014.
- BATTISTI, ; CAMPANA-FILHO, P. Obtenção e caracterização de α -quitina e quitosanas de cascas de *Macrobrachium rosenbergii*. **Química Nova**, novembro 2008.
- BLOMQUIST, G. J.; BAGNÈRES, A.-G. **Insect Hydrocarbons Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology**. United States of America by Cambridge University Press, New York, 2010.
- BREY, P. T. *et al.* Role of the integument in insect immunity: Epicuticular abrasion and induction of cecropin synthesis in cuticular epithelial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.** Vol. 90, p. 6275-6279, July 1993.
- BOGUS, I. *et al.* Effects of insect cuticular fatty acids on in vitro growth and pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Conidiobolus coronatus*. **Experimental Parasitology**, v. 125, p. 400–408, 2010.
- CALDERÓN-FERNÁNDEZ, G. M.; JUÁREZ, M. P. The cuticular hydrocarbons of the *Triatoma sordida* species subcomplex (Hemiptera: Reduviidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro , 2013.
- CAMPANA-FILHO, P. *et al.* EXTRAÇÃO, ESTRUTURAS E PROPRIEDADES DE α - E β -QUITINA. **Química Nova** , Janeiro 2007.

CANELLA, M. N. D. C.; GARCIA, B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel – influência do método de preparação e do solvente. **Química nova**, 2001.

CHAO, T. H. et al. Male-Specific Cuticular Compounds of the Six *Drosophila* paulistorum Semispecies: Structural Identification and Mating Effect. **Journal of Chemical Ecology**, 2010.

CLSI-Clinical Laboratory Standards Institute. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico, 2003.

CLSI-Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 22^a Informational Supplement. Vol. 32, n 3, 2012.

CROISIER, F.; JÉRÔME,. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. **European Polymer Journal**, 2013.

CURTIS, S. *et al.* Epicuticular Compounds of *Drosophila subquinaria* and *D. recens*: Identification, Quantification, and Their Role in Female Mate Choice. **Journal of Chemical Ecology**, 2013.

CYSNE, Q. *et al.* manejo de *Rhynchophorus palmarum* em campo de produção de sementes de palma de óleo. **DOCUMENTO 107 - EMBRAPA**, Manaus, AM, 2013a.

CYSNE, Q. *et al.* Flutuação populacional de *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) em palmeiras oleíferas no Amazonas. **Acta Amazonica**, 2013b. 197 - 202.

DESBOIS, A.; SMITH, V. J. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. **Appl Microbiol Biotechnol.** v.85, p. 1629–1642, 2010.

DONZÉ, *et al.* Aliphatic Alcohols and Aldehydes of the Honey Bee Cocoon Induce Arrestment Behavior in *Varroa jacobsoni* (Acari: Mesostigmata), an Ectoparasite of *Apis mellifera*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, 1998.

DUARTE, G. *et al.* Captura de *rhynchophorus palmarum* L. (coleoptera: curculionidae) em armadilhas iscadas com o feromônio de agregação e compostos voláteis de frutos do abacaxi. **Revista Brasileira de Fruticultura**, São Paulo , v. 25, p. 81-84, Abril 2003. ISSN 1.

DUARTE, G.; LIMA, S. Eficiência de Diferentes Taxas de Liberação do Feromônio de Agregação na Captura de *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical Entomology**, 2001.

ESPARZA-DÍAZ, G. *et al.* Detection of *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae) and Identification of Associated Nematodes in South Texas. **Florida Entomologist**, 2013.

FERREIRA, J. M.; WARWICK, D. N. R.; SIQUEIRA, L. A cutulra do coqueiro no Brasil , Brasília: EMBRAPA, n. 2^a, p. 1-292, 1998.

FERREIRA, J.M.S.; MICHEREFF FILHO, M. Pragas e métodos de controle. In: FONTES, H. R.; FERREIRA, J. M. S.; SIQUEIRA, L. A. **Sistema de Produção para a Cultura do Coqueiro**. Embrapa. p.35-37, 2002.

FERREIRA, M. *et al.* Utilização dos ácidos graxos no tratamento de feridas: uma revisão integrativa da literatura nacional. **Rev Esc Enferm USP**, v. 46, p. 752-60, 2012. ISSN 3.

FERREIRA, M. S. F. *et al.* Manejo integrado da broca-do- olho-do-coqueiro *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae). **Comunicado técnico 141- EMBRAPA** , Aracajú, SE, 2014.

GILBERT , I.; CHINO,. Transport of lipids in insects. **Journal of Lipid Research**, 1974.

GILLESPIE, J. P, *et al.* Fungi as Elicitors of Insect Immune Responses. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**. V. 44, p. 49–68, 2000.

GINZEL, D. *et al.* (Z)-9-nonacosene—major component of the contact sex pheromone of the beetle *Megacyllene caryae*. **Journal of Chemical Ecology**, 2006.

GOLEBIEWSKI, M. *et al.* Application of Two-Way Hierarchical Cluster Analysis for the Identification of Similarities between the Individual Lipid Fractions of *Lucilia sericata*. **Chemistry & Biodiversity**, 2014.

GOLEBIEWSKI , M. *et al.* The cuticular fatty acids of *Calliphora vicina*, *Dendrolimus pini* and *Galleria mellonella* larvae and their role in resistance to fungal infection. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, p. 619– 627, 2008b.

GOLEBIEWSKI, *et al.* Cuticular lipids of insects as potential biofungicides: methods of lipid composition analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2011.

GOŁEBIEWSKI, M. Comparison of Free Fatty Acids Composition of Cuticular Lipids of *Calliphora vicina* Larvae and Pupae. **Lipids**, v. 47, p. 1001–1009, 2012c.

GOLEBIEWSKI, M. *et al.* Identification and characterization of surface lipid components of the dried-bean beetle *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Stored Products Research**, 2008a.

GOLEBIEWSKI, M. *et al.* Cuticular lipids of insects as potential biofungicides: methods of lipid composition analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, p. 3177–3191, 2010.

GOLEBIEWSKI, M. *et al.* Antimicrobial activity of alcohols from *Musca domestica*. **The Journal Of Experimental Biology**, Polônia, maio 2012b.

GOLEBIEWSKI, M. *et al.* Free fatty acids in the cuticular and internal lipids of *Calliphora vomitoria* and their antimicrobial activity. **Journal of Insect Physiology**, 2013a.

GUTIERREZ, C. *et al.* Cuticle Fatty Acid Composition and Differential Susceptibility of Three Species of Cockroaches to the Entomopathogenic Fungi *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota, Hypocreales). **Journal of Economic Entomology**, 2015.

INSUA, J. L. *et al.* Modeling *Klebsiella pneumoniae* pathogenesis by infection of the wax moth *Galleria mellonella*. **Infection and Immunity**, v. 10, p. 52-65, 2013. ISSN 35.

JANG, M.-K. *et al.* Physicochemical characterization of α -chitin, β -chitin, and γ -chitin separated from natural resources. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, 2004.

JOSEPH, J. D.; ACKMAN, R. G. Capillary column gas-chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl-esters - Collaborative study. **Journal of AOAC International**, 1992 apud MILINSK, M. C. **Análise comparativa entre oito métodos de esterificação na determinação quantitativa de ácidos graxos em óleo vegetal**. Tese (Doutor em Ciências). Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2007.

KARPAGASUNDARI, C.; KULOTHUNGAN, S. Analysis of bioactive compounds in *Physalis minima* leaves using GC MS, HPLC, UV-VIS and FTIR techniques. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, 2014. 196-201.

KAYA, M. *et al.* Physicochemical comparison of chitin and chitosan obtained from larvae and adult Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*). **Materials Science and Engineering C**, Maio 2014a.

KAYA, M. *et al.* Comparison of physicochemical properties of chitins isolated from an insect (*Melolontha melolontha*) and a crustacean species (*Oniscus asellus*). **Zoomorphology**, 2014b.

KERWIN, J. L. Fatty acid regulation of the germination of *Erynia variabilis* conidia on adults and puparia of the lesser housefly, *Fannia canicularis*. **Canadian Journal of Microbiology**. V. 30n. 2, p. 158-161, 1984.

KÜHBANDNER, S. *et al.* Deciphering the signature of cuticular lipids with contact sex pheromone function in a parasitic wasp. **The Journal of Experimental Biology**, 2012.

KÜHBANDNER, S.; RUTHER, J. Solid Phase Micro-extraction (SPME) with In Situ Transesterification: An Easy Method for the Detection of Non-volatile Fatty Acid Derivatives on the Insect Cuticle. **J Chem Ecol**, 2015.

LAMPMAN, G. M. *et al.* **Spectroscopy**. 4^a. ed. 2010.

LANÇAS, M. **validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos : Rima, v. 6, 2004.

LEHANE, M. J. Biology of blood-sucking insects. **Harper Collin Academic**, p. 77-85, 1991.

LIU, S. *et al.* Extraction and Characterization of Chitin from the Beetle *Holotrichia parallela* Motschulsky. **Molecules**, abril 2012.

MARANHÃO, Z. G. **Entomologia geral**. 2^a. ed. São paulo : Nobel, 1977.

MARTINS, ; YOKOYA, S.; COLEPICOLOR, . Comparison of extraction and transesterification methods on the determination of the fatty acid contents of three Brazilian seaweed species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Junho 2012.

MASSUDA, K. ; TRIGO, R. Hiding in Plain Sight: Cuticular Compound Profile Matching Conceals a Larval Tortoise Beetle in its Host Chemical Cloud. **Journal of Chemical Ecology**, 2014.

MERZENDORFER, H.; ZIMMCH, L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. **The Journal of Experimental Biology**, Setembro 2003.

MOURA, I. L. *et al.* Captura de *Rhynchophorus palmarum* (L.) pelo Uso de Feromônio de Agregação Associado a Árvore-Armadilha e Inseticida. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, 1997.

MOUSSIAN, B. Recent advances in understanding mechanisms of insect cuticle differentiation. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 2010.

MOUSSIAN, *et al.* Cuticle differentiation during *Drosophila* embryogenesis. **Arthropod Structure & Development**, 2006.

NAPOLITANO, ; JUAREZ, M. P. Entomopathogenous Fungi Degrade Epicuticular Hydrocarbons of *Triatoma infestans*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 344, p. 208–214, 1997. ISSN 1.

NEGRISOLI JÚNIOR, A. S.; SILVA, E. S.; NEGRISOLI, C.; SANTOS, N. L.; GUZZO, E. C. Criação em laboratório da broca-do-olho-do-coqueiro *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) visando pesquisas para

o controle das suas larvas. **Comunicado Técnico** – EMBRAPA, Aracaju, SE, dezembro, 2011. n.116.

NELSON, D. L.; COX, M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6^a. ed. Porto Alegre : Artmed , 2014.

NELSON, R. *et al.* Characterization of the cuticular surface wax pores and the waxy particles of the dustywing, *Semidalis flinti* (Neuroptera: Coniopterygidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, 2003.

PAULINO, A. T. *et al.* Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides. **Carbohydrate Polymers** , 2006.

PEDRINI, N. Targeting of insect epicuticular lipids by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: hydrocarbon oxidation within the context of a host-pathogen interaction. **Frontiers in Microbiology**. V. 4, artigo 24, 2013.

RAVI KUMAR , M. N. V. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, 2000.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in polymer science** , v. 31, p. 603–632, 2006.

SABINO, A. R. **Utilização de Nematoides Entomopatogênicos (Nematoda: Rhabditida) e Inseticidas Botânicos Visando ao Controle de Adultos de *Rhynchophorus palmarum* L., 1764 (Coleoptera: Curculionidae)**, 2014. 78f. conclusão de curso (mestrado) - Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Alagoas. Rio Largo, AL, 2014.

SALTO, T.; AOKI, J. Toxicity of free fatty acids on the larval surfaces of two Lepidopterous insects towards *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Paecilomyces fumoso-roseus* (Wize) brown et smith (Deuteromycetes: moniliales). **Appl. Ent. Zool.** V. 18, n.2, p. 225 - 233, 1983.

SAJOMSANG, W.; GONIL, P. Preparation and characterization of α -chitin from cicada sloughs. **Materials Science and Engineering C**, 2010. 357–363.

SEPÚLVEDA-CANO, P. ; RUBIO-GÓMEZ, D. Dryophthorinae Species (Coleoptera: Curculionidae) Associted to Platain and Banana crops (*Musa* spp.) in Colombia. **Acta Biológica Colombiana**, v. 14, p. 49 - 72, 2009. ISSN 2.

SESSLER, A. M.; NTAMBI, J. M. Polyunsaturated Fatty Acid Regulation of Gene Expression. **The Journal fo Nutrition** , 1998.

SONG, C. *et al.* Physicochemical properties and antioxidant activity of chitosan from the blowfly *Chrysomya megacephala* larvae. **International Journal of Biological Macromolecules**, Junho 2013. 347–354.

SZAFRANEK, B. *et al.* Gas Chromatographic Analysis of Plant and Insect Surface Compounds: Cuticular Waxes and Terpenoids. In.: SALIH, B.; ÇELIKBIÇAK, Ö. **Gas chromatography in plant science, wine technology, toxicology and some specific applications**. ed. Intech , 2012.

URBANEK, A. *et al.* Composition and antimicrobial activity of fatty acids detected in the hygroscopic secretion collected from the secretory setae of larvae of the biting midge *Forcipomyia nigra* (Diptera: Ceratopogonidae). **Journal of Insect Physiology**. V. 58, p. 1265–1276, 2012.

VRABLIK, T. L.; WATTS, J. L. Polyunsaturated Fatty Acid Derived Signaling in Reproduction and Development: Insights From *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*. **Molecular Reproduction e Development**. V.80 p.244–259, 2013.

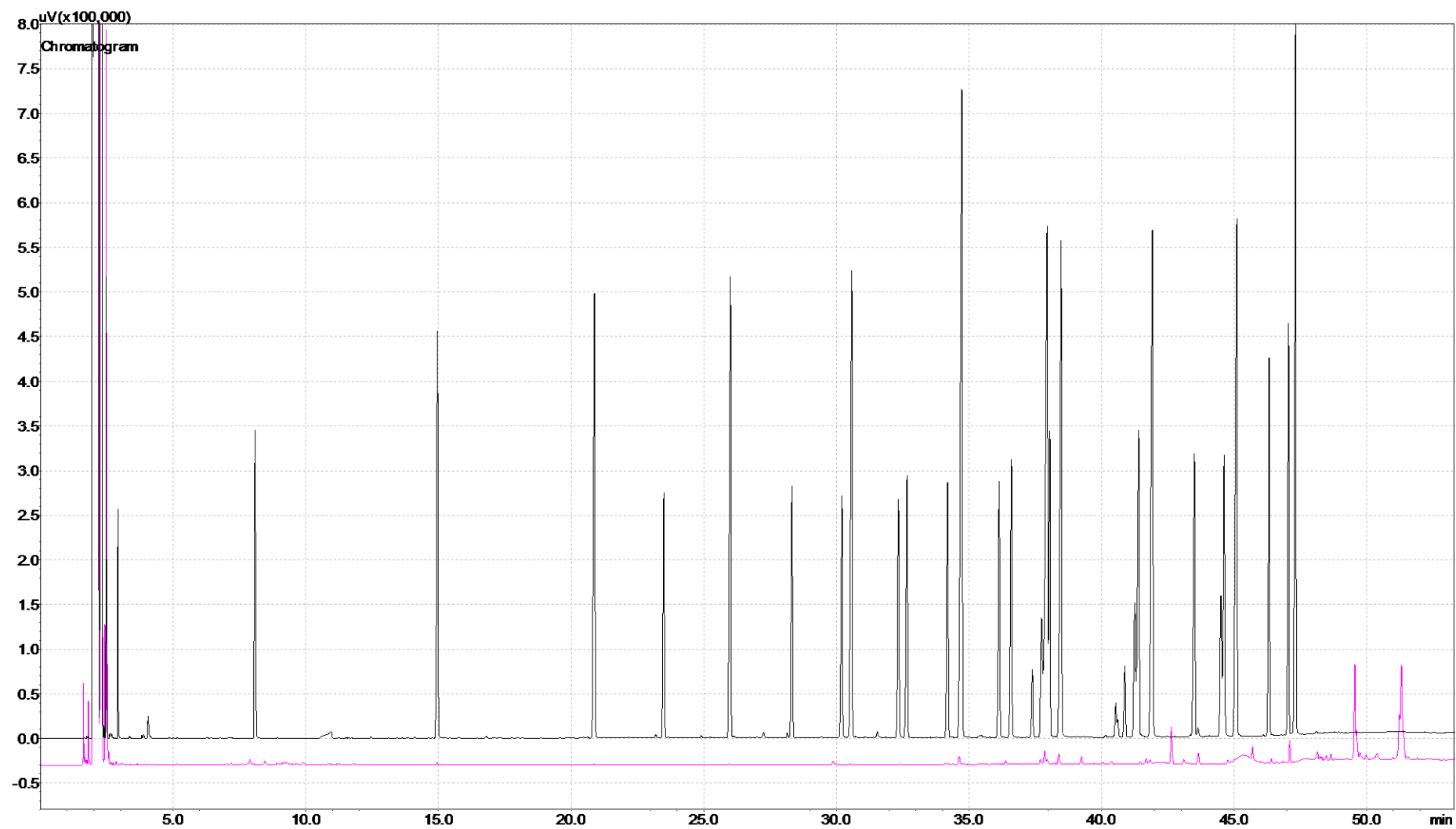
VANÍCKOVÁ, L. *et al.* Resolution of three cryptic agricultural pests (*Ceratitis fasciventris*, *C. anonae*, *C. rosa*, Diptera: Tephritidae) using cuticular hydrocarbon profiling. **Bulletin of Entomological Research**, 2014. 631–638.

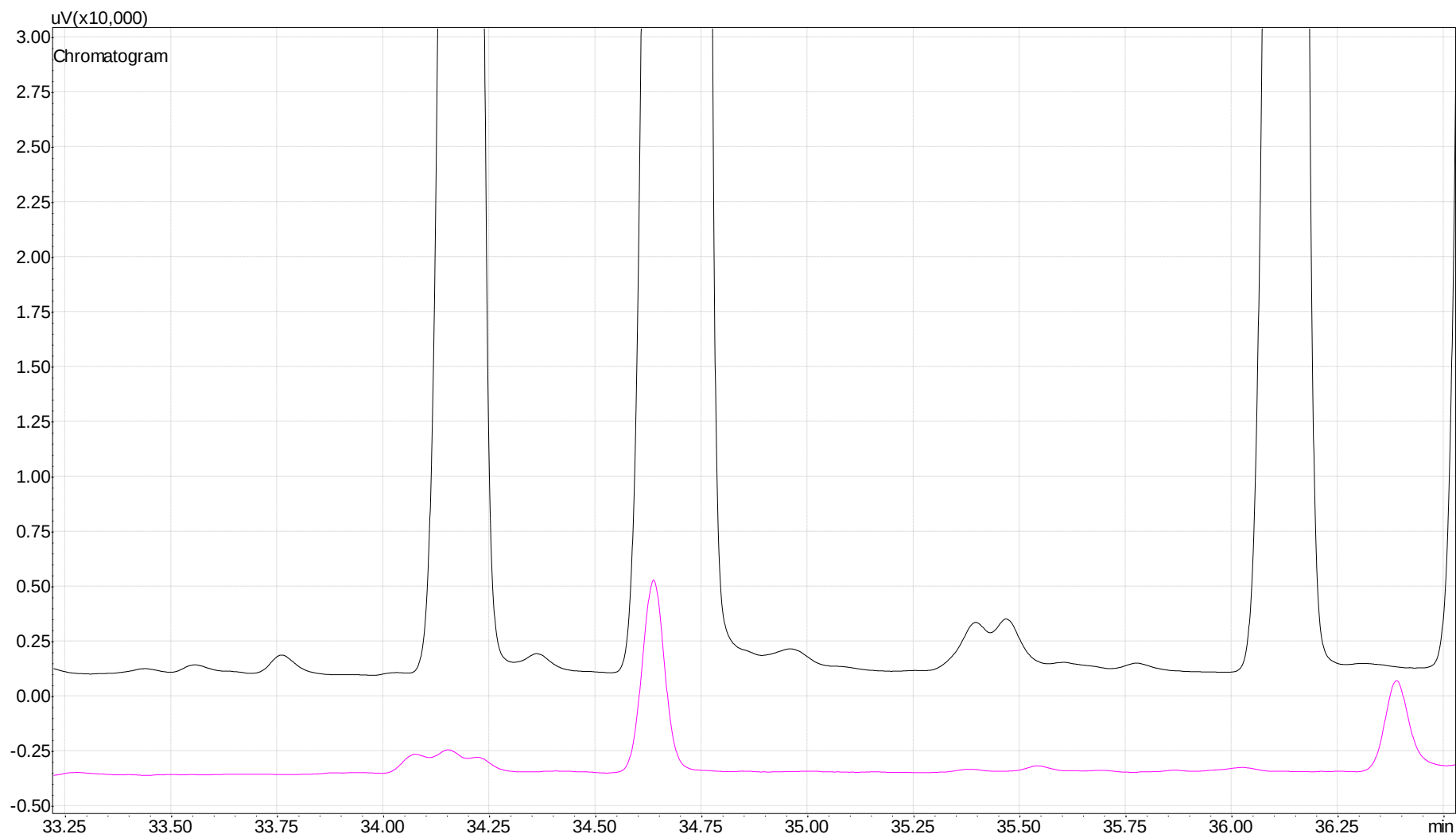
ZHANG, B. *et al.* Male mate recognition via cuticular hydrocarbons facilitates sexual isolation between sympatric leaf beetle sister species. **Journal of Insect Physiology**, 2014.

ZHANG, M. *et al.* Structure of insect chitin isolated from beetle larva cuticle and silkworm (*Bombyx mori*) pupa exuvia. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2000.

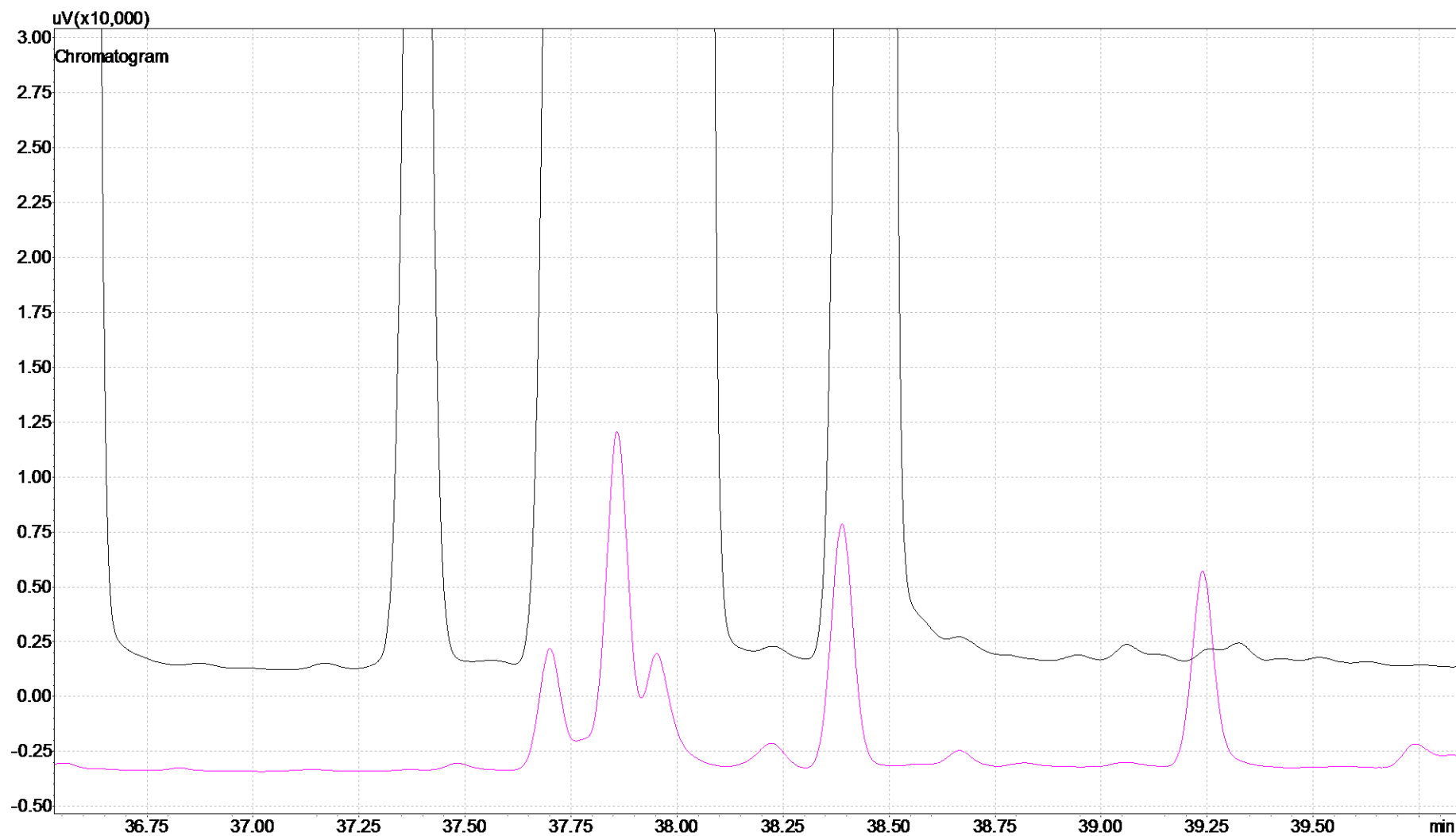
8 **APÊNDICE A – CROMATOGRAMAS ANÁLISE DE IDENTIFICAÇÃO COM PADRÃO DE ESTERS METÍLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS (PADRÃO EM PRETO E EXTRATO EM ROSA)**

Extrato cutícula Fêmea transesterificado

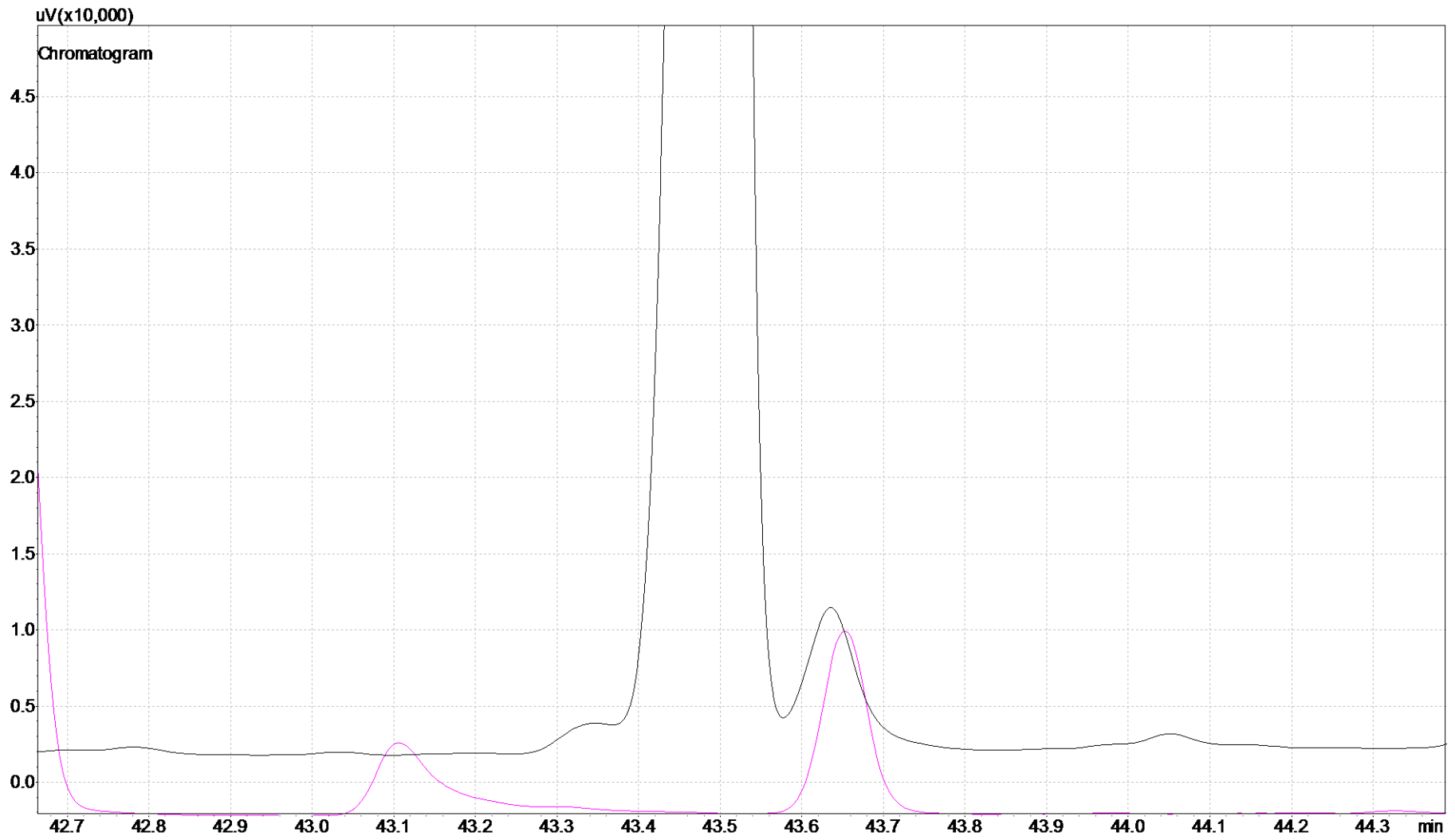


Composto: Palmitoleato de metila (C_{16:1})

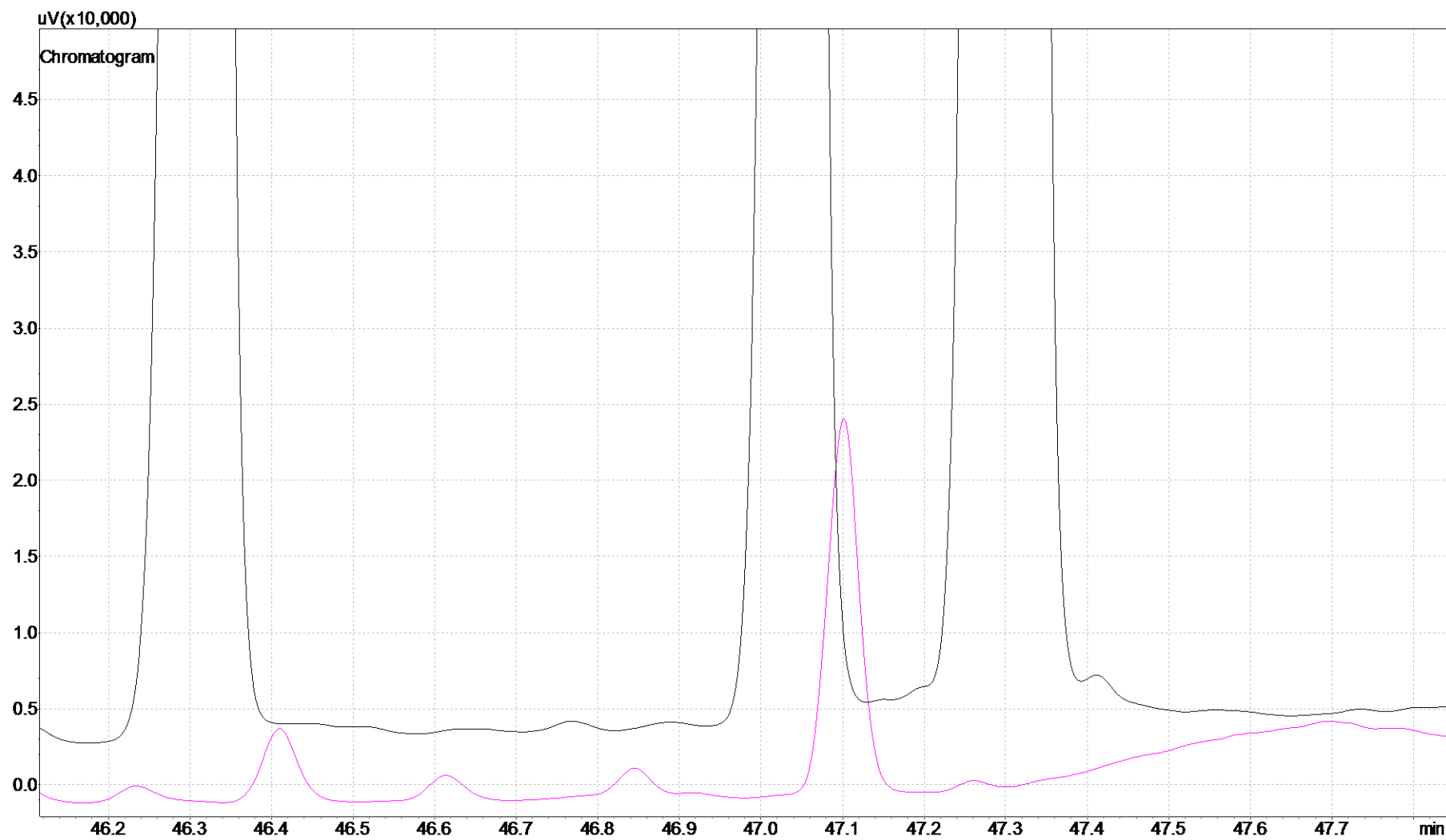
Composto: Oleato de metila ($C_{18:1n9c}$) / linoleato de metila ($C_{18:2n6c}$)



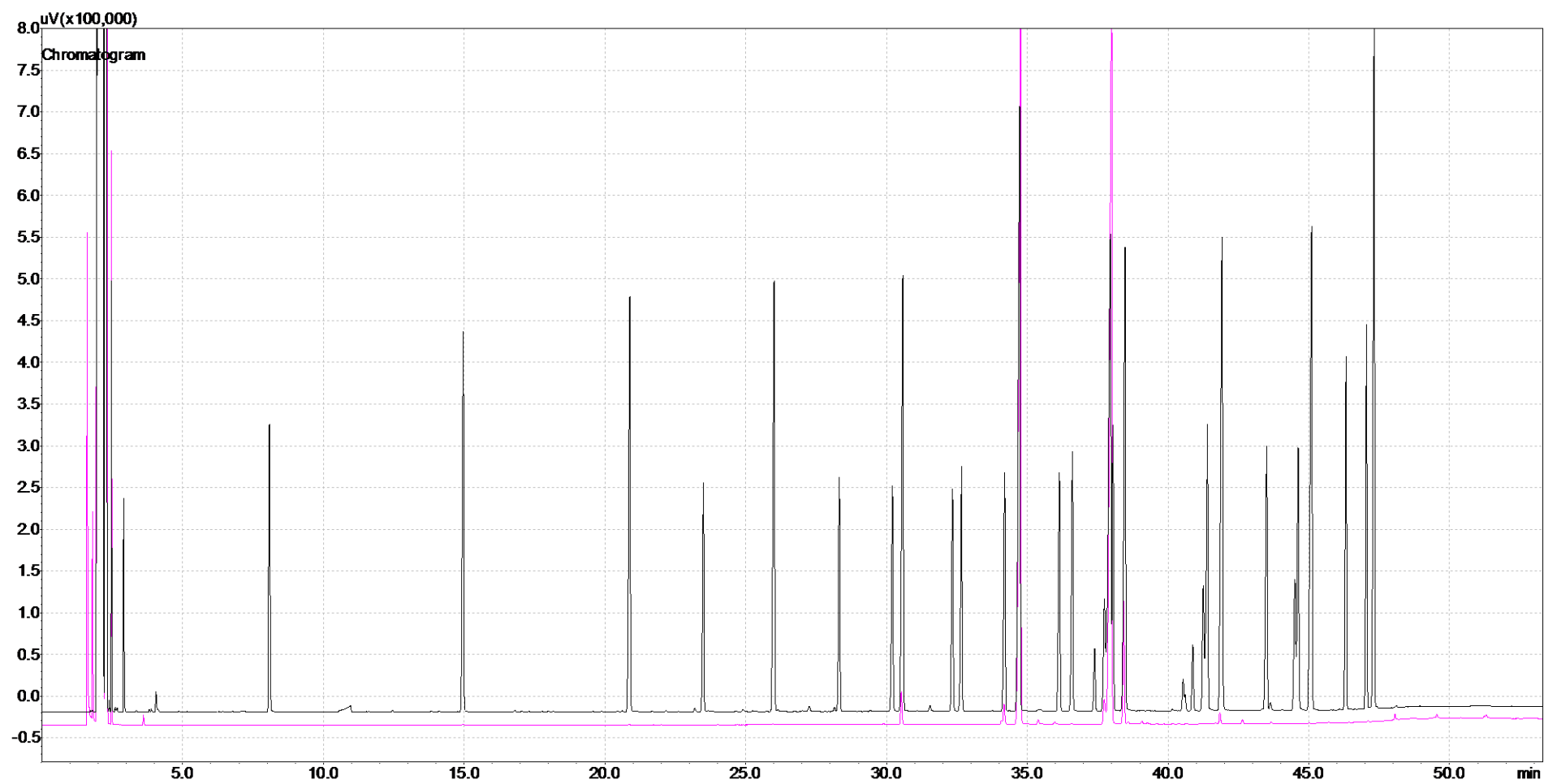
Composto: Beenoato de metila (C_{22:0})



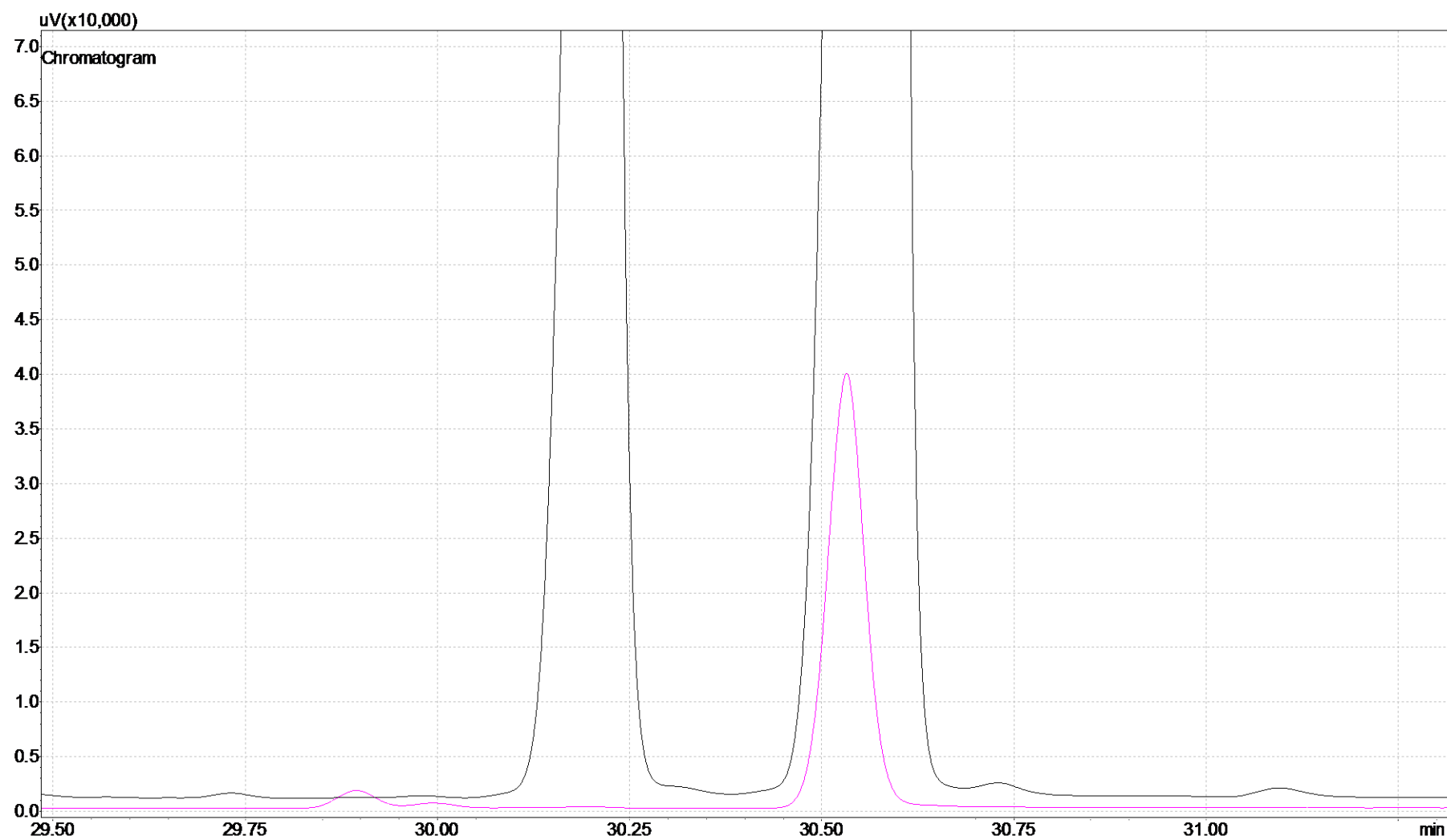
Composto: Tricosanoato de metila (C_{23:0})



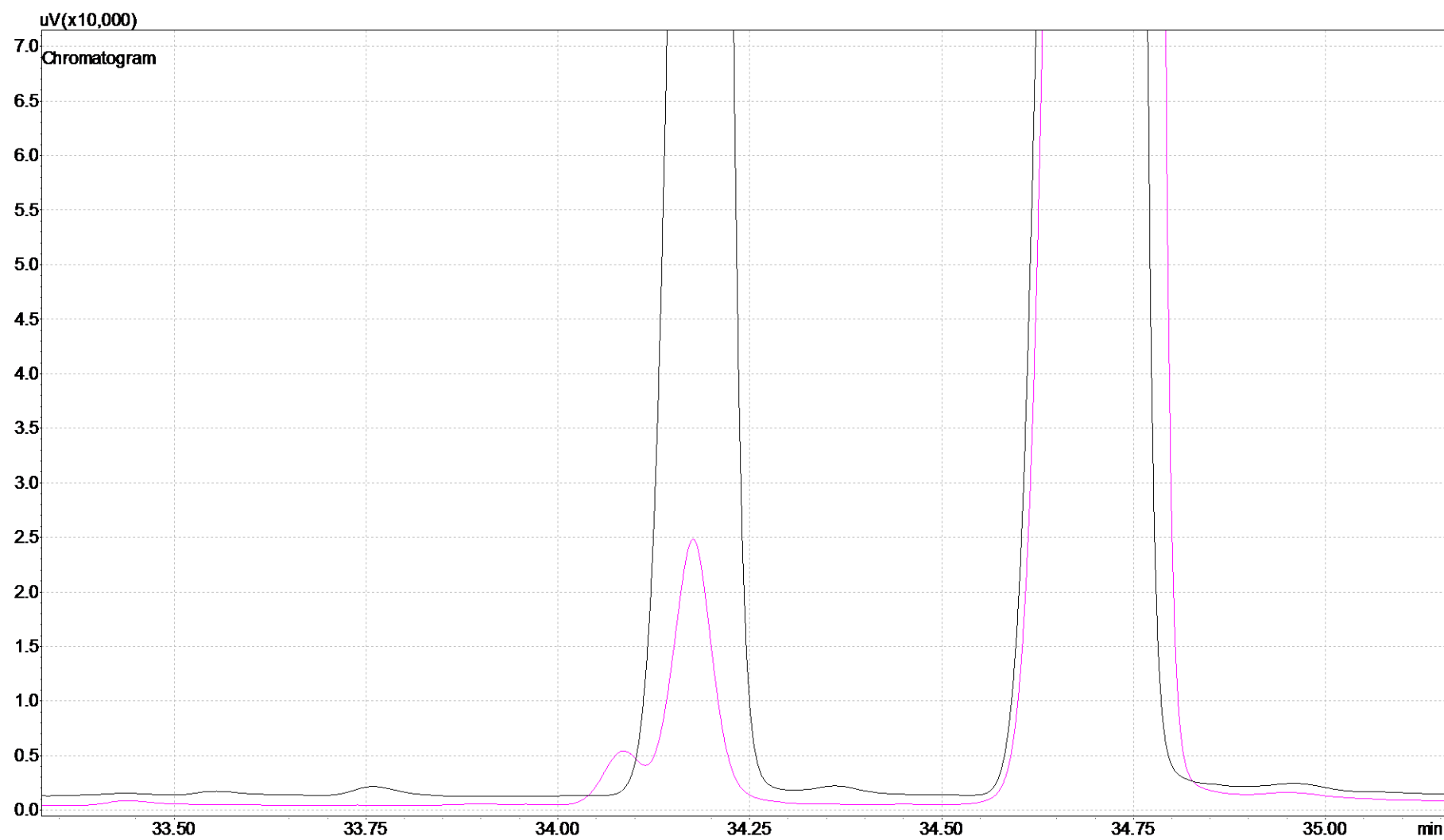
Extrato interno fêmea transesterificado



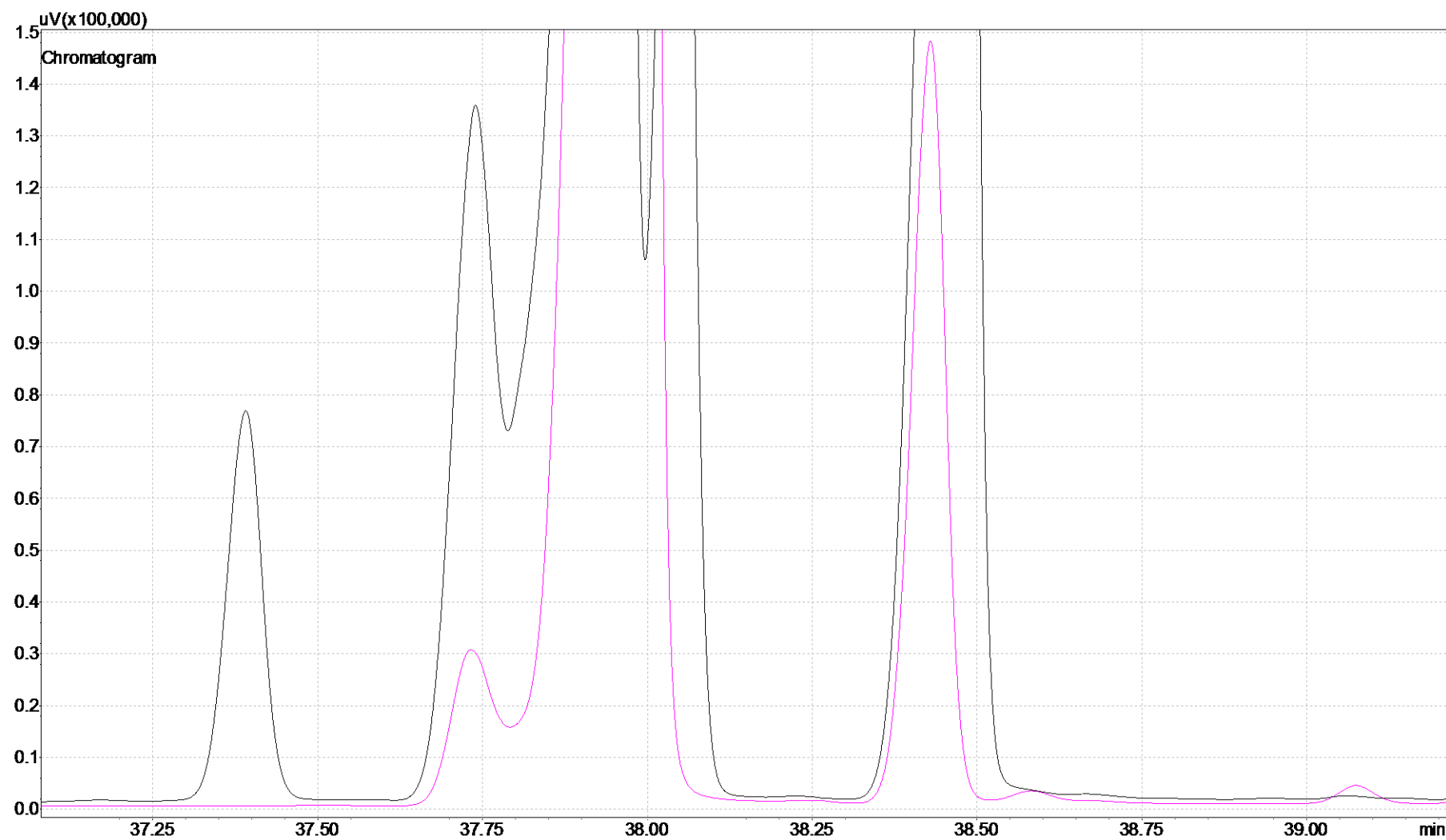
Composto: Miristoleado de metila (C_{14:1})



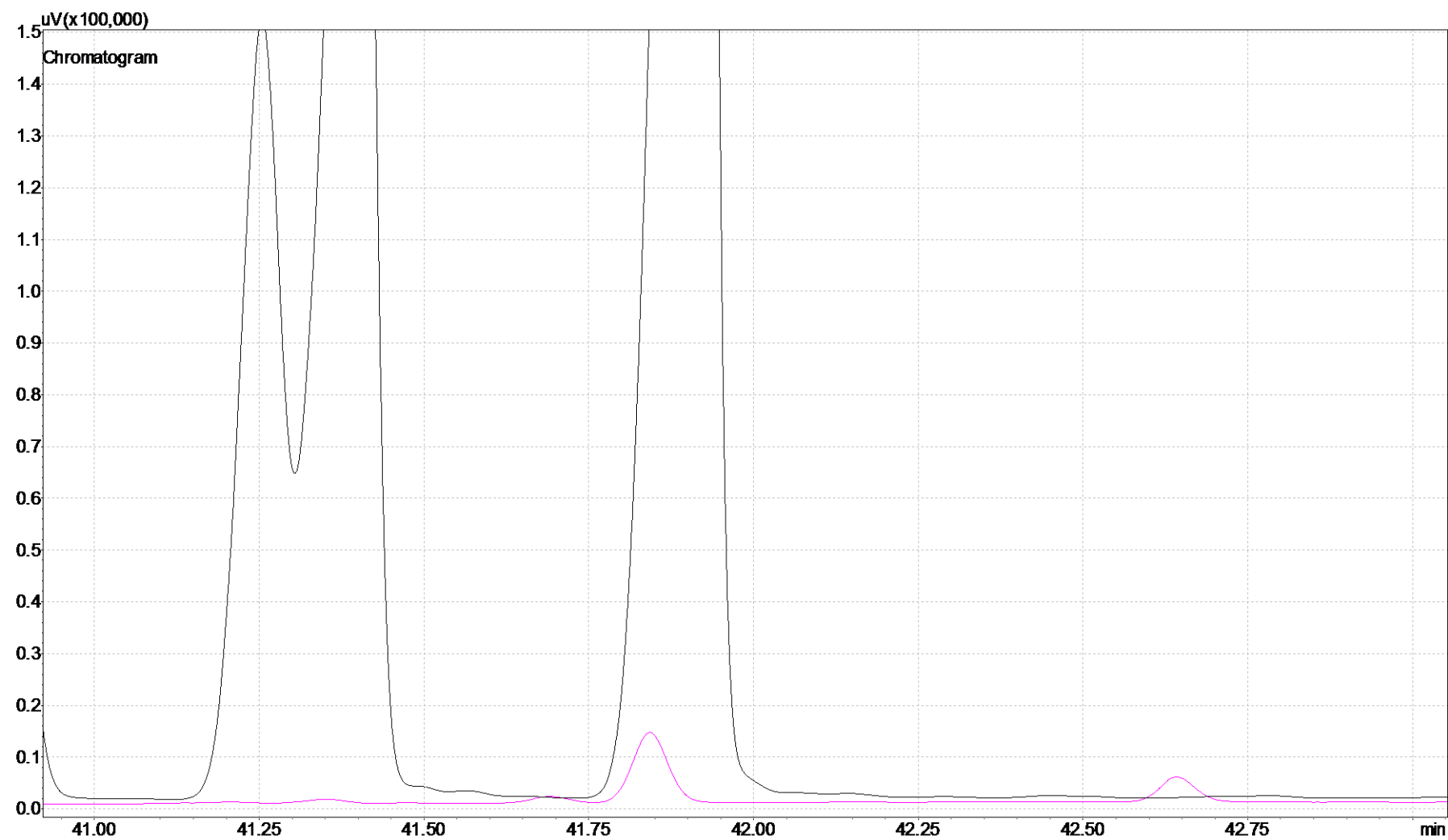
Composto: Palmitato de metila (C_{16:0}) / Composto: Palmitoleato de metila (C_{16:1})



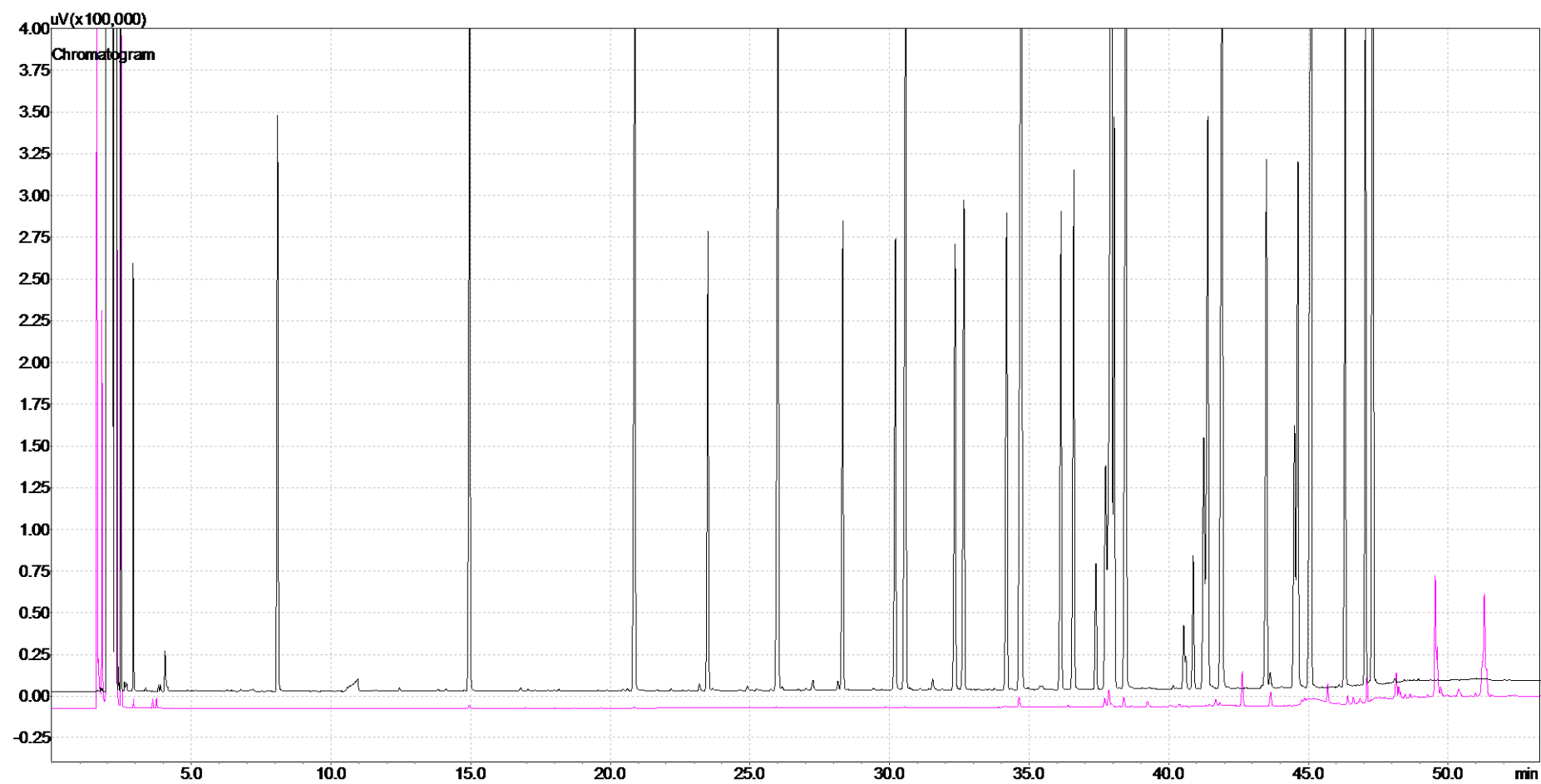
Composto: Elaidato de metila ($C_{18:1n9t}$) / Composto: Oleato de metila ($C_{18:1n9c}$) / Composto: Linoleato de metila ($C_{18:2n6c}$)



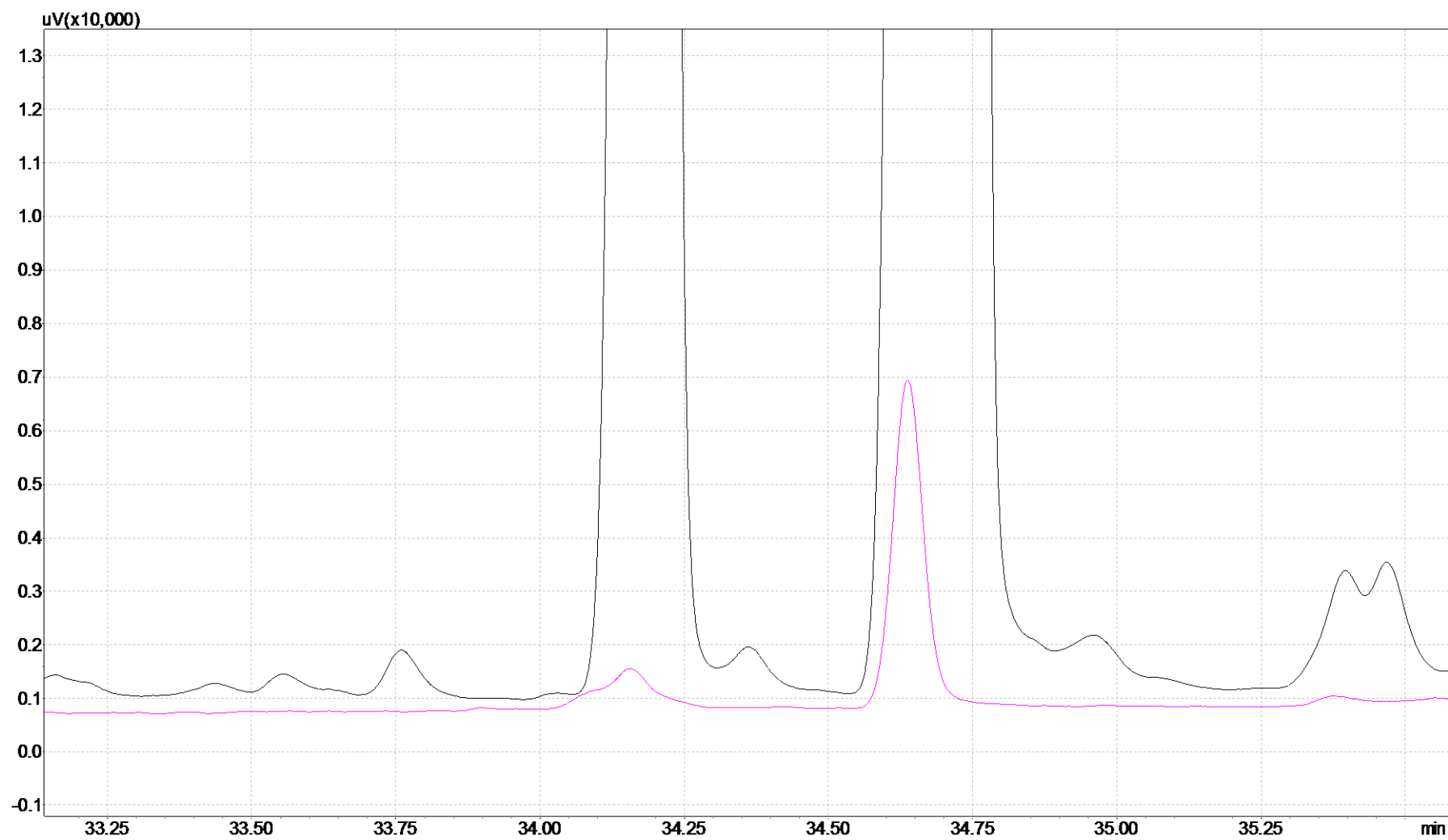
Composto: cis -11,14 - eicosadienoato de metila (C_{20:2})



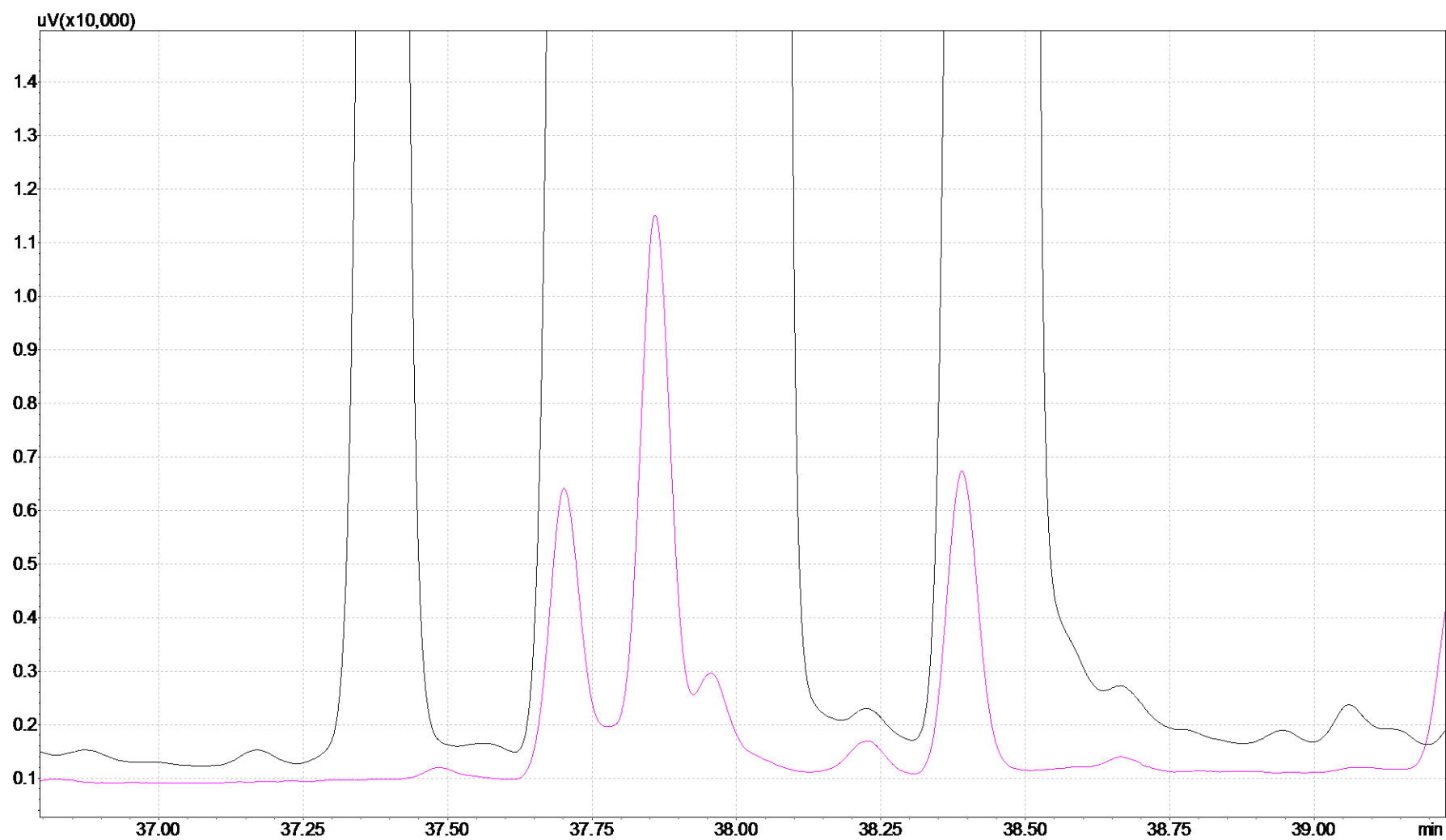
Extrato cutícula macho transesterificado



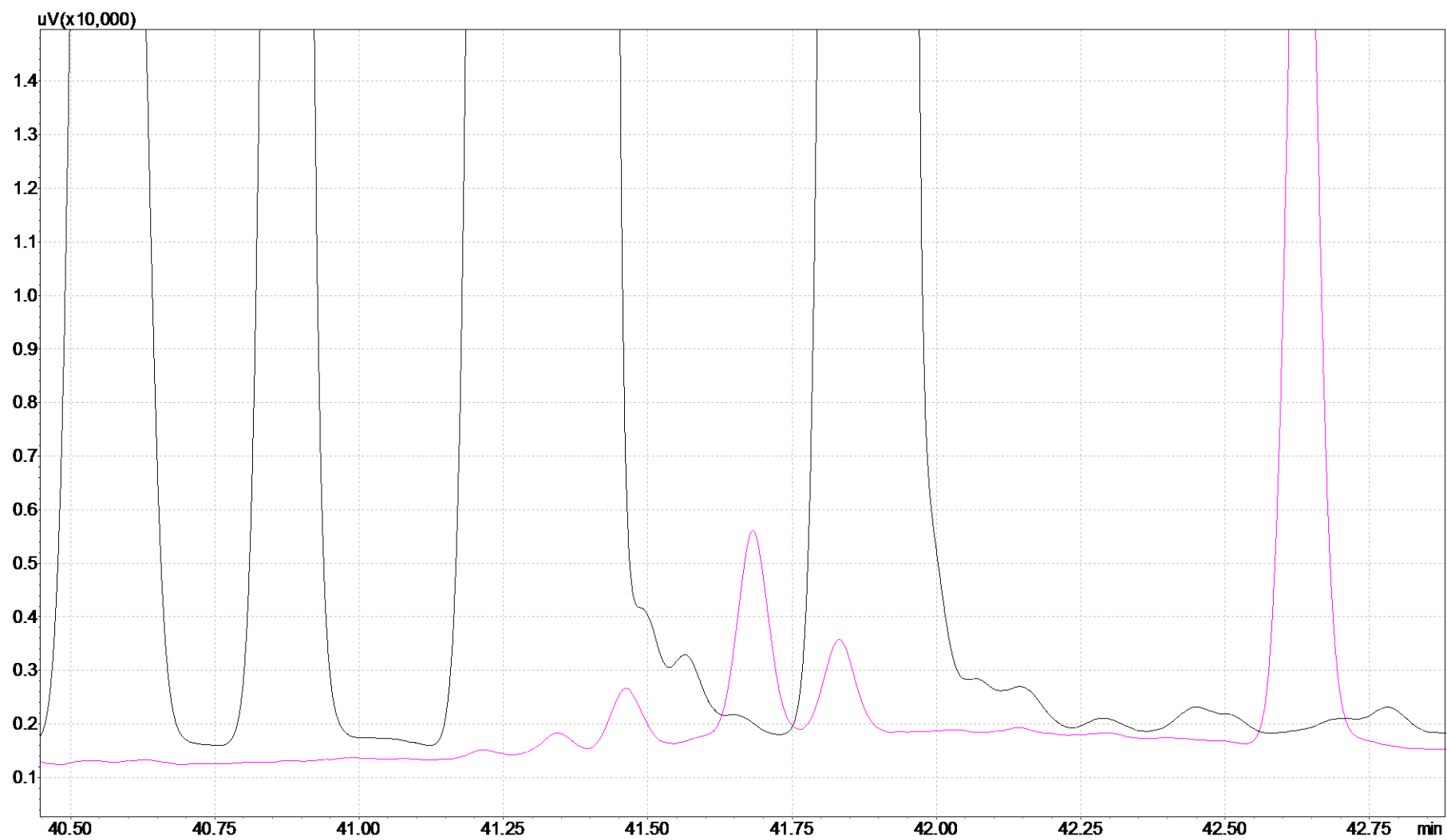
Composto: Palmitoleato de metila (C_{16:1})



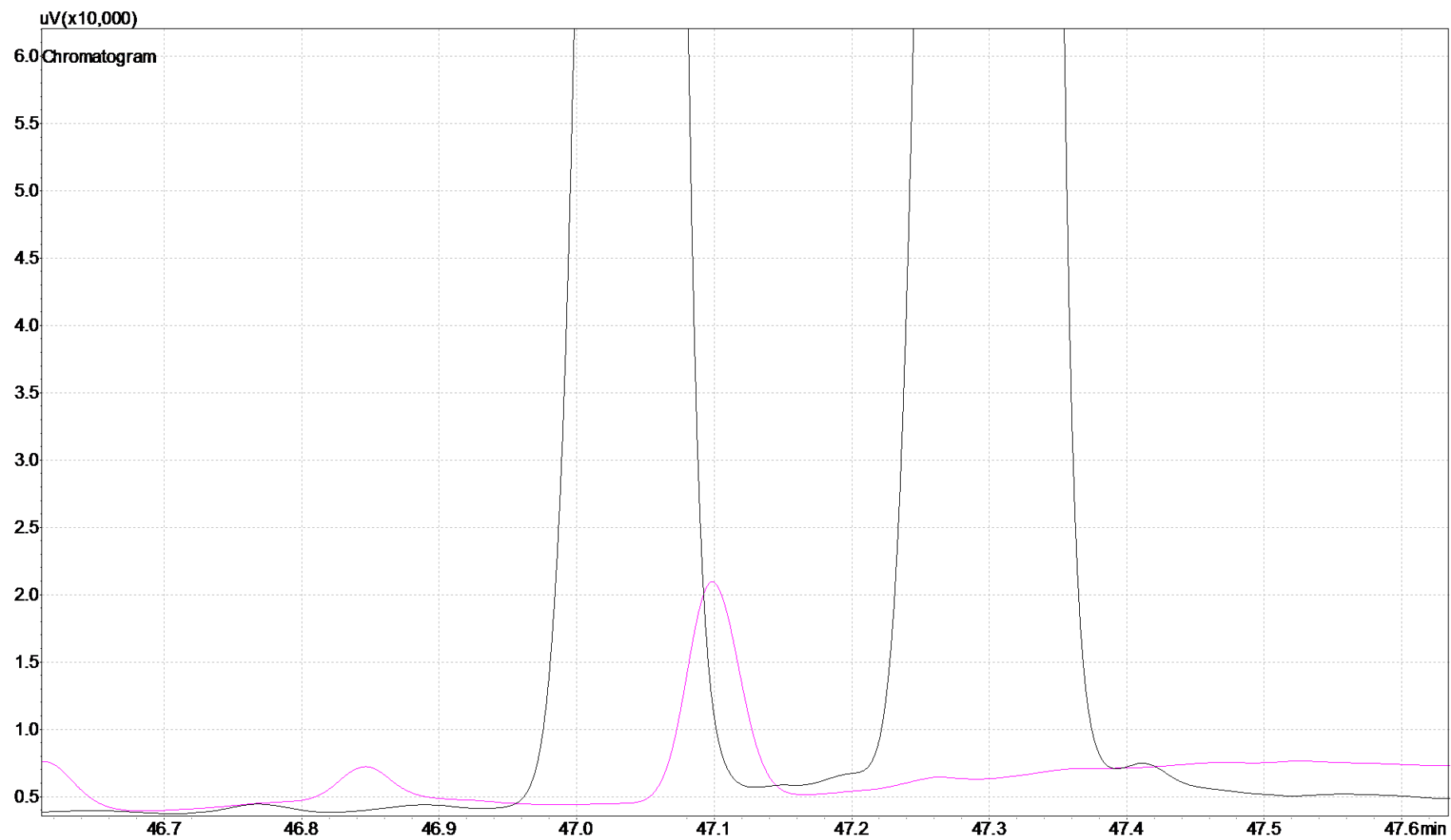
Composto: Oleato de metila ($C_{18:1n9c}$) / Composto: Linoleato de metila ($C_{18:2n6c}$)



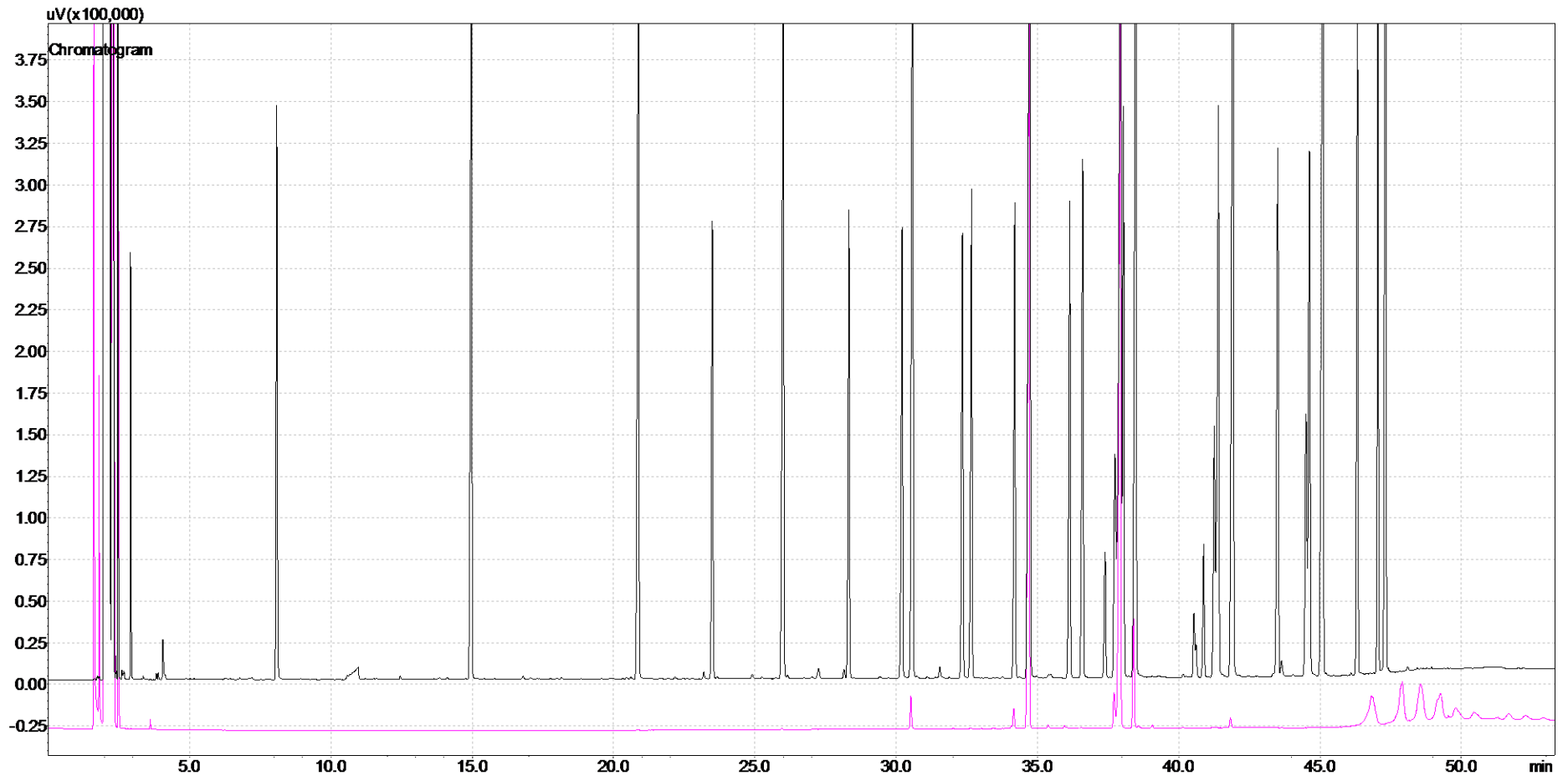
Composto: Heneicosanoato de metila (C_{21:0}) / Composto: cis - 11,14 - eicosadienoato de metila (C_{20:2})



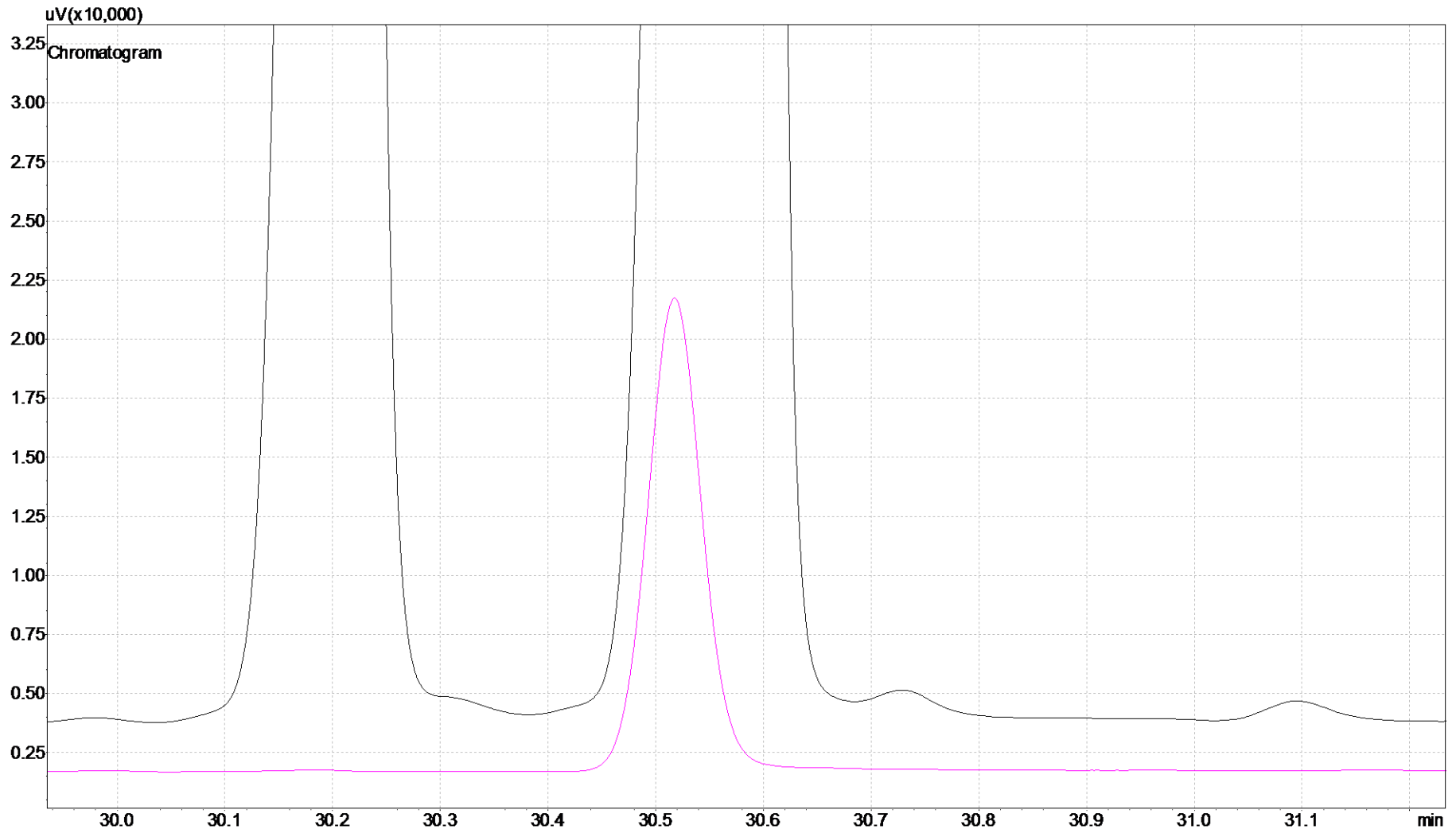
Composto: Tricosanoato de metila (C_{23:0})



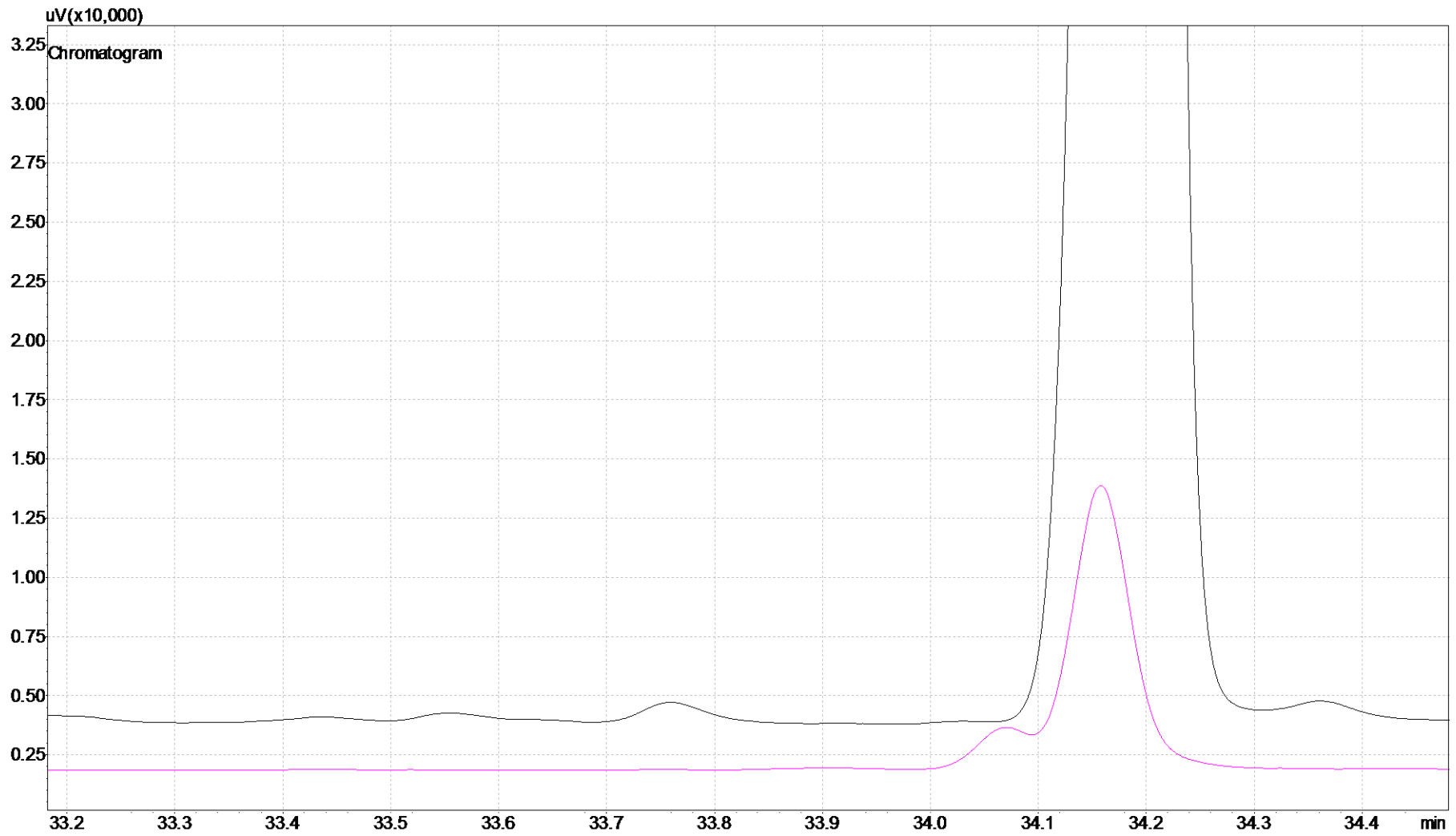
Extrato interno macho transesterificado



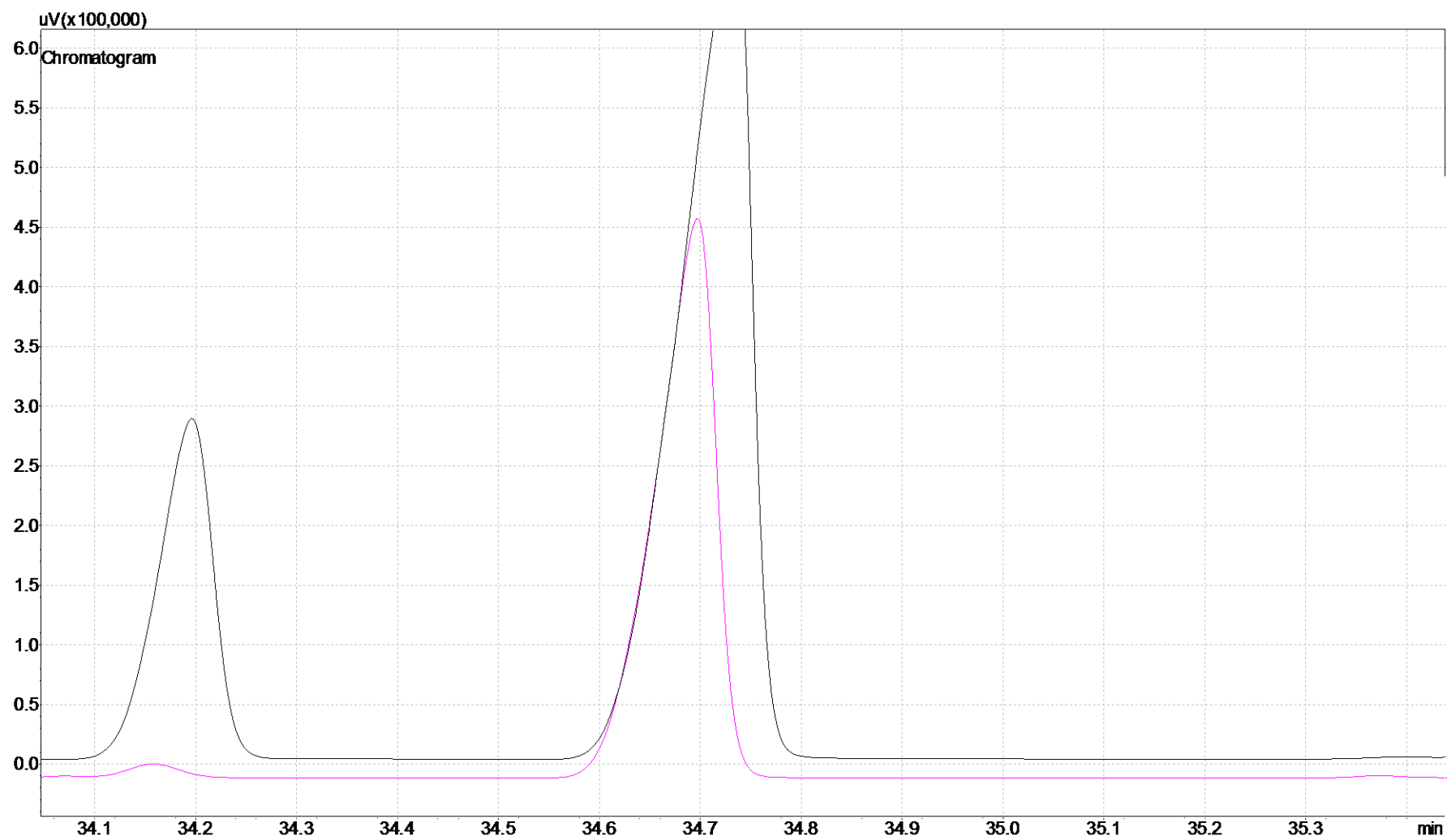
Composto: Miristoleado de metila (c14:1)



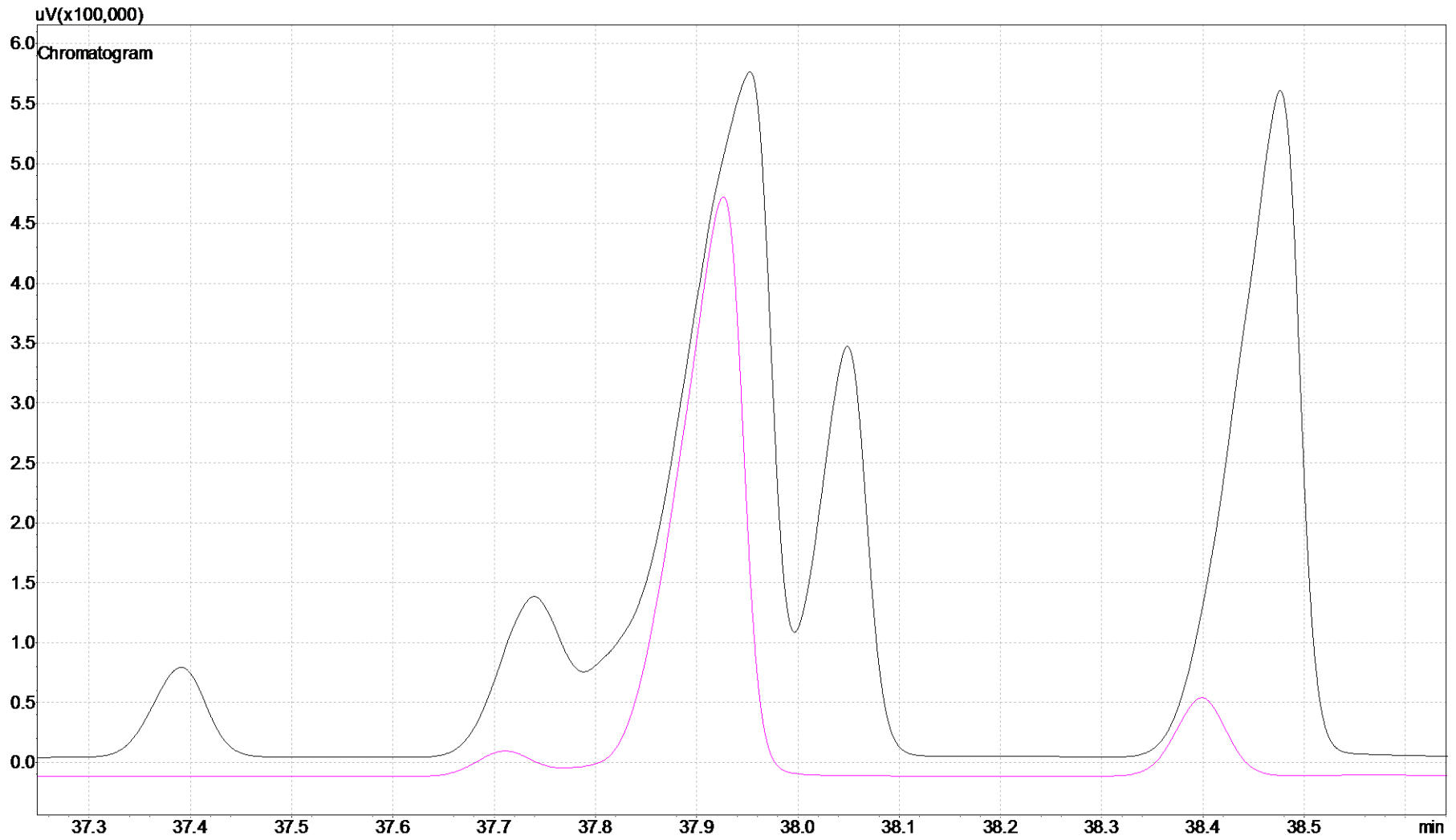
Composto: Palmitato de metila (C_{16:0})



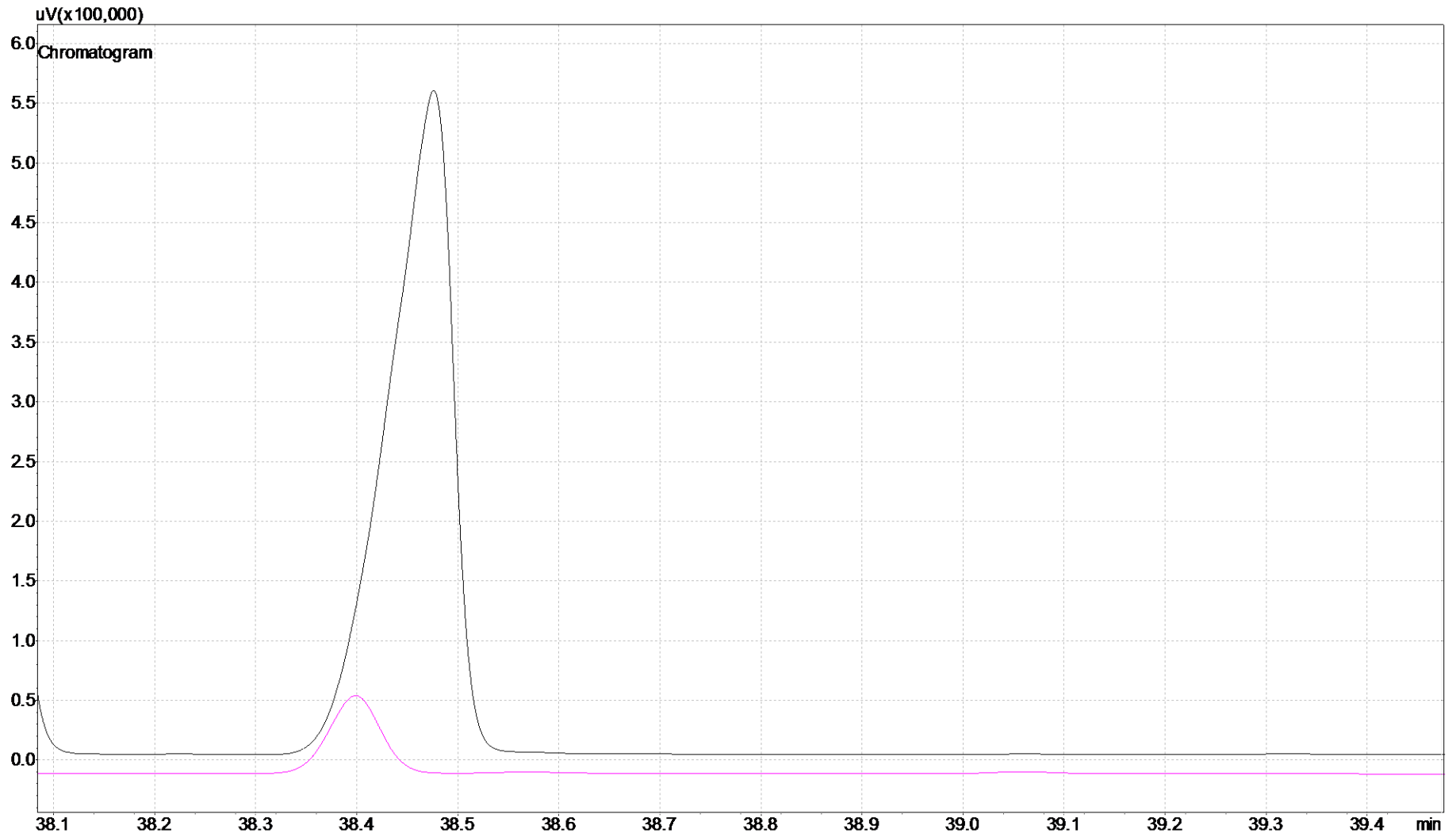
Composto: Palmitoleato de metila (C_{16:1})



Composto: Oleato de metila (C_{18:1n9c})



Composto: Linoleato de metila ($C_{18:2n6c}$)



Composto: cis - 11,14 - eicosadienoato de metila (C_{20:2})

