



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular

**SILENCIAMENTO GÊNICO DO GENE *notch* PARA CONTROLE DO
BICHO-MINEIRO-DO-CAFEIEIRO *Leucoptera coffeella* (LEPIDOPTERA:
LYONETIIDAE) POR dsRNA DE USO TÓPICO**

ALUNO: Erick Santos Lustosa de Queiroz

Orientadora: Prof.^a: Dra. Andrea Queiroz Maranhão

Coorientadora: Dra. Érika Valéria Saliba Albuquerque

BRASÍLIA - DF

Dezembro/2025



ERICK SANTOS LUSTOSA DE QUEIROZ

**Silenciamento gênico do gene *notch* para controle do bicho-mineiro-do-cafeeiro
Leucoptera coffeella (Lepidoptera: Lyonetiidae) por dsRNA de uso tópico**

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular.

Orientadora: Prof.^a: Dra. Andrea Queiroz Maranhão

Coorientadora: Dra. Érika Valéria Saliba Albuquerque

BRASÍLIA - DF

Dezembro/2025

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: Erick Santos Lustosa de Queiroz

Título: Silenciamento gênico do gene *notch* para controle do bicho-mineiro-do-cafeeiro *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) por dsRNA de uso tópico

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular.

Aprovado em __/__/____

Banca Examinadora

Prof Dr.: Daniel Mendes Pereira Ardisson de Araújo

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Dr.: Felipe Rodrigues da Silva

Instituição: Embrapa Agricultura Digital

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Suplente Dra. Isabel Garcia Sousa

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: _____

Assinatura: _____

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

QUEIROZ, E. S. L. de. **Silenciamento gênico do gene *notch* para controle do bicho-mineiro-do-cafeeiro *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) por dsRNA de uso tópico.** Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2025.

Documento formal, autorizando reprodução do presente trabalho para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos. O autor e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais de publicação. Nenhuma parte desta dissertação pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

QUEIROZ, E. S. L. de. Silenciamento gênico do gene *notch* para controle do bicho-mineiro-do-cafeeiro *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) por dsRNA de uso tópico. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2025

*Aos meus pais, familiares, namorada e amigos,
dedico este trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Francisco Erineudo de Queiroz e Alcinéia Santos Lustosa de Queiroz, bem como os demais familiares por estarem ao meu lado durante toda a minha vida, apoiando os meus sonhos, me ensinando a viver a vida de forma correta, com amor e cuidado, além de me guiarem para que eu conseguisse chegar onde estou atualmente.

Aos meus filhotes Mel, Bartolomeu e Luna por me ensinarem muito sobre o valor da vida e a importância do cuidado mesmo sem dizer uma única palavra.

À minha coorientadora Érika Valeria Saliba Albuquerque Freire por abrir portas para seguir meus sonhos na minha carreira, bem como por todo o conhecimento e suporte para a execução deste trabalho.

À professora orientadora Andrea Queiroz Maranhão por me auxiliar na busca pelo título de mestre e por ser uma guia na carreira acadêmica, bem como por todo o apoio nessa pesquisa.

Aos pesquisadores André Southernman Teixeira Irsigler, Luciano Paulino da Silva e Natalia Martins por toda a contribuição na execução experimental deste trabalho e por todos os ensinamentos.

Aos amigos Leonardo Serrazine, Danielly Pereira, Caio Augusto, Samuel Barreto, Thiago William, Luis Rocha, Rebeca Xavier, Rayssa Rebeca, Pedro Eduardo, Victor Henrique, Caterynne Kauffmann e Bruno Arcanjo pela amizade e apoio.

Aos amigos de laboratório Águeda Tavares, Leonardo Vidal, Eliza Bellard, Aline Arrorellas, Mariana Alves, Pedro Fuscaldi, Gabriel Borges, Lucca Simões, Caroline Torres, Gabriela Vieira, Camila Vilarinho, Nayara Lessa, Elaine Barbosa e Enzo Mendes pelo apoio, parceria, confraternizações e cafês durante todos esses anos.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por toda a infraestrutura que permitiu a execução dos experimentos presentes neste trabalho.

Ao Consórcio Pesquisa Café pelo financiamento de bolsa durante a realização do projeto.

À Universidade de Brasília por contribuir na realização do meu sonho.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

SUMÁRIO	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	12
RESUMO	15
ABSTRACT	16
1. REFERENCIAL TEÓRICO	17
1.1 CAFÉ	17
1.2 BICHO-MINEIRO-DO-CAFEIEIRO	19
1.3 BIOPESTICIDA	21
1.4 RNA INTERFERENTE	23
1.5 NANOCARREADORES	27
1.6 GENES DE REFERÊNCIA	29
1.7 GENES ALVO	30
1.8 JUSTIFICATIVA	32
2. OBJETIVOS	34
2.1 GERAL	34
2.2 ESPECÍFICOS	34
3. METODOLOGIA	35
3.1 IDENTIFICAÇÃO DE GENES-ALVO CANDIDATOS AO SILENCIAMENTO GÊNICO DE <i>L. COFFEELLA</i>	35
3.2 ANOTAÇÃO GENÔMICA DE GENES-ALVO PARA SILENCIAMENTO GÊNICO DE INSETOS	35
3.3 CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR	36
3.4 SÍNTESE DE dsRNAs PARA SILENCIAMENTO DO GENE-ALVO	37
3.5 PREPARAÇÃO DA NANOFORMULAÇÃO	37
3.6 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS dsRNAs POR BIOENSAIOS	37
3.6.1 <i>SPRAY-INDUCED GENE SILENCING (SIGs)</i>	38
3.6.2 INFILTRAÇÃO FOLIAR	39
3.6.3 <i>SOAKING</i>	39
4. RESULTADOS	41
4.1 IDENTIFICAÇÃO E ANOTAÇÃO GENÔMICA DOS GENES-ALVO EM <i>L. COFFEELLA</i>	41
4.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA <i>IN SILICO</i> DOS GENES-ALVO (<i>L. COFFEELLA</i>)	42
4.3 PERFIL DE EXPRESSÃO CONSTITUTIVA DOS GENES-ALVO	43
4.4 SÍNTESE DO dsRNA DO GENE <i>NOTCH</i>	45
4.5 EFEITOS DO SILENCIAMENTO GÊNICO POR dsRNA EM BIOENSAIOS	46
4.6 AVALIAÇÃO MOLECULAR DO SILENCIAMENTO GÊNICO DO GENE <i>NOTCH</i> POR RT-qPCR	51
5. DISCUSSÃO	54
5.1 O GENE <i>NOTCH</i> COMO ALVO LETAL: ANÁLISE DO PERFIL CONSTITUTIVO E POTENCIAL COMO ALVO	54
5.2 EFICÁCIA FENOTÍPICA E O PAPEL DA NANOFORMULAÇÃO	54

5.3 CONEXÃO ENTRE EFEITO FENOTÍPICO E MECANISMO MOLECULAR	55
5.4 PERSPECTIVAS E IMPLICAÇÕES	55
BIBLIOGRAFIA	57

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Mapa do território brasileiro indicando os estados produtores de café (amarelo) e o bioma Cerrado delimitado em verde (Dantas, 2021). 18
- Figura 2 – Estados do Brasil com incidência de *Leucoptera coffeella* (pontos vermelhos). Rondônia (RO), Mato Grosso (MT), Pará (PA), Goiás (GO), Distrito Federal (DF), Bahia (BA), Minas Gerais (MG), Espírito Santo (ES), São Paulo (SP), Rio de Janeiro (RJ), Paraná (PR), Santa Catarina (SC) (Motta, 2021). 20
- Figura 3 – Representação gráfica dos principais genes na via de processamento de dsRNA exógeno envolvidos na formação de siRNA para silenciamento gênico. Estruturas previstas pelo AlphaFold3 de proteínas-chave de RNAi encontradas em *Leucoptera coffeella*: LcSID1 (ocre), LcDCR2 (magenta), LcLOQ (turquesa), LcR2D2 (verde escuro), LcAGO2 (laranja), LcC3PO (verde claro), LcHEN (azul escuro), todas modeladas a partir do genoma de *L. coffeella*. Representação geral das moléculas de substrato: dsRNA - PDB 1EBQ (multicolorido), siRNA (vermelho), mRNA (azul). (Goldberg, 2025). 25
- Figura 4 – Representação esquemática do protocolo de *Spray-Induced Gene Silencing* (SIGS) em casa de vegetação. O esquema detalha a aplicação dos tratamentos (dsRNA *Naked*, dsRNA Nano, Nano Vazia e H₂O) por meio de aerógrafo em folhas de cafeeiro em plantas inteiras ou em gaiola isolada, e o monitoramento subsequente da oviposição e do desenvolvimento de minas de *L. coffeella*. 38
- Figura 5 – Representação esquemática do protocolo de infiltração foliar para avaliação dos dsRNAs. O esquema ilustra a aplicação de 1 mL da solução de tratamento por injeção próxima às minas ativas em folhas destacadas, mantidas em espuma floral. Inclui a indicação dos pontos de coleta de material biológico (larvas, pupas e adultos) em 24 horas, 96 horas e na emergência de adultos. 39
- Figura 6 – Representação esquemática do bioensaio de soaking em larvas de quarto ínstar (L4) de *L. coffeella*. O esquema representa o processo de incubação das larvas por cinco minutos nas soluções de tratamento e sua subsequente alocação em placas de Petri contendo papel de filtro umedecido e folhas saudáveis, indicando os pontos de coleta para avaliação fenotípica (mortalidade e pupação) em 24 horas e 96 horas. 40
- Figura 7 – Perfil de expressão in silico dos genes candidatos *notch*, *SNF7* e *AChE* em diferentes estágios de desenvolvimento de *Leucoptera coffeella*. O mapa de calor (*heatmap*)

representa a abundância relativa dos transcritos, calculada a partir dos valores de FPKM (*Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads*) obtidos do transcriptoma. As colunas indicam as fases de desenvolvimento (L1-L4: estágios larvais; pupa; macho e fêmea adultos) e as linhas correspondem aos genes avaliados. A escala de cores indica a intensidade da expressão, variando de níveis basais (amarelo/claro) a níveis elevados (vermelho/escuro). 42

Gráfico 1 – Representação gráfica da expressão diferencial do gene *notch* em diferentes estágios de desenvolvimento (L4, pupa, macho e fêmea) do BMC. 44

Figura 8 – Verificação da integridade do dsRNA-*notch* em gel de agarose 1,2%. A amostra foi obtida via transcrição *in vitro* utilizando *template* de pupa de *L. coffeella*. A visualização foi realizada com brometo de etídeo. 45

Gráfico 2 – Taxa de Mortalidade em números absolutos em larvas L4 de *L. coffeella* após 24 horas e 96 horas do bioensaio de *soaking*. 48

Figura 9 – Caracterização fenotípica de larvas L4 de *Leucoptera coffeella* submetidas ao bioensaio de *soaking* para silenciamento do gene *notch*. As imagens ilustram o contraste entre indivíduos viáveis e a letalidade observada nos diferentes grupos experimentais em 96 horas após a exposição. (A) dsRNA naked - larva viva; (B) dsRNA naked - larva morta com deformações; (C) dsRNA nano - larva viva; (D) dsRNA nano - larva morta com deformações; (E) Nanoformulação vazia - larva viva; (F) Nanoformulação vazia - larva morta e seca; (G) H₂O - larva viva; (H) H₂O - larva morta tentando iniciar o processo de formação de pupa. 49

Gráfico 3 – Taxa de mortalidade em números absolutos em larvas L4 de *L. coffeella* em curva de avaliação de 3, 6, 12, 18 e 24 horas após o bioensaio de *soaking*. 51

Gráfico 4 – Representação da taxa de formação de pupas de *L. coffeella* em números absolutos após 24 horas e 96 horas do bioensaio de *soaking*. 52

Gráfico 5 – Representação dos valores de ΔC_t (Ciclo Limiar Normalizado) para as amostras de larvas de *L. coffeella* no bioensaio de *soaking* de curta duração (2 horas) (*Pool* de 10 larvas). 53

Gráfico 6 – Representação dos valores de ΔC_t (Ciclo Limiar Normalizado) para as amostras de larvas de *L. coffeella* coletadas nos tempos de 24 horas e 96 horas do bioensaio de *soaking* (Indivíduos isolados). 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Genes candidatos para silenciamento gênico por dsRNA em *L. coffeella*, suas funções primárias e taxa de silenciamento em organismos alvo. 41

Tabela 2 – *Primers* utilizados para a amplificação dos genes de referência e genes alvo potenciais para silenciamento de *L. coffeella* nas reações de RT-qPCR. Os genes de referência (*EF1B*, *RPL10* e *RPL18*) são destacados em azul, enquanto os genes alvo (*notch*, *AChE* e *SNF7*) são apresentados em laranja. 43

Tabela 3 – *Primers* utilizados para a síntese *in vitro* do dsRNA do gene *notch* de *L. coffeella*. Os *primers forward* e *reverse* incluem a sequência promotora T7 (TAATACGACTCACTATAGGG) em suas extremidades. 46

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>AChE</i>	Acetilcolinesterase
AGO2	Argonaute-2
BMC	Bicho-mineiro-do-cafeeiro
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar (<i>complementary</i> DNA)
CPP	Peptídeo de Penetração Celular
Ct	Ciclo Limiar (<i>Cycle Threshold</i>)
C3PO	<i>Component 3 Promoter of</i> RISC
DCR2	Dicer-2
dsRNA	RNA de Fita Dupla (<i>Double-stranded</i> RNA)
EF1B	Fator de Elongação 1 Beta (Elongation factor 1 beta)
ESCRT-III	<i>Endosomal sorting complex required for transport-III</i>
et al	e outros (<i>et alia</i>)
FPKM	<i>Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads</i>
GFP	Proteína Fluorescente Verde (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
GO	Ontologia Gênica (<i>Gene Ontology</i>)
ha	hectare
HEN1	<i>Double-stranded RNA binding protein-related</i>
HIGS <i>Silencing</i>)	Silenciamento Gênico Induzido por Hospedeiro (<i>Host-Induced Gene</i>
Lc	<i>Leucoptera coffeella</i>
LOQS-PD	Loquacious
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MIP	Manejo Integrado de Pragas
mL	Mililitro
mRNA	RNA mensageiro
NICD	<i>Notch Intracellular Domain</i>
NTO	Organismo Não-Alvo (Non-Target Organism)
N ₂	Gás Nitrogênio
pb	Par de Bases
pH	Potencial Hidrogeniônico
PEG	Polietilenoglicol
PGK	<i>Phosphoglycerate kinase</i>
PIP	<i>Plant-Incorporated Protectants</i>
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (<i>Quantitative PCR</i>)
RISC	<i>RNA-induced Silencing Complex</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAi	Interferência por RNA (<i>RNA interference</i>)
RPL10	Proteína Ribossomal L10 (<i>Ribosomal Protein L10</i>)
RPL18	Proteína Ribossomal L18 (<i>Ribosomal Protein L18</i>)
RPS3	Proteína Ribossomal S3 (<i>Ribosomal Protein S3</i>)
RT-qPCR	PCR Quantitativa com Transcrição Reversa
scs	Sacas
SID1	<i>Systemic RNA Interference Deficient-1</i>

SIGS	Silenciamento Gênico Induzido por Pulverização (<i>Spray-Induced Gene Silencing</i>)
siRNA	RNA de interferência pequeno (<i>small interfering RNA</i>)
SNF7	Proteína de Classificação Vacuolar (<i>Vacuolar-sorting protein</i>)
SPc	Policátion Estelar (<i>Star Polycation</i>)
ssp	Subespécie
TPP	Tripolifosfato de Sódio
UV	Ultravioleta
μL	Microlitro
μM	Micromolar
°C	Graus Celsius

RESUMO

O café (*Coffea spp.*) é uma das principais *commodities* agrícolas globais, mas sua produtividade é severamente limitada pela infestação do bicho-mineiro-do-cafeeiro (*Leucoptera coffeella*). O controle químico tradicional demonstra eficácia decrescente devido à resistência da praga a inseticidas como piretróides e neonicotinóides. Diante desse desafio, a tecnologia de interferência por RNA (RNAi) emerge como uma fronteira biotecnológica promissora, oferecendo alta especificidade para o silenciamento de genes essenciais por meio da aplicação tópica de dsRNA (SIGS - *Spray-Induced Gene Silencing*). Este trabalho teve como objetivo identificar e avaliar o potencial genes candidatos a ativos biotecnológicos para o desenvolvimento de um bioinseticida de dsRNA de uso tópico. Por meio de análises *in silico* e revisões de literatura, selecionaram-se os genes *notch*, *SNF7* e *AChE*. O gene *notch* (Neurogenic locus Notch protein) foi central, sendo identificado como de cópia única e conservado em *L. coffeella*. A caracterização da expressão gênica por RT-qPCR confirmou que o gene *notch* é constitutivo, expressando-se em todos os estágios analisados (L4, pupa, macho e fêmea), com picos proeminentes na fase de pupa. Para otimizar a entrega do dsRNA, superando a degradação por nucleases característica dos lepidópteros, foram produzidas nanopartículas de quitosana. Os bioensaios de *soaking* em larvas de quarto ínstar (L4) compararam o dsRNA não nanoformulado (*naked*) com o dsRNA nanoformulado (dsRNA nano) e seus controles. Os resultados fenotípicos revelaram que a formulação dsRNA Nano demonstrou letalidade superior, com 14 indivíduos mortos em 24 horas, em comparação com 8 mortos no grupo dsRNA *naked*. Além disso, o dsRNA Nano exibiu a menor taxa de formação de pupas em 96 horas, indicando uma ruptura significativa no desenvolvimento e metamorfose. A quantificação de transcritos, realizada em amostras coletadas apenas 2 horas após o *soaking*, confirmou que o dsRNA Nano alcançou a maior redução nos níveis de transcritos do gene *notch*. Em conclusão, este estudo corrobora o gene *notch* como um alvo letal promissor e estabelece a importância crítica da nanoformulação para a eficácia do dsRNA de uso tópico no controle de *L. coffeella*.

Palavras-chave: *Leucoptera coffeella*; RNAi; dsRNA; Silenciamento Gênico; Nanocarreadores; Gene *notch*; Bicho-mineiro-do-cafeeiro.

ABSTRACT

Coffee (*Coffea spp.*) is a major global agricultural commodity, however its productivity is severely limited by the infestation of the Coffee Leaf Miner (*Leucoptera coffeella*). Traditional chemical control is decreasing in effectiveness due to pest resistance to insecticides like pyrethroids and neonicotinoids. Faced with this challenge, RNA interference (RNAi) technology emerges as a promising biotechnological frontier, offering high specificity for silencing essential genes via the topical application of dsRNA (SIGS - Spray-Induced Gene Silencing). This study aimed to identify and evaluate the potential of candidate genes as biotechnological assets for the development of a topical dsRNA bioinsecticide. Through *in silico* analyses and literature reviews, the *notch*, *SNF7*, and *AChE* genes were selected. The *notch* gene (Neurogenic locus Notch protein) was central, identified as single-copy and conserved in *L. coffeella*. Characterization of gene expression by RT-qPCR confirmed that the *notch* gene is constitutive, being expressed in all stages analyzed (L4, pupa, male and female), with prominent peaks in the pupal stage. To optimize dsRNA delivery, overcoming the degradation by nucleases characteristic of lepidopterans, chitosan nanoparticles were produced. Soaking bioassays in fourth-instar larvae (L4) compared non formulated dsRNA (dsRNA Naked) with the nanoformulated dsRNA (dsRNA Nano) and their respective controls. Phenotypic results revealed that the dsRNA Nano formulation demonstrated superior lethality, with L4 individuals dead within 24 hours, compared to 8 dead in the dsRNA Naked group. Furthermore, dsRNA Nano exhibited the lowest pupal formation rate at 96 hours, indicating a significant disruption in development and metamorphosis. Transcript quantification, performed on samples collected just 2 hours after soaking, confirmed that dsRNA Nano achieved the greatest reduction in transcript levels of the *notch* gene. In conclusion, this study corroborates the *notch* gene as a promising lethal target and establishes the critical importance of nanoformulation for the efficacy of topical dsRNA in controlling *L. coffeella*.

Keywords: *Leucoptera coffeella*; RNAi; dsRNA; Gene Silencing; Nanocarriers; *notch* Gene; Coffee Leaf Miner.

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 CAFÉ

O café (*Coffea* spp.) consolida-se como uma das principais commodities agrícolas em escala global, desempenhando um papel socioeconômico de elevada complexidade e amplitude. A relevância do setor para a economia brasileira é marcada pela geração de divisas significativas, sendo um pilar financeiro fundamental para o país. Além disso, a cadeia produtiva no Brasil abrange mais de 300 mil propriedades, reforçando seu impacto social no setor rural (Matiello, 2015).

A cafeicultura brasileira apresenta uma expressiva abrangência territorial, com a produção consolidada primordialmente nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e Bahia, assegurando a hegemonia do país no mercado global (Dantas, 2021). Em Minas Gerais, maior produtor nacional, a safra de 2025 reflete os efeitos intrínsecos da bienalidade negativa e de adversidades climáticas, enquanto o Espírito Santo se firma como o principal polo de café conilon, respondendo por cerca de 69% da produção nacional desta espécie (Conab, 2025). Nesse cenário geoeconômico, o bioma Cerrado desempenha um papel estratégico e transformador, pois sua topografia plana favorece a adoção de sistemas altamente mecanizados, ao passo que sua dinâmica climática de invernos secos é fundamental para o escalonamento da colheita e a obtenção de grãos de elevada qualidade sensorial (Dantas, 2021; Matiello, 2015). A configuração espacial dessas regiões produtoras e a centralidade do Cerrado na sustentação do parque cafeeiro contemporâneo encontram-se ilustradas na Figura 1.

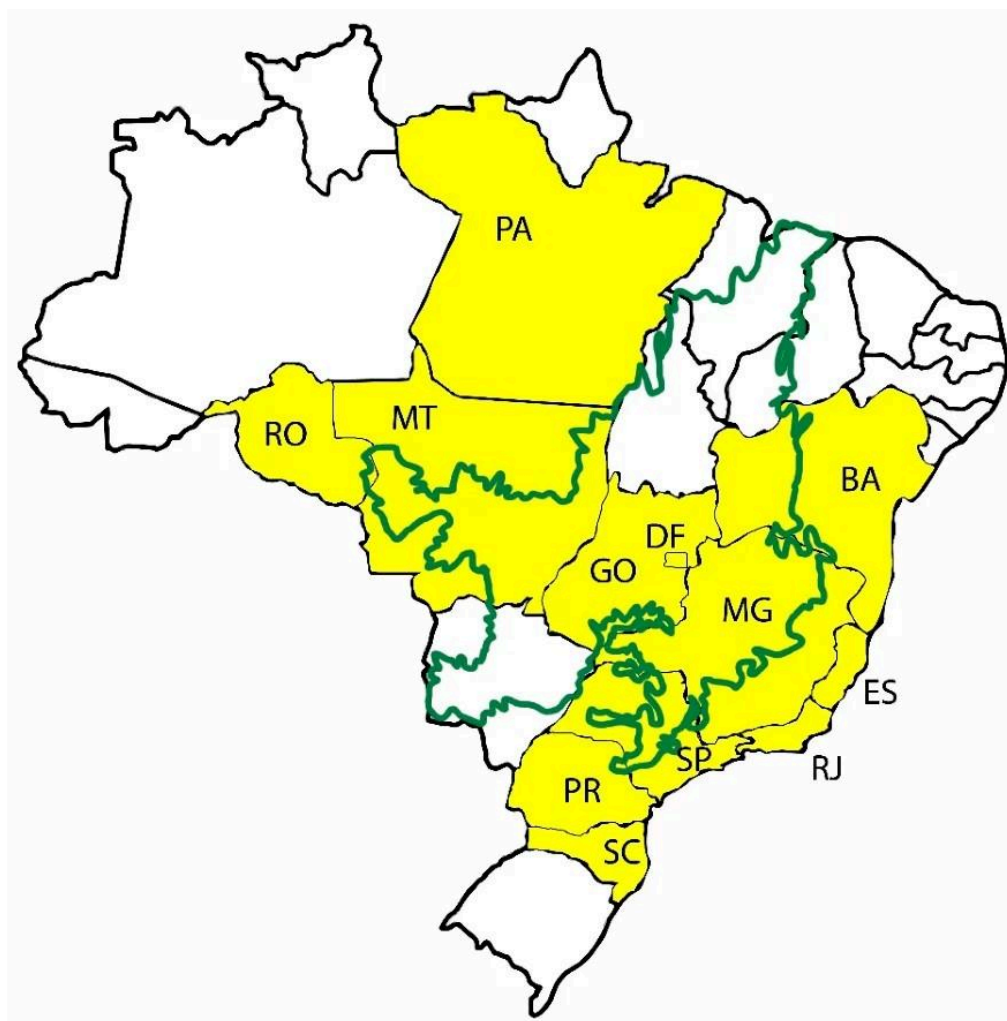


Figura 1: Mapa do território brasileiro indicando os estados produtores de café (amarelo) e o bioma Cerrado delimitado em verde (Dantas, 2021).

Do ponto de vista produtivo, a cafeicultura é caracterizada pela bienalidade, que afeta o volume colhido. Para a safra de 2025, o total de café beneficiado no Brasil foi estimado em 55,2 milhões de sacas, indicando um crescimento de 1,8% em relação à safra anterior. Esta produção divide-se em duas espécies predominantes: o café arábica (*Coffea arabica* L.), com uma projeção de 35,15 milhões de sacas, e o conilon (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner), com uma estimativa de 20,1 milhões de sacas. A produtividade média nacional prevista é de 29,7 sacas por hectare (scs/ha) (ABIC, 2025; Conab, 2025).

No que tange à taxonomia e filogenia, o cafeeiro está inserido no gênero *Coffea*, pertencente à família Rubiaceae. Deste gênero, apenas o *C. arabica* e o *C. canephora* são cultivados em grande escala, respondendo por quase a totalidade do comércio mundial de café. O *C. arabica* tem sua origem nas regiões de maior altitude da Etiópia. Em termos genéticos, é uma espécie alotetraploide, apresentando $2n = 44$ cromossomos. Por outro lado, o

C. canephora (conilon/robusta) é uma espécie diploide, com $2n = 22$ cromossomos (Lashermes, 1999; Matiello, 2015).

Morfologicamente, o cafeeiro é classificado como uma planta de porte arbustivo ou arbóreo. O seu sistema radicular é volumoso e profundo, sendo que a sua constituição e desenvolvimento são influenciados pelas características edáficas. Um sistema radicular robusto é especialmente vital para a tolerância a déficits hídricos, característica notável no café conilon. O crescimento dos ramos é dimórfico, com ramos ortotrópicos que formam a haste principal e ramos plagiotrópicos que são os produtivos. O tronco do cafeeiro apresenta ramificações laterais que são responsáveis pela absorção de nutrientes (Matiello, 2015).

1.2 BICHO-MINEIRO-DO-CAFEEIRO

A produção de café, apesar de sua grande importância econômica, enfrenta desafios fitossanitários significativos, como o ataque de pragas e doenças. Entre as pragas de maior impacto, o bicho-mineiro-do-cafeeiro (*Leucoptera coffeella* Guérin-Méneville, 1842) destaca-se como o principal fator biótico limitante para a cultura em diversas regiões neotropicais. Originário do continente africano e registrado pela primeira vez no hemisfério ocidental nas Antilhas em meados do século XIX, este microlepidóptero adquiriu status de praga cosmopolita, dispersando-se pelas regiões cafeeicultoras da África, Ásia e, proeminentemente, pela América do Sul (Dantas et al, 2021). No território brasileiro, a introdução do *L. coffeella* remonta ao século XIX, consolidando-se como uma praga-chave onipresente em praticamente todas as zonas de cultivo, com destaque para a sua elevada pressão de infestação no bioma Cerrado (Dantas et al, 2021). A amplitude geográfica desta dispersão no país abrange desde a Região Norte até o Sul, refletindo a notável adaptabilidade do inseto às variadas condições edafoclimáticas das unidades federativas produtoras, conforme ilustrado na Figura 2.

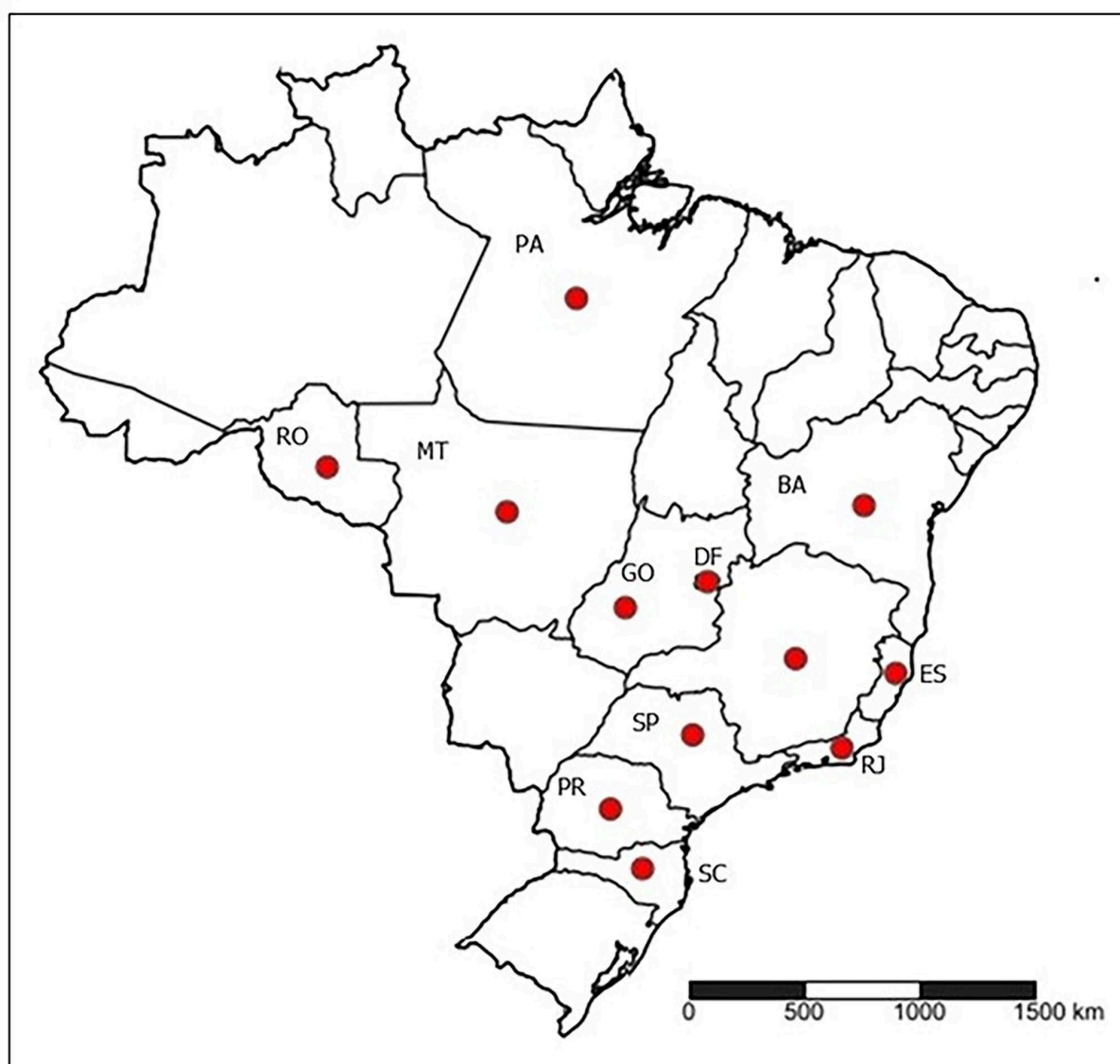


Figura 2: Estados do Brasil com incidência de *Leucoptera coffeella* (pontos vermelhos). Rondônia (RO), Mato Grosso (MT), Pará (PA), Goiás (GO), Distrito Federal (DF), Bahia (BA), Minas Gerais (MG), Espírito Santo (ES), São Paulo (SP), Rio de Janeiro (RJ), Paraná (PR), Santa Catarina (SC) (Motta, 2021).

Esse microlepidóptero, pertencente à família Lyonetiidae, causa danos diretos nas folhas da planta, pois suas larvas se alimentam do parênquima foliar, criando galerias características que, popularmente, são chamadas de "minas" (Dantas et al., 2021). Essas lesões reduzem a área fotossintética, comprometendo o desenvolvimento da planta e podendo resultar em perdas de produtividade de até 70% em infestações severas (Dantas et al., 2021). No Brasil, o controle dessa praga tem se tornado cada vez mais complexo devido ao surgimento de resistência a inseticidas amplamente utilizados, como piretróides e neonicotinóides (Lucena-Leandro et al., 2022).

Diante da ineficácia crescente do controle químico, a busca por alternativas de manejo sustentável tem se intensificado. O controle biológico, por meio de inimigos naturais, é um dos pilares do Manejo Integrado de Pragas (MIP) e tem se mostrado eficaz na regulação das populações do bicho-mineiro-do-cafeeiro. De acordo com a literatura, a diversidade de insetos parasitoides, especialmente os da ordem Hymenoptera, contribui para reduzir a infestação da praga em cafezais (Marques et al., 2022). A presença de predadores, como larvas de crisopídeos (*Chrysoperla spp.*), também desempenha um papel importante na dinâmica populacional de *L. coffeella* (da Silva et al., 2024).

Além do controle biológico, a utilização de biopesticidas de origem botânica, como o óleo de neem, píretro, sabadilla e outros extratos botânicos têm demonstrado alta eficácia contra as diferentes fases de desenvolvimento da praga (Dantas et al., 2021). Esses produtos oferecem uma alternativa mais segura e com menor impacto ambiental em comparação aos inseticidas sintéticos, sendo particularmente vantajosos para a produção de café orgânico. Buscando-se uma abordagem emergente, o desenvolvimento de novas tecnologias, como o uso de RNA de interferência (RNAi), demonstra ser um avanço promissor. A recente caracterização do genoma e do maquinário de RNAi de *L. coffeella* fornece a base necessária para o desenvolvimento de biopesticidas moleculares que podem silenciar genes essenciais da praga, representando uma nova e duradoura estratégia de controle (Martins et al., 2022).

1.3 BIOPESTICIDA

A aplicação de biopesticidas fundamentados na tecnologia de interferência por RNA (RNAi) constitui uma fronteira inovadora e promissora para o manejo sustentável de pragas agrícolas (Dias, 2020). Esta abordagem biotecnológica explora um mecanismo endógeno e conservado na maioria dos organismos eucariontes, no qual moléculas de dsRNA exógenas desencadeiam o silenciamento específico de genes-alvo no organismo-praga, levando a efeitos deletérios como a interrupção do desenvolvimento ou a mortalidade (Niu, 2018).

A notável especificidade desta tecnologia, que depende da identidade de sequência entre o dsRNA e o mRNA alvo, permite o desenvolvimento de inseticidas espécie-específicos, minimizando os efeitos sobre organismos não-alvo (NTOs) e o impacto ambiental (Mendoza-Alatorre, 2025). Historicamente, a comprovação da eficácia da RNAi através da ingestão de dsRNA no nematoide *Caenorhabditis elegans* (Fire et al., 1998) e, posteriormente, em insetos-praga como o besouro-da-batata (*Leptinotarsa decemlineata* Say, 1824) (Rodrigues et al., 2021) e a lagarta-do-cartucho (*Helicoverpa armigera* Hubner, 1808)

(Asokan et al., 2013; Asokan et al., 2014), pavimentou o caminho para sua utilização em campo. Esta pode ocorrer tanto por meio de plantas geneticamente modificadas que expressam o dsRNA (PIPs – *Plant-Incorporated Protectants*) (Camargo et al., 2016; Zotti et al., 2018; Ortolá & Daròs, 2024), como pela aplicação exógena de formulações contendo dsRNA, uma estratégia conhecida como SIGS (*Spray-Induced Gene Silencing*) (Lucena-Leandro et al., 2022).

A aplicação exógena de biopesticidas de dsRNA, seja por pulverização foliar, irrigação radicular ou injeção no tronco, emerge como uma alternativa particularmente atrativa às culturas transgênicas, especialmente devido a um menor ônus regulatório e à maior flexibilidade de uso em diferentes culturas (Zotti et al., 2017; Lucena-Leandro et al., 2022; Mendoza-Alatorre et al., 2025). O sucesso desta abordagem depende criticamente da estabilidade e da entrega eficaz do dsRNA ao inseto-alvo (Christiaens et al., 2020). Moléculas de dsRNA nuas (*naked*), ou desprotegidas, são suscetíveis à degradação por fatores abióticos, como a radiação UV, e bióticos, como nucleases presentes no ambiente e no trato digestivo de insetos (Christiaens et al., 2020; Zotti et al., 2017; Mitter et al., 2017; Yang et al., 2022). A rápida degradação por nucleases salivares, intestinais ou na hemolinfa é uma barreira significativa, especialmente em ordens como Lepidoptera, que exibem uma atividade nucleolítica robusta e um pH intestinal extremamente alcalino (Lucena-Leandro et al., 2022). Para superar essas barreiras, o desenvolvimento de formulações com nanocarreadores tornou-se um campo de intensa investigação. Polímeros catiônicos como a quitosana (Vogel et al., 2019) e polímeros guanilados (Christiaens et al., 2018), lipossomas (Christiaens et al., 2020), peptídeos (Yang et al., 2022) e nanopartículas de argila (BioClay) (Mitter et al., 2017) demonstraram proteger o dsRNA da degradação, além de facilitar sua absorção celular e persistência no ambiente.

A eficácia do RNAi como ferramenta de controle de pragas foi demonstrada em uma ampla gama de insetos neotropicais e de importância global, incluindo espécies das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Hemiptera e Diptera (Dias et al., 2020; Zotti et al., 2017; Mendoza-Alatorre et al., 2025; Huvenne & Smagghe, 2010; Lucena-Leandro et al., 2022). Estudos com a lagarta-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917), por exemplo, mostraram que a aplicação de dsRNA contra genes essenciais, como a V-ATPase e a Arginina quinase, resultou em aumento da mortalidade larval e redução do dano foliar, tanto pela absorção do dsRNA por folíolos destacados quanto pela sua expressão transitória em plantas (Camargo et al., 2016; Wang et al., 2023). Em *Spodoptera exigua* (Hübner, 1808), uma espécie de

lepidóptero refratária ao RNAi oral, a formulação de dsRNA com polímeros guanilados elevou a mortalidade de 16% (com dsRNA não formulado) para 53% (Christiaens et al., 2018). A seleção de genes-alvo é igualmente crucial, visto que genes envolvidos em processos vitais como desenvolvimento (Chen, 2023; Fabrick et al., 2004), desintoxicação (García et al., 2017; Asokan et al., 2014) e digestão (Asokan et al., 2013; Guan et al., 2017) têm se mostrado alvos eficazes. No entanto, a eficiência do silenciamento pode variar significativamente dependendo do gene, da concentração de dsRNA e da frequência de aplicação (Asokan et al., 2013).

O destino ambiental do dsRNA aplicado exogenamente também é uma consideração regulatória central. Estudos indicam que o dsRNA é rapidamente degradado no solo e na água (Zotti et al., 2017; He et al., 2022), com uma meia-vida de poucas horas a dias (Mendoza-Alatorre et al., 2025), o que sugere um baixo potencial de persistência e acúmulo ambiental. A avaliação de riscos para organismos não-alvo é realizada através de uma abordagem escalonada, começando com testes de dose máxima em espécies indicadoras (Zotti et al., 2017). A resistência a pesticidas é uma preocupação para qualquer nova tecnologia de controle, e mecanismos potenciais de resistência ao RNAi, como mutações no gene-alvo, superexpressão de nucleases ou deficiências na maquinaria de absorção celular, já foram identificados experimentalmente (Rodrigues et al., 2021; Zotti et al., 2017; Dias et al., 2020). A gestão proativa da resistência, incluindo a rotação de alvos gênicos e a combinação com outros modos de ação, será fundamental para a sustentabilidade desta tecnologia (Zotti et al., 2017; Lucena-Leandro et al., 2022). Em suma, a regulamentação dos biopesticidas de dsRNA busca um equilíbrio entre a inovação tecnológica para uma agricultura mais sustentável e a garantia da segurança para o ecossistema e a saúde pública, um processo que continua a evoluir à medida que o conhecimento científico avança.

1.4 RNA INTERFERENTE

A interferência por RNA (RNAi) é um mecanismo natural e altamente conservado em eucariotos, que atua na regulação da expressão gênica e na defesa contra elementos genéticos exógenos, como vírus e transposons (Ortolá, 2024). A descoberta de que este processo pode ser ativado pela introdução de moléculas de RNA de fita dupla (dsRNA) semelhantes a um gene alvo, resultando no seu silenciamento pós-transcricional, revolucionou a genética e abriu inúmeras possibilidades biotecnológicas (Fire, 1998; Mello, 2006). A técnica se tornou uma poderosa ferramenta de genética reversa para a elucidação da função gênica em uma vasta

gama de organismos e, mais recentemente, emergiu como uma estratégia promissora para o controle de pragas agrícolas e vetores de doenças (Zotti, 2017; Dias, 2020; Lucena-Leandro, 2022). Seu modo de ação, baseado na especificidade de sequência, confere uma seletividade única em comparação com os agrotóxicos convencionais, com potencial para desenvolver soluções mais sustentáveis e ambientalmente seguras (He, 2022).

O modo de ação da tecnologia de RNAi, pautado na estrita especificidade de sequência, não apenas a distingue, mas a eleva a um patamar de precisão molecular inacessível aos agrotóxicos convencionais. Enquanto os inseticidas neurotóxicos tradicionais frequentemente exibem um amplo espectro de ação que atinge inadvertidamente táxons não-alvo devido à conservação evolutiva de seus sítios de ligação proteicos, a RNAi explora a identidade de sequência de nucleotídeos, permitindo o delineamento de bioinseticidas espécie-específicos (Asokan, 2014; Vogel, 2019; Ortolá, 2024). Essa seletividade granular possibilita o manejo cirúrgico de pragas economicamente devastadoras, como o bicho-mineiro-do-cafeeiro, mitigando riscos ecotoxicológicos para polinizadores e outros componentes vitais da fauna benéfica (Asokan, 2014). Sob a ótica da sustentabilidade multidimensional, a transitoriedade intrínseca das moléculas de dsRNA nos compartimentos ambientais — caracterizada por uma rápida degradação em solos e matrizes aquáticas — configura uma solução de baixíssima persistência e ausência de bioacumulação, contrastando favoravelmente com a estabilidade química de muitos pesticidas sintéticos (Zotti, 2017). Além disso, a versatilidade da técnica permite sua aplicação como repressora de fatores de resistência, capazes de silenciar genes de desintoxicação metabólica e restaurar a eficácia de outras ferramentas de manejo, o que a torna um pilar estratégico para a sustentabilidade de longo prazo dos agroecossistemas (Zotti, 2017; Dias, 2020). Assim, a tecnologia de RNAi consolida-se como uma promessa biotecnológica única para o desenvolvimento de soluções que conciliam a segurança alimentar global com a preservação rigorosa da integridade ecológica e da saúde pública.

A maquinaria molecular que executa o RNAi é complexa e depende de um conjunto de enzimas e proteínas centrais (Figura 1). O processo inicia-se no citoplasma quando um dsRNA longo, de origem exógena ou endógena, é reconhecido pela endonuclease do tipo RNase III chamada Dicer-2 (DCR2). A DCR2 cliva o dsRNA em fragmentos menores, de aproximadamente 21 a 25 nucleotídeos, conhecidos como pequenos RNAs de interferência (siRNAs). A proteína de ligação a dsRNA Reel 2 Dialog Track 2 (R2D2), em conjunto com a DCR2, facilita o carregamento desses siRNAs no complexo de silenciamento induzido por

RNA (RISC). Dentro do RISC, a proteína Argonauta-2 (AGO2) desempenha um papel catalítico central: ela seleciona uma das fitas do siRNA (a fita guia) e descarta a outra (fita passageira). A fita guia então direciona o complexo RISC para o mRNA alvo que possui uma sequência complementar. Uma vez ligado, a AGO2 cliva o mRNA, levando à sua degradação e, consequentemente, ao silenciamento da expressão do gene. Outras proteínas, como a LOQS-PD (Loquacious), também auxiliam a Dicer-2 no processamento de certos dsRNAs, e o complexo C3PO atua na remoção da fita passageira do siRNA. A metiltransferase HEN1 modifica a extremidade 3' dos siRNAs, protegendo-os da degradação (Vogel, 2019; Ortolá, 2024).

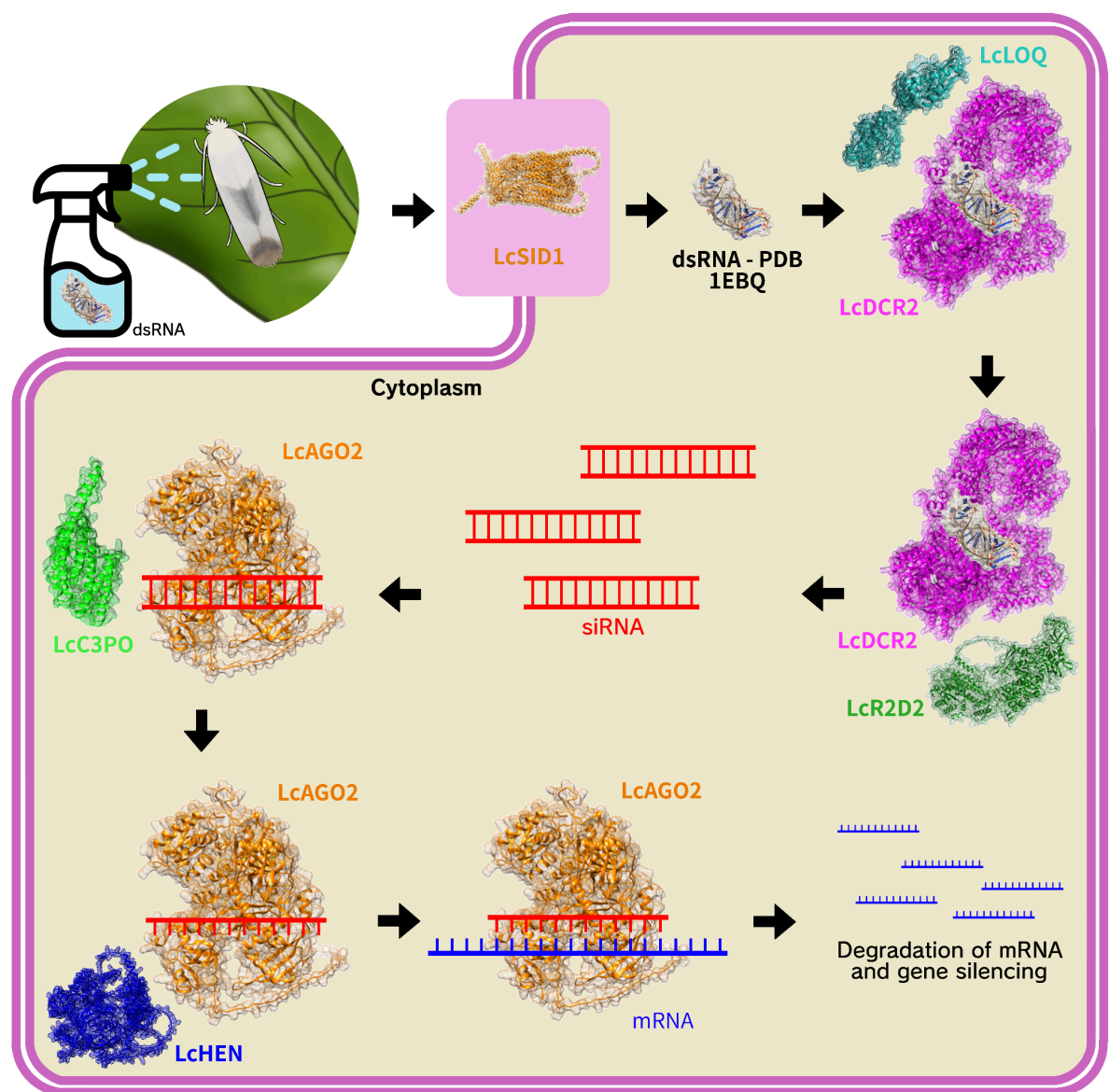


Figura 3: Representação gráfica dos principais genes na via de processamento de dsRNA exógeno envolvidos na formação de siRNA para silenciamento gênico. Estruturas previstas pelo AlphaFold3 de proteínas-chave de RNAi encontradas em *Leucoptera coffeella*: LcSID1 (ocre), LcDCR2 (magenta), LcLOQ (turquesa), LcR2D2 (verde escuro), LcAGO2 (laranja), LcC3PO (verde claro), LcHEN (azul escuro), todas modeladas a partir do

genoma de *L. coffeella*. Representação geral das moléculas de substrato: dsRNA - PDB 1EBQ (multicolorido), siRNA (vermelho), mRNA (azul). (Goldberg, 2025).

Para que o silenciamento gênico seja eficaz em um organismo pluricelular, especialmente quando o dsRNA é administrado oralmente, é necessário que o sinal de RNAi seja transportado entre as células e tecidos, um processo conhecido como RNAi sistêmico. Além disso, a proteína transmembrana SID1 (*Systemic RNA Interference Deficient-1*) atua como um canal que facilita a passagem de dsRNA para o citoplasma, sendo crucial para o RNAi sistêmico em diversos organismos, embora sua presença e função variem entre as ordens de insetos. A eficiência do RNAi é, portanto, dependente não apenas da maquinaria central, mas também da capacidade do organismo de absorver e disseminar o sinal de dsRNA. A degradação do dsRNA por nucleases no trato digestivo e na hemolinfa, por exemplo, é uma barreira significativa que limita a eficácia da técnica em muitas espécies, especialmente em lepidópteros.

A avaliação da eficácia do silenciamento gênico por RNAi é uma etapa crucial para confirmar a eficácia da técnica e correlacioná-la a um fenótipo observável. A metodologia mais sensível e precisa para quantificar a redução nos níveis de transcritos do gene alvo é a reação em cadeia da polimerase quantitativa com transcrição reversa (RT-qPCR). Para garantir a precisão dos resultados, é fundamental realizar a normalização dos dados utilizando genes de referência (também chamados de genes *housekeeping*), cuja expressão seja estável sob as condições experimentais testadas. A caracterização fenotípica subsequente, como a observação de perda de pigmentação ocular, mortalidade aumentada, atraso no desenvolvimento ou redução de peso larval, confirma o sucesso do silenciamento e a função do gene alvo. O uso de um dsRNA não relacionado (como o da proteína fluorescente verde, GFP) como controle negativo é essencial para assegurar que os efeitos observados são específicos da sequência alvo.

A aplicabilidade da tecnologia de RNAi é vasta, estendendo-se desde a pesquisa básica em genômica funcional até aplicações biotecnológicas avançadas, como o controle de pragas agrícolas. A capacidade de silenciar genes essenciais para a sobrevivência ou desenvolvimento de um inseto-praga por meio da ingestão de dsRNA abre a possibilidade de criação de bioinseticidas altamente específicos. Estes "pesticidas de RNA" podem ser aplicados topicamente em plantas (SIGS - *Spray-Induced Gene Silencing*) ou produzidos diretamente por plantas geneticamente modificadas (HIGS - *Host-Induced Gene Silencing*). Estudos demonstraram sucesso no controle de diversas pragas de lepidópteros, como *Plodia*

interpunctella (Hübner, 1813), *T. absoluta* e *Spodoptera litura* (Fabricius, 1775), através da administração oral de dsRNA. A principal vantagem desta abordagem é a sua alta especificidade, que minimiza os efeitos sobre organismos não-alvo, como polinizadores e inimigos naturais, tornando-se uma ferramenta valiosa para o Manejo Integrado de Pragas (MIP). No entanto, a eficiência variável do RNAi, especialmente em lepidópteros, e a necessidade de otimizar a formulação e os métodos de entrega de dsRNA para superar barreiras como a degradação por nucleases, continuam sendo desafios importantes para a sua ampla implementação comercial.

1.5 NANOCARREADORES

A nanotecnologia representa um campo promissor para o avanço das estratégias de controle de pragas, notadamente através do desenvolvimento de nanocarreadores para a entrega de moléculas de RNA de fita dupla (dsRNA), superando barreiras biológicas e ambientais que limitam a eficácia da interferência por RNA (RNAi) (Vogel, 2019; Yang, 2022). Fatores como a degradação por nucleases presentes no trato digestivo dos insetos, condições de pH adversas, e a baixa eficiência de absorção celular constituem obstáculos significativos, especialmente em ordens como Lepidoptera (Lucena-Leandro, 2022). A utilização de nanocarreadores surge, assim, como uma solução viável para proteger o dsRNA e otimizar sua entrega às células-alvo, aumentando a persistência da molécula e a eficácia do silenciamento gênico (Yang, 2022).

Os nanocarreadores utilizados para a entrega de dsRNA são diversificados e incluem polímeros, lipossomas, peptídeos e outras estruturas em escala nanométrica. Polímeros catiônicos, como a quitosana, formam complexos com o dsRNA através de interações eletrostáticas, neutralizando sua carga negativa e condensando-o em partículas que o protegem do ambiente hostil do intestino do inseto. Outros polímeros sintéticos, como os polímeros contendo guanidina e os polycations estelares (SPc), foram desenvolvidos para conferir estabilidade em ambientes de pH extremamente alcalino, característico do trato digestivo de lepidópteros. Lipossomas, vesículas lipídicas que mimetizam a membrana celular, e peptídeos de penetração celular (CPPs) também são empregados para facilitar a translocação do dsRNA para o citoplasma. Essas formulações não apenas protegem a molécula de dsRNA da degradação, mas também podem aumentar a sua absorção celular, superando as barreiras da cutícula, da matriz peritrófica e da membrana celular (Yang, 2022).

Entre as diversas matrizes poliméricas, a quitosana — um polissacarídeo linear derivado da desacetilação da quitina — destaca-se por sua excepcional biodegradabilidade, biocompatibilidade e baixa citotoxicidade (Lucena-Leandro, 2022). A adesão da molécula de dsRNA à matriz de quitosana ocorre predominantemente por meio de interações eletrostáticas, nas quais as cargas positivas dos grupamentos amino ($-NH_2$) presentes no polímero atraem as cargas negativas inerentes aos grupamentos fosfato do esqueleto da molécula de RNA (Wang, 2023). Esse mecanismo de atração mútua promove a fixação do dsRNA à superfície do nanocarreador através de um processo de autocomplexação iônica, resultando na formação de nanopartículas esféricas que estabilizam o biopesticida e o protegem da hidrólise ambiental e da atividade nucleolítica no trato digestivo do inseto (Wang, 2023). Além de atuar como um escudo contra RNases, a nanoencapsulação com quitosana altera as propriedades físico-químicas do ativo, facilitando a transposição de barreiras como a matriz peritrófica e promovendo a internalização celular via endocitose, o que aumenta a meia-vida do dsRNA e potencializa a eficácia do silenciamento gênico em organismos recalcitrantes (Garcia, 2017; Yang, 2022; Wang, 2023).

A eficácia dos nanocarreadores foi demonstrada em diversos estudos. Em *S. exigua*, um lepidóptero notório por sua refratariedade ao RNAi oral, a formulação de dsRNA com polímeros guanilados resultou em um aumento significativo da mortalidade larval (53%) em comparação com o dsRNA não formulado (16%), além de retardar o desenvolvimento dos insetos (Christiaens, 2018). A utilização de nanopartículas de quitosana para entregar dsRNA ao mosquito *Aedes aegypti* L. e à lagarta-do-cartucho, *S. frugiperda*, também se mostrou eficaz, melhorando o silenciamento de genes-alvo e resultando em efeitos fenotípicos deletérios. Adicionalmente, foi verificado que o uso de SPc melhora a penetração do dsRNA através da parede corporal de afídeos e aumenta a mortalidade em diversas espécies de pragas. Estudos com microscopia confocal confirmaram que os nanocarreadores não apenas protegem o dsRNA, mas também aumentam sua internalização pelas células do intestino médio do inseto (Yang, 2022).

Destarte, a investigação sobre nanocarreadores representa um avanço fundamental para a viabilização da tecnologia de RNAi como uma estratégia de controle de pragas de nova geração. O desenvolvimento de formulações que aumentam a estabilidade do dsRNA, melhoram sua entrega e potencializam a resposta de RNAi em organismos-alvo é essencial para superar as limitações atuais. A contínua pesquisa e otimização de diferentes tipos de nanocarreadores, desde polímeros naturais (como a quitosana) e sintéticos (como polímeros

guanilados) até sistemas mais complexos como partículas ribonucleoproteicas e o BioClay, abrem novas perspectivas para a criação de biopesticidas específicos, eficazes e ambientalmente seguros (Lucena-Leandro, 2022; Christiaens, 2018; Gillet, 2017; Mitter, 2017). A integração da nanotecnologia com a biologia molecular possibilita, assim, o desenvolvimento de soluções inovadoras e sustentáveis para os desafios fitossanitários na agricultura global.

1.6 GENES DE REFERÊNCIA

A quantificação da expressão gênica, notadamente através da Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa com Transcrição Reversa (RT-qPCR), constitui o método mais sensível e acurado para a análise de processos biológicos e funções fisiológicas. Para que se obtenham dados de RT-qPCR com rigor científico e para a quantificação confiável de mRNA, a normalização dos dados é uma etapa crucial. Este procedimento exige a utilização de um gene de referência, também denominado gene de manutenção (*housekeeping gene*), cuja principal característica postula uma expressão estável, mantida de forma consistente independentemente do tipo celular ou das variações nas condições experimentais impostas. Em virtude da constatação de que nenhum gene possui expressão universalmente estável em todos os tipos celulares e sob todas as condições, a confirmação experimental da estabilidade de um gene de referência é indispensável e deve ser efetuada para cada delineamento experimental, tecido ou estágio de desenvolvimento específico em análise. Entre os genes frequentemente explorados para fins de normalização, destacam-se o *Elongation factor 1 beta* (*EF1B*), *Ribosomal protein L10* (*RPL10*) e *Ribosomal protein L18* (*RPL18*).

O gene *EF1B* pertence à família dos fatores de alongamento que desempenham um papel crucial na tradução proteica (Lu et al, 2013). Em estudos de estabilidade em *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée, 1854), um inseto Lepidoptera presente no clado Ditrysia (juntamente com *L. coffeella*), o *EF1B* foi consistentemente classificado como o gene mais estável para a análise em estágios de desenvolvimento, bem como em larvas alimentadas com diferentes variedades de arroz. Devido à sua estabilidade relativa, sugere-se que o *EF1B* pode ser utilizado como referência para estudos relacionados à Lepidoptera (Zhao et al, 2022).

Em segundo lugar, o gene *RPL10*, frequentemente utilizado como um gene de normalização devido a sua estabilidade, codifica um componente da subunidade 60S do ribossomo, sendo as proteínas ribossomais reconhecidas por sua função essencial na biossíntese proteica, na regulação do crescimento e diferenciação celular (Lu et al, 2013). Em

S. litura, *RPL10* demonstrou a expressão mais estável em diversos tecidos, populações distintas e em larvas submetidas a diferentes dietas (Lu et al, 2013). Em *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797), foi identificado como o gene mais estável em tratamentos com temperatura e na análise de todas as amostras, além de apresentar alta estabilidade em estágios de desenvolvimento e em vários tecidos (Han et al, 2021). Para *Mythimna loreyi* (Walker), *RPL10* foi recomendado como parte da combinação mais adequada de genes de referência para normalização em estágios de desenvolvimento, tecidos, idade adulta e sob tratamentos de temperatura (Wang et al, 2024).

Por fim, o gene *RPL18*, também pertencente à categoria das proteínas ribossomais essenciais para a tradução, tem sido utilizado em diversos estudos de RT-qPCR (Wang et al, 2024). Em *C. medinalis*, o *RPL18* foi classificado entre os genes mais estáveis e recomendado para uso em combinação para a análise em estágios de desenvolvimento, em tecidos larvais (em conjunto com *RPS3*) e em relação ao status de acasalamento em adultos (em combinação com *PGK*) (Zhao et al, 2022). Além disso, o *RPL18* foi reportado como um gene de proteína ribossomal estável e caracterizado para normalização em *Cimex lectularius* L. (Hemiptera) (Shen et al, 2022). Tais achados reiteram a relevância dos genes de proteínas ribossomais como controles endógenos.

1.7 GENES ALVO

O gene *notch* e sua via de sinalização representam um dos mecanismos mais fundamentais e evolutivamente conservados no reino animal, atuando na comunicação entre células adjacentes para regular uma vasta gama de eventos de desenvolvimento e determinar o destino celular. Embora amplamente estudada em *Drosophila melanogaster*, a via *notch* tem se mostrado fundamental em diversas espécies de insetos, incluindo alguns da ordem Lepidoptera, onde desempenha papéis cruciais. A ativação da via ocorre quando ligantes como Delta e Serrate, presentes em células vizinhas, interagem com o receptor Notch, liberando o domínio intracelular (NICD). O NICD migra para o núcleo para formar um complexo que ativa a transcrição de genes-alvo. Em lepidópteros como o bicho-da-seda (*Bombyx mori* Linnaeus, 1758), a via *notch* é vital para a formação de asas, regulando a proliferação celular, a diferenciação e a apoptose. Mutações no gene *notch* resultam em fenótipos graves, como asas ausentes ou mal formadas, além de afetar o desenvolvimento das escamas, onde tais fatores não impedem as larvas de causarem as lesões nas folhas de café, no entanto podem reduzir a população a longo prazo. Além do seu papel no desenvolvimento de

apêndices, a via também é crucial para a reprodução, regulando a formação de ovários e a fecundidade em outras espécies de insetos. A natureza essencial do gene *notch* em processos de desenvolvimento e reprodução o torna um alvo promissor para novas estratégias de controle de pragas, como biopesticidas baseados em RNA (Chen, 2023).

O gene *SNF7* e o complexo ESCRT-III (*Endosomal sorting complex required for transport-III*) do qual faz parte representam um dos mecanismos mais conservados e vitais para a homeostase celular em eucariotas, orquestrando a triagem de proteínas na via endossomal-autofágica. Essencial para processos como a atividade de lisossomos ácidos e a desubiquitinação de proteínas no intestino, o *SNF7* emergiu como um alvo letal de alta eficácia para o controle de pragas, sendo notavelmente o gene-alvo no primeiro milho transgênico comercialmente bem-sucedido baseado em RNAi, desenvolvido para controlar o besouro-do-milho-ocidental (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). Em lepidópteros como *Leucinodes orbonalis* Guenee, o gene *SNF7* (parálogo ao gene *shrub* de *Drosophila*) mostrou-se crucial para o desenvolvimento larval, com sua expressão atingindo o pico em instares intermediários. A inibição do *SNF7* por meio da ingestão de dsRNA específico leva a fenótipos severos e letais, incluindo crescimento atrofiado, falha na muda e mortalidade larval superior a 79%, o que é consistente com observações em outras espécies de pragas, onde o silenciamento do *SNF7* interrompe atividades celulares críticas, resultando no colapso fisiológico e morte. A natureza indispensável do gene *SNF7* para a sobrevivência e desenvolvimento, juntamente com sua suscetibilidade comprovada ao silenciamento gênico, o estabelece como um alvo proeminente para o desenvolvimento de biopesticidas de nova geração baseados em RNAi (Reddy, 2025).

O gene da acetilcolinesterase (*AChE*) representa um alvo clássico e de alta relevância para o controle de insetos, codificando a enzima crucial que catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina na fenda sináptica, encerrando assim a transmissão do impulso nervoso. Dada a sua função indispensável no sistema nervoso central, a inibição da *AChE* leva à contínua estimulação dos receptores nicotínicos, resultando em perturbações neurológicas e, em última análise, na paralisia e morte do inseto. Historicamente, esta enzima tem sido o alvo primário para inseticidas organofosforados e carbamatos; contudo, o uso extensivo destes compostos químicos resultou no desenvolvimento de resistência generalizada em muitas espécies de pragas, incluindo a traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* L. A natureza essencial da *AChE* para a sobrevivência do inseto, combinada com os desafios impostos pela resistência aos inseticidas convencionais, posiciona o gene *AChE* como um alvo promissor e

de grande interesse para o desenvolvimento de biopesticidas de nova geração baseados na tecnologia de RNA de interferência (RNAi). De fato, estudos demonstraram que a entrega de dsRNA ou siRNA direcionado ao gene *AChE* em *P. xylostella* e *Helicoverpa armigera* (Hubner, 1808) resulta em silenciamento gênico eficaz, redução da atividade enzimática, atraso no crescimento larval e, conseqüentemente, aumento da mortalidade, confirmando seu potencial como um alvo letal para o controle de lepidópteros-praga (Sharath Chandra, 2018).

1.8 JUSTIFICATIVA

A cafeicultura brasileira consolida-se como uma das principais commodities agrícolas em escala global, desempenhando um papel socioeconômico de elevada complexidade e exercendo a função de pilar financeiro fundamental para o país. Entretanto, a integridade desta cadeia produtiva e a valorização do produto final são severamente comprometidas pela infestação do bicho-mineiro-do-cafeeiro (*Leucoptera coffeella*), cujos danos ao parênquima foliar resultam na redução da capacidade fotossintética e em perdas de produtividade que podem atingir 70% (Dantas, 2021). A presente investigação justifica-se, primordialmente, pela obsolescência tecnológica do controle químico convencional, uma vez que o uso intensivo e indiscriminado de inseticidas tem selecionado populações de *L. coffeella* resistentes a múltiplas classes químicas, incluindo piretróides, neonicotinóides e, mais recentemente, diamidas como o clorantraniliprole (Junqueira, 2024).

Sob a ótica da sustentabilidade, o mercado contemporâneo demanda a transição para sistemas de produção que priorizem a proteção ambiental e a entrega de produtos livres de resíduos químicos, em consonância com as metas de sustentabilidade da cadeia global de valor do café (International Coffee Organization, 2024). A tecnologia de RNA de interferência (RNAi) emerge, portanto, como um paradigma biotecnológico único, oferecendo alta especificidade para o silenciamento de genes essenciais, como o notch, minimizando impactos sobre organismos não-alvo e o ecossistema.

A opção estratégica pelo desenvolvimento de uma abordagem de aplicação tópica via dsRNA (SIGS - *Spray-Induced Gene Silencing*), em detrimento da entrega por transformação genética da planta (HIGS - *Host-Induced Gene Silencing*), fundamenta-se em limitações críticas da realidade agronômica e regulatória. Primeiramente, a geração de plantas transgênicas (OGMs) enfrenta um cenário de altos custos de comercialização, aceitação pública restrita e um marco regulatório extremamente rígido (Lucena-Leandro, 2022; Ortolá, 2024). No caso específico do cafeeiro, por se tratar de uma cultura perene, os programas de

melhoramento genético via transgenia são processos morosos que podem demandar décadas para a disponibilização de cultivares comerciais no campo (Lucena-Leandro, 2022). Em contrapartida, a via exógena oferece uma flexibilidade operativa superior, permitindo o manejo sazonal da praga com menor ônus regulatório (Lucena-Leandro, 2022). Adicionalmente, a aplicação intermitente de dsRNA tópico apresenta a vantagem intrínseca de exercer uma menor pressão de seleção sobre o inseto-alvo em comparação ao fornecimento constante da molécula pelas plantas transformadas, retardando, assim, a evolução de mecanismos de resistência à tecnologia (Lucena-Leandro, 2022).

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Este trabalho integra a estratégia de inovação do grupo de pesquisa Engenharia de Bioprodutos para Controle e Diagnóstico de Pragas (eBio) certificado pelo CNPq para a cafeicultura, partindo da pioneira caracterização multiômica (genoma, transcrito e proteoma) de *Leucoptera coffeella* para a seleção de potenciais alvos moleculares. A pesquisa busca avançar no desenvolvimento de ativos biotecnológicos, e assim, consolidar a prova de conceito para uma estratégia de controle via entrega tópica, visando oferecer uma alternativa sustentável e específica para o manejo da resistência aos inseticidas convencionais.

2.2 ESPECÍFICOS

- Anotar as sequências dos genes candidatos no genoma de *L. coffeella*;
- Analisar *in silico* a expressão diferencial dos genes candidatos no transcrito em diferentes fases do ciclo de vida do *L. coffeella*;
- Analisar a transcrição dos genes selecionados de *L. coffeella* por RT-qPCR;
- Sintetizar dsRNAs a partir das sequências gênicas do gene *notch* como alvo selecionado;
- Avaliar por bioensaios o efeito do dsRNA do gene *notch* no desenvolvimento de *L. coffeella*.

3. METODOLOGIA

3.1 IDENTIFICAÇÃO DE GENES-ALVO CANDIDATOS AO SILENCIAMENTO GÊNICO DE *L. COFFEELLA*

As informações gerais das diferentes fases do desenvolvimento do transcrito e proteoma de *L. coffeella* foram analisadas por membros do grupo de pesquisa mediante comparação com diversos bancos de dados (Martins et al., 2022). Esse banco de dados foi utilizado para a identificação de genes essenciais para o metabolismo do inseto com base na comparação com organismos ortólogos. Paralelamente, genes alvo potenciais de Lepidoptera já haviam sido identificados na literatura e selecionados pelo grupo como candidatos para este trabalho (Lucena-Leandro et al., 2022). Foram escolhidos os genes *notch* (Neurogenic locus Notch protein) e *AChE* (Acetylcholinesterase), e posteriormente incluiu-se também o gene *SNF7* (Vacuolar-sorting protein). Os três genes selecionados tiveram ensaios iniciais de caracterização da expressão gênica via RT-qPCR (Goldberg et al., 2025).

3.2 ANOTAÇÃO GENÔMICA DE GENES-ALVO PARA SILENCIAMENTO GÊNICO DE INSETOS

A estratégia inicial adotada consistiu na prospecção e identificação por homologia com base no banco de dados contendo o genoma, transcrito e proteoma de *L. coffeella*. Nessa etapa, os genes previamente escolhidos na literatura foram analisados para a curadoria manual das sequências gênicas semelhantes. Para isso, foram utilizadas sequências gênicas ortólogas a genes manipulados com sucesso em ensaios de silenciamento via RNAi em outros insetos, como na traça das crucíferas (*P. xylostella*) (Sharath et al., 2019), no psilídeo dos citros (*Diaphorina citri* Kuwayama) (Yu & Killiny, 2018) e no bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman) (Gillet et al., 2017). Adicionalmente, o nosso grupo de pesquisa publicou uma revisão de literatura que reuniu métodos de silenciamento gênico por meio da técnica do dsRNA, sem o uso de plantas transformadas (Lucena-Leandro et al., 2022). Esse levantamento foi utilizado como base para o desenvolvimento deste projeto, permitindo a comparação entre os genes e os métodos empregados nos trabalhos referenciados.

As sequências foram analisadas pelo visualizador JBrowse (versão 2.0) (Buels et al., 2016) e anotadas na plataforma Apollo (versão 2.6.5) (Dunn et al., 2019). Foram realizadas análises de expressão de mRNA e alinhamento com sequências de diversos bancos de dados, incluindo Pfam (versão 35.0) (Sonnhammer, Eddy, & Durbin, 1997), Swissprot (atualmente

denominado Uniprot) (Duvaud et al., 2021), banco de lepidópteras (Challi et al., 2016), bancos de genomas de insetos (versão 2.0) (Mei et al., 2022) e GO (versão 4.0) (Ashburner et al., 2000).

3.3 CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR

A transcrição *in vitro* dos genes selecionados como alvos potenciais para silenciamento por RNAi foi avaliada por RT-qPCR em diferentes fases do desenvolvimento do inseto. Os genes de referência utilizados foram *RPL10*, *RPL18* e *EF1B* (Han et al, 2021; Lu et al, 2013; Shen et al, 2022; Wang et al, 2024; Zhao et al, 2022). Os *primers* foram desenhados utilizando a ferramenta Primer3Plus (Untergasser et al., 2012), respeitando as seguintes especificações: temperatura de anelamento de $60^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, comprimento de aproximadamente 22 pb, produto de 100-200 pb, e teor de GC de $50\% \pm 30\%$. As reações de RT-qPCR foram desempenhadas em uma máquina QuantStudio 3 Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific®) utilizando o SYBR™ Select Master Mix (Thermo Fisher Scientific®). Por fim, a normalização dos dados da expressão diferencial foi realizada com o *software* SATQPCR (Rancurel et al., 2019).

Os dados de expressão relativa obtidos via RT-qPCR foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo SATQPCR para verificar a existência de diferenças significativas entre as médias dos níveis de transcritos nos estágios de desenvolvimento avaliados. Nos casos em que a ANOVA indicou significância estatística, procedeu-se ao teste de comparações múltiplas de Tukey (*post-hoc*) para identificar as diferenças específicas entre os grupos. Todas as análises foram realizadas considerando um nível de significância de $p < 0,1$, utilizando-se o erro padrão da média para a representação da variabilidade amostral.

Para assegurar a acurácia na quantificação dos níveis de mRNA, a estabilidade de expressão dos genes de referência foi rigorosamente avaliada pelo algoritmo NormFinder. Este método estima as variações intra e intergrupais, atribuindo um valor de estabilidade (*stability value*) no qual magnitudes inferiores indicam maior robustez e menor flutuação transcricional sob as condições experimentais impostas. A análise baseou-se na premissa de que a normalização por múltiplos genes de referência mitiga vieses estatísticos inerentes ao uso de um único controle interno.

3.4 SÍNTESE DE dsRNAs PARA SILENCIAMENTO DO GENE-ALVO

Os genes amplificados foram utilizados para o desenho de *primers* que permitiram a síntese *in vitro* dos dsRNAs no laboratório. O desenho dos vetores para síntese de dsRNA foi baseado no método estabelecido por Ni et al. (2008), utilizando o programa SnapDragon. Posteriormente, a produção *in vitro* de dsRNA para bioensaios, por meio do kit MEGAscript™ T7 Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific®), permitiu a realização de testes *in vivo*. Tais testes foram necessários para confirmar os possíveis efeitos do silenciamento dos genes-alvo no desenvolvimento do inseto.

3.5 PREPARAÇÃO DA NANOFORMULAÇÃO

Foram produzidas nanopartículas de quitosana visando à veiculação de dsRNA para aplicação no controle do bicho-mineiro-do-cafeeiro. A síntese das nanopartículas foi realizada pelo método de gelificação iônica, utilizando quitosana de média massa molecular solubilizada em ácido acético. Nesta solução, foi incorporado o dsRNA para atingir uma concentração final de 1,2µg/µL em 12 mL de nanoformulação contendo 240 ng de partículas de quitosana. Em seguida, procedeu-se ao gotejamento de uma solução de tripolifosfato de sódio (TPP), utilizando injetor de seringa, para promover a reticulação e formação das partículas. Após a gelificação, adicionou-se polietilenoglicol (PEG) 3350 solubilizado em água, mantendo-se a agitação magnética. Paralelamente, foram produzidas nanopartículas vazias (controle), seguindo o mesmo protocolo, porém sem a adição do dsRNA.

3.6 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS dsRNAs POR BIOENSAIOS

A análise do potencial de ação dos dsRNAs nos insetos expostos foi conduzida por meio de experimentos *in vivo* e *in vitro* realizados em casa de vegetação e laboratório da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Para os bioensaios, foram estabelecidos quatro tratamentos principais, a fim de avaliar o efeito da nanoformulação no método de silenciamento: dsRNA *Naked* (sem nanocarreador), dsRNA Nanoformulado (associado ao nanocarreador), Nanoformulação Vazia (nanocarreador sem dsRNA) e H₂O (controle negativo).

Inicialmente, foi determinado o método de aplicação *Spray-Induced Gene Silencing* (SIGS), utilizando um aerógrafo para aplicar os tratamentos nas folhas de plantas de café não infestadas. Em seguida, foram realizados testes iniciais de curta duração, explorando a

técnica de infiltração em folhas destacadas de café, que foram inseridas em espuma floral. Por último, foi avaliado o método de entrega por *soaking*, descrito mais à frente, realizado em condições controladas de laboratório, como uma alternativa para exposição sistêmica (Santos-Ortega & Flynt, 2022).

3.6.1 *SPRAY-INDUCED GENE SILENCING (SIGS)*

Para o bioensaio por SIGS em casa de vegetação, foram selecionadas quatro plantas de cafeeiro de tamanho uniforme. Em cada planta, foram demarcadas 12 folhas completamente expandidas. A aplicação dos dsRNAs e controles foi realizada individualmente em cada folha, utilizando-se um aerógrafo onde o volume de aplicação foi de 200 a 300 µL de solução por folha.

Após o tratamento, as plantas foram dispostas aleatoriamente no ambiente de casa de vegetação com criação aberta de *L. coffeella*. O potencial de ação dos dsRNAs foi avaliado monitorando-se a oviposição e o desenvolvimento de minas de *L. coffeella* ao longo de um período de duas semanas (Figura 2).

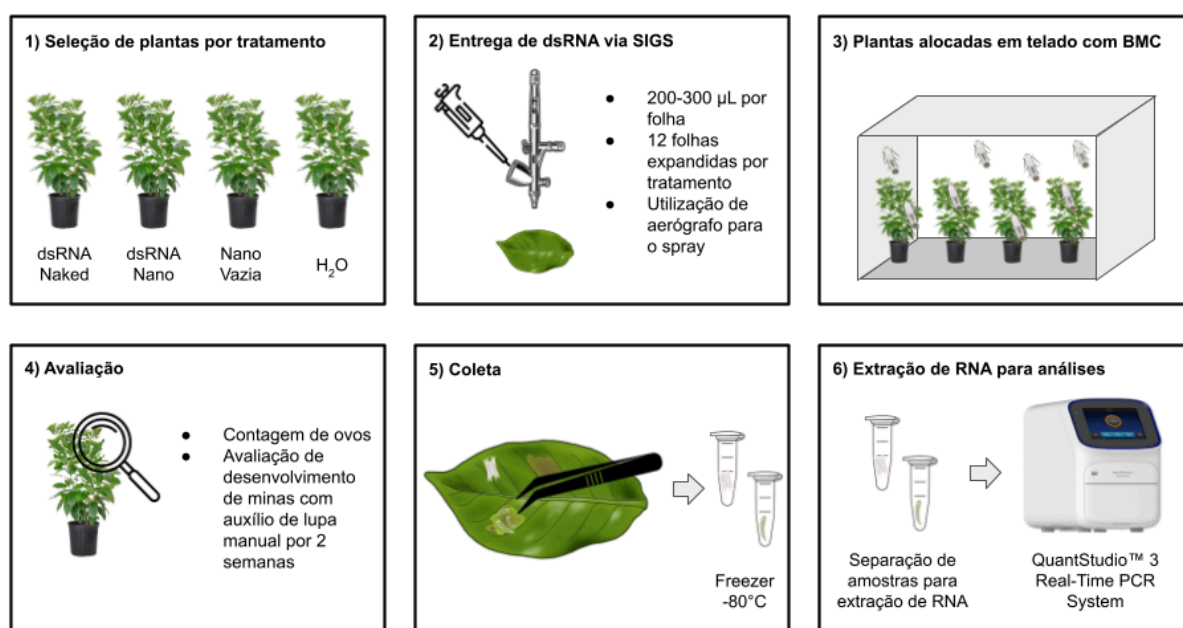


Figura 4: Representação esquemática do protocolo de *Spray-Induced Gene Silencing* (SIGS) em casa de vegetação. O esquema detalha a aplicação dos tratamentos (dsRNA *Naked*, dsRNA Nano, Nano Vazia e H₂O) por meio de aerógrafo em folhas de cafeeiro em plantas inteiras ou em gaiola isolada, e o monitoramento subsequente da oviposição e do desenvolvimento de minas de *L. coffeella*.

Paralelamente, um ensaio foi conduzido em ambiente controlado, utilizando uma gaiola com tela antiafídica. Neste experimento, foi utilizada apenas uma planta de cafeeiro com 24 folhas. Os quatro tratamentos foram aplicados em seis folhas cada (totalizando 24

folhas tratadas na mesma planta). Após a aplicação, foram liberados 9 casais de *L. coffeella* na gaiola para avaliar a oviposição e o desenvolvimento da praga nessas condições.

3.6.2 INFILTRAÇÃO FOLIAR

O ensaio de infiltração foi realizado em ambiente controlado, utilizando gaiolas com tela antiafídica. Neste método, foram utilizadas seis folhas para tratamento com minas de *L. coffeella* estabelecidas. A aplicação do tratamento foi feita por infiltração, injetando-se 1 mL de solução próximo às minas ativas, onde o dsRNA estava na concentração de 1 $\mu\text{M}/\mu\text{L}$.

Para a avaliação dos efeitos do silenciamento, as coletas de material biológico (larva, pupa e adultos) foram realizadas em três momentos após a infiltração: duas folhas coletadas em 24 horas, duas folhas em 96 horas e as duas folhas restantes de cada tratamento foram mantidas na gaiola para monitorar a emergência de adultos e posterior coleta. O material coletado foi congelado imediatamente em N_2 líquido e armazenado a -80°C (Figura 3).

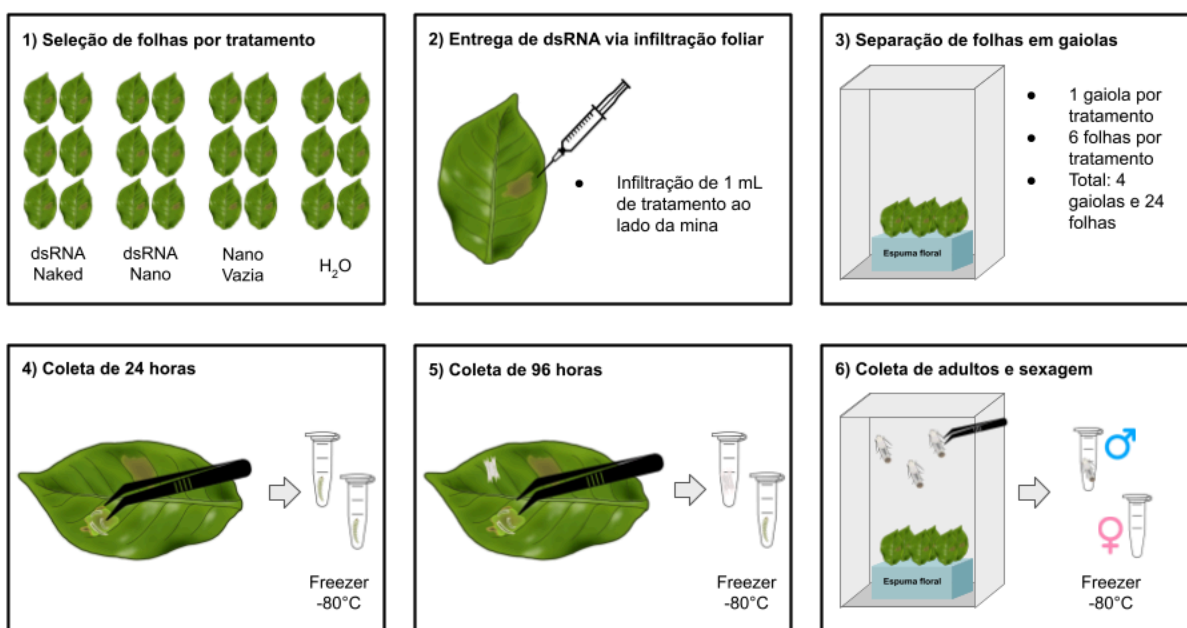


Figura 5: Representação esquemática do protocolo de infiltração foliar para avaliação dos dsRNAs. O esquema ilustra a aplicação de 1 mL da solução de tratamento por injeção próxima às minas ativas em folhas destacadas, mantidas em espuma floral. Inclui a indicação dos pontos de coleta de material biológico (larvas, pupas e adultos) em 24 horas, 96 horas e na emergência de adultos.

3.6.3 SOAKING

Para o ensaio inicial de *soaking*, foram coletadas 80 larvas (no quarto instar, L4) de *L. coffeella*, que foram divididas em quatro grupos de 20 larvas para cada tratamento. As larvas foram submetidas a cinco minutos de *soaking* em cada solução de tratamento.

O ensaio foi conduzido em oito placas de Petri (duas repetições por tratamento), cada uma forrada com papel de filtro umedecido e uma folha de *C. arabica* sadia. Após o *soaking*, foram inseridas 10 larvas em cada placa. A avaliação foi realizada nos tempos de 24 horas e 96 horas; em cada ponto, foi aberta uma placa por tratamento para a coleta de todo o material biológico (Figura 4).

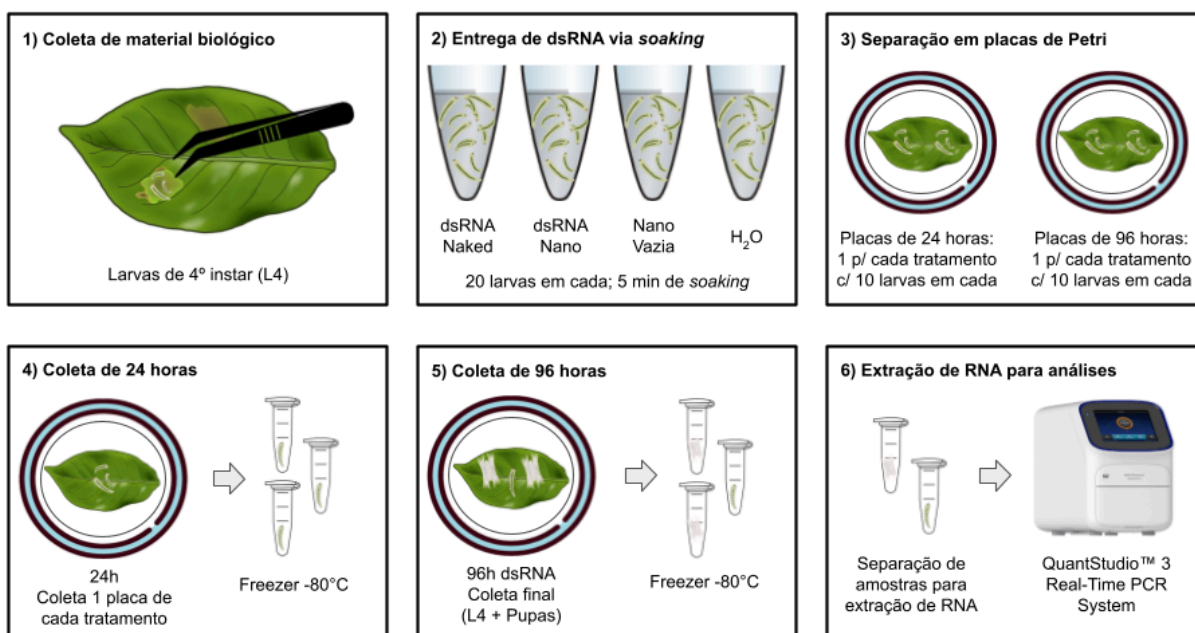


Figura 6: Representação esquemática do bioensaio de *soaking* em larvas de quarto ínstar (L4) de *L. coffeella*. O esquema representa o processo de incubação das larvas por cinco minutos nas soluções de tratamento e sua subsequente alocação em placas de Petri contendo papel de filtro umedecido e folhas saudáveis, indicando os pontos de coleta para avaliação fenotípica (mortalidade e pupação) em 24 horas e 96 horas.

Posteriormente, dois experimentos adicionais de *soaking* foram realizados para refinar o tempo de entrega e absorção do dsRNA: uma curva de avaliação e um ensaio de curta duração.

Sendo assim, foi realizada uma curva de avaliação e coleta utilizando 15 larvas por tratamento. O material biológico foi coletado nos pontos de 3h, 6h, 12h, 18h e 24h após o ensaio, com a coleta de 3 indivíduos em cada ponto temporal. E, posteriormente, foi realizado um último experimento de *soaking* nas mesmas condições, mas com o tempo de coleta fixado em apenas 2 horas após o ensaio, utilizando 10 larvas por tratamento.

4. RESULTADOS

4.1 IDENTIFICAÇÃO E ANOTAÇÃO GENÔMICA DOS GENES-ALVO EM *L. COFFEELLA*

Por meio de análises *in silico*, foram identificados genes similares a sequências gênicas previamente curadas e manipuladas com sucesso em silenciamento via RNAi em outras espécies de insetos. Genes ortólogos conhecidos foram escolhidos com base na literatura existente e as sequências selecionadas foram analisadas utilizando o visualizador JBrowse (versão 2.0) e anotadas na plataforma Apollo (versão 2.6.5) com alinhamentos de sequências sendo realizados com os bancos de dados Pfam (versão 35.0), SwissProt/Uniprot, Lepbase, Insectbase e GO (versão 4.0).

Neste estudo, os genes *notch*, *SNF7* e *AChE* foram selecionados como alvos para silenciamento por RNAi de acordo com revisões da literatura. O gene *notch*, que codifica a proteína Neurogenic Notch Locus, tem sido central nesta investigação por ser o mais conservado e de cópia única nas sequências anotadas referentes ao bicho-mineiro-do-cafeeiro.

Tabela 1: Genes candidatos para silenciamento gênico por dsRNA em *L. coffeella*, suas funções primárias e taxa de silenciamento em organismos alvo.

GI	Gene alvo	Proteína (Classificação funcional)	Alvo	Mortalidade	Referência
g24516.t1	<i>AChE</i>	Acetilcolinesterase (Neurotransmissão)	<i>Plutella xylostella</i> (Lepidoptera)	69-74%	Chandra, 2019
g16498.t1	<i>notch</i>	Neurogenic locus Notch protein (Desenvolvimento, diferenciação celular e neurogênese)	<i>Helicoverpa zea</i> Boddie (Lepidoptera)	12-16%	Wang, 2018
g5828.t1	<i>SNF7</i>	Vacuolar-sorting protein (Homeostase celular e via endossomal-autofágica)	<i>Myloccerus undecimpustulatus undatus</i> Marshall (Coleoptera)	92,70%	Pinheiro, 2020
			<i>Anoplophora glabripennis</i> Antennae (Coleoptera)	75%	Dhandapani, 2020
			<i>Plautia stali</i> Scott (Hemiptera)	100%	Nishide, 2021

A robustez da via de sinalização *notch* em lepidópteros, vital para processos de desenvolvimento e metamorfose, justifica sua priorização neste estudo. Os outros genes, *SNF7* (essencial para a homeostase celular) e *AChE* (alvo clássico no sistema nervoso),

representam alvos complementares com potencial letal comprovado em outras espécies de insetos-praga, e estão em fase inicial de caracterização da expressão gênica por RT-qPCR.

4.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA *IN SILICO* DOS GENES-ALVO (*L. COFFEELLA*)

A análise *in silico* das sequências gênicas ortólogas, utilizando o genoma e o transcrito de *L. coffeella* gerado pelo grupo de pesquisa, permitiu a análise da expressão diferencial dos genes candidatos em diferentes fases do ciclo de vida do inseto, conforme proposto nos objetivos. O gene *notch* (GI: g16498.t1) foi selecionado como foco principal por ser o mais conservado e apresentar cópia única nas sequências anotadas. A sequência g16498.t1 apresentou uma taxa de similaridade de aproximadamente 89% com o gene *notch* identificado em *Bicyclus anynana* (Butler, 1879). A relevância biológica do *notch*, crucial para o desenvolvimento e determinação do destino celular em insetos, foi confirmada através do alinhamento com bancos de dados especializados, como Pfam, SwissProt/Uniprot, Lepbase e GO. Essa triagem computacional forneceu a base para a análise do perfil de expressão *in vitro* subsequente.

Com o objetivo de explorar o perfil transcricional preliminar dos candidatos selecionados, realizou-se uma análise comparativa dos níveis de transcritos em diferentes fases do desenvolvimento de *L. coffeella*. A partir dos dados de sequenciamento de RNA (RNA-seq), foi gerada uma representação visual da abundância relativa dos genes *notch*, *SNF7* e *AChE*, permitindo observar a modulação da expressão gênica ao longo do ciclo de vida do inseto, conforme ilustrado no mapa de calor (Figura).

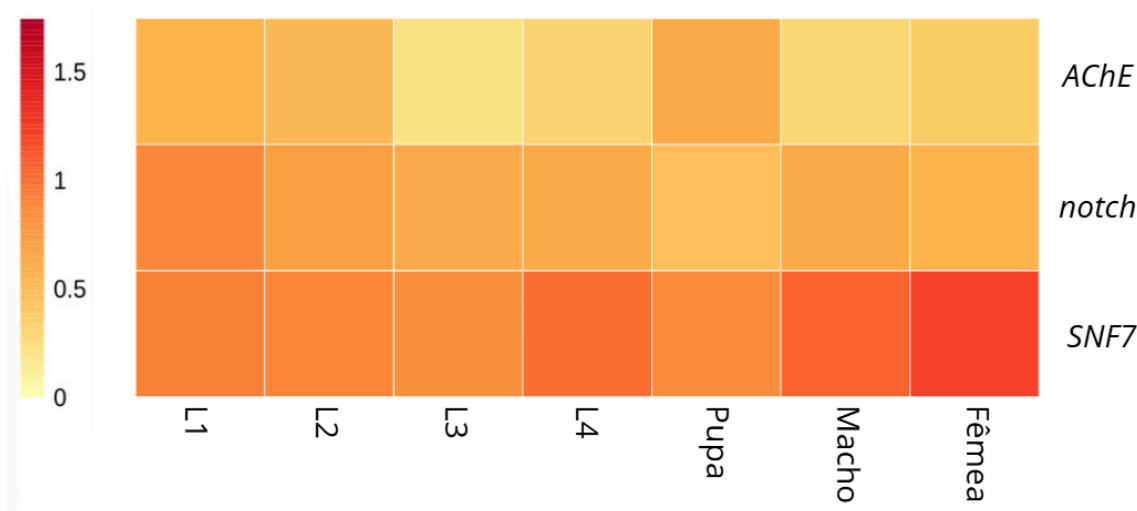


Figura 7: Perfil de expressão *in silico* dos genes candidatos *notch*, *SNF7* e *AChE* em diferentes estágios de desenvolvimento de *Leucoptera coffeella*. O mapa de calor (*heatmap*) representa a abundância relativa dos transcritos, calculada a partir dos valores de FPKM (*Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped*

reads) obtidos do transcriptoma. As colunas indicam as fases de desenvolvimento (L1-L4: estágios larvais; pupa; macho e fêmea adultos) e as linhas correspondem aos genes avaliados. A escala de cores indica a intensidade da expressão, variando de níveis basais (amarelo/claro) a níveis elevados (vermelho/escuro).

4.3 PERFIL DE EXPRESSÃO CONSTITUTIVA DOS GENES-ALVO

A análise do perfil de expressão *in vitro* dos genes-alvo foi executada por RT-qPCR, abrangendo diferentes estágios de desenvolvimento do inseto. Para a normalização dos dados, três genes de referência (*housekeeping genes*) foram empregados: *RPL10*, *RPL18* e *EF1B*.

Os iniciadores (*primers*) utilizados nas reações de RT-qPCR foram desenhados com critérios rigorosos de especificidade, como o produto de amplificação variando entre 100-200 pares de bases (pb) e a temperatura de anelamento de $60^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Os primers específicos desenhados para avaliar o potencial dos genes alvos e de referência encontram-se sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2: *Primers* utilizados para a amplificação dos genes de referência e genes alvo potenciais para silenciamento de *L. coffeella* nas reações de RT-qPCR. Os genes de referência (*EF1B*, *RPL10* e *RPL18*) são destacados em azul, enquanto os genes alvo (*notch*, *AChE* e *SNF7*) são apresentados em laranja.

Gene ID	Proteína	Primers
g16776.t1	Elongation factor 1 beta	F: GATGATGACGATTTGGACCTCT
		R: ACAACCTCTTCCATTTTAGCCA
g25232.t1	Ribosomal protein L10	F: GGTTTGAACAAAGCCGGTAAAT
		R: ACACAAGGAAGTTGATGGACAA
g34483.t1	Ribosomal protein L 18	F: TACTCGTGAAGGTTTGATTGCT
		R: GGTCAAACGTCAAGATTTACC
g16498.t1	Neurogenic locus Notch protein	F: ACGATTACCACTGCAACTGTAA
		R: AGGGTTAGAATCACATGCGTAG
g24516.t1	Acetylcholinesterase	F: GTTCTTAGACGAAATGCCGAAG
		R: TCTCAGATACTCTTCCCTGCTT
g5828.t1	Vacuolar-sorting protein SNF7	F: GCCAGGATACATGCAGAAAATG
		R: TCCATTGCCTTTACTACACCTG

A análise de estabilidade via NormFinder revelou que os genes ribossomais *RPL10* e *RPL18* apresentaram os maiores índices de constância transcrricional, com valores de estabilidade de 0,460 e 0,466, respectivamente. Tais resultados superaram o desempenho do

gene *EF1B*, que exibiu um valor de 0,985. A proeminente estabilidade de *RPL10* e *RPL18* em *L. coffeella* corrobora estudos prévios em outros lepidópteros, como *S. litura* e *C. medinalis*, nos quais proteínas ribossomais foram consistentemente identificadas como controles endógenos ideais para normalização em diferentes estágios ontogenéticos e tecidos. Em contrapartida, embora *EF1B* tenha demonstrado uma estabilidade aceitável (abaixo de 1.0), sua variação relativa justifica a priorização do par *RPL10/RPL18* para o cálculo dos fatores de normalização utilizados nas análises de expressão do gene *notch*.

Para confirmar a relevância biológica do gene alvo, ensaios de RT-qPCR foram conduzidos em amostras de RNA total obtidas a partir de diferentes fases do ciclo de vida de *L. coffeella*, incluindo larvas de quarto ínstar (L4), pupas e adultos. Os níveis de transcritos do gene *notch* foram normalizados utilizando-se os genes de referência *RPL10* e *RPL18*.

A análise *in vitro* confirmou a natureza constitutiva do gene *notch*, com transcrição detectada em todos os estágios ontogenéticos de *L. coffeella*. A aplicação do teste de Tukey revelou que a abundância de transcritos na fase de pupa foi significativamente superior (Gráfico 1), o que corrobora a hipótese de um recrutamento intenso desta via de sinalização durante a reorganização tecidual da metamorfose. As diferenças significativas são indicadas pelas letras 'a' e 'b', conforme determinado pela análise estatística ($p < 0,1$).

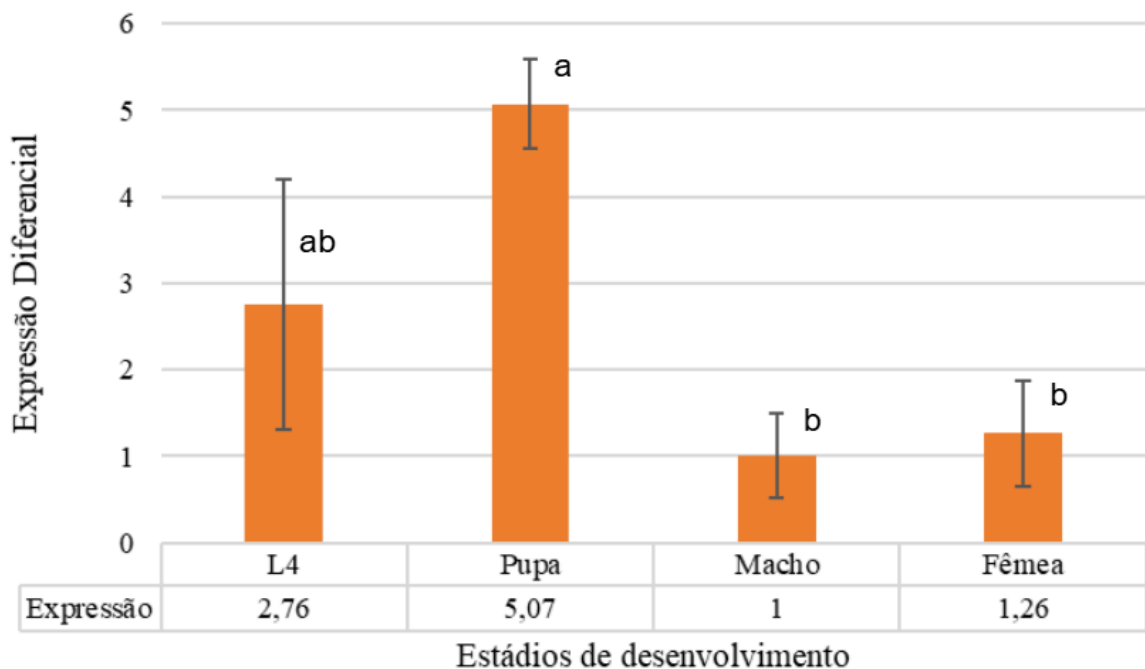


Gráfico 1: Dados de expressão diferencial do gene *notch* em diferentes estágios de desenvolvimento (L4, pupa, macho e fêmea) do BMC. Os controles internos *RPL10* e *RPL18* foram usados para normalizar os níveis de

transcrição por amostra e o estágio macho foi escolhido como um controle de comparação para a análise. O erro padrão é representado pela barra de erro e as letras (a e b) ao lado do nível de expressão representa o grau de significância ($p < 0,1$).

A expressão particularmente intensa na fase de pupa, 5 vezes maior que o controle (macho), juntamente com a relevância detectada em L4, sugere um papel fundamental do gene na competência celular para a metamorfose. Esses estágios representam o período de maior plasticidade do desenvolvimento, onde a sinalização *notch* é recrutada massivamente para orquestrar a proliferação e diferenciação celular necessárias para a montagem do fenótipo adulto.

4.4 SÍNTESE DO dsRNA DO GENE *NOTCH*

Para a realização dos bioensaios *in vivo*, o dsRNA do gene *notch* foi sintetizado por transcrição *in vitro*, utilizando o protocolo do kit MEGAscript™ T7 Transcription Kit. A partir da sequência nucleotídica do gene *notch*, cuja expressão transcricional foi confirmada por RT-qPCR em diferentes estágios de *L. coffeella*, foram desenhados conjuntos de *primers* contendo a sequência promotora T7 (TAATACGACTCACTATAGGG), essencial para direcionar a polimerase T7 RNA a sintetizar o RNA de fita dupla com um fragmento de 523 pb. O dsRNA resultante da transcrição *in vitro* foi purificado e sua integridade e especificidade foram confirmadas por eletroforese em gel de agarose, onde observa-se a conformidade do tamanho do fragmento e a ausência de arraste (*smear*), confirmando a qualidade da molécula para os bioensaios subsequentes (Figura 8). A Tabela 3 sumariza os primers específicos utilizados para a síntese do dsRNA direcionado ao gene *notch*.

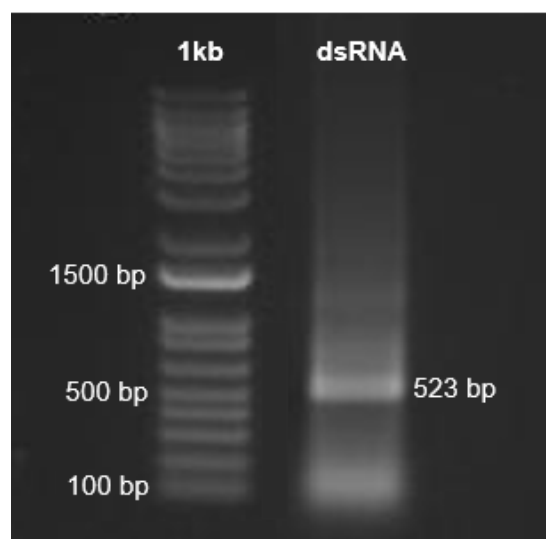


Figura 8: Verificação da integridade do dsRNA-*notch* em gel de agarose 1,2%. A amostra foi obtida via transcrição *in vitro* utilizando template de pupa de *L. coffeella*. A visualização foi realizada com brometo de etídeo.

Tabela 3: *Primers* utilizados para a síntese *in vitro* do dsRNA do gene *notch* de *L. coffeella*. Os *primers forward* e *reverse* incluem a sequência promotora T7 (TAATACGACTCACTATAGGG) em suas extremidades.

Gene ID	Proteína	Primers
g16498.t1	Neurogenic locus Notch protein	F: TAATACGACTCACTATAGGGAAGTCCCAGGACAACACAGG
		R: TCAAATGATGGTGCCTTTGT
		F: AACTCCCAGGACAACACAGG
		R: TAATACGACTCACTATAGGGTCAAATGATGGTGCCTTTGT

4.5 EFEITOS DO SILENCIAMENTO GÊNICO POR dsRNA EM BIOENSAIOS

Os bioensaios *in vivo* e *in vitro* foram realizados em casa de vegetação e laboratório para avaliar o potencial de ação dos dsRNAs. Quatro tratamentos foram sistematicamente comparados: dsRNA *Naked* (não formulado), dsRNA Nanoformulado (associado ao nanocarreador), Nanoformulação Vazia e H₂O (controle negativo).

A análise aprofundada dos entraves metodológicos encontrados durante a execução dos bioensaios de infiltração foliar e *Spray-Induced Gene Silencing* (SIGS) revela desafios intrínsecos à biologia do *Leucoptera coffeella* e à logística experimental em escala laboratorial. No que tange à infiltração foliar, a técnica visa introduzir o dsRNA diretamente no mesófilo foliar, local onde as larvas realizam sua atividade alimentar; contudo, o hábito endofítico do bicho-mineiro impede o controle exato do número de espécimes em estágio L4 efetivamente expostos. Somado a isso, a necessidade de volumes elevados de solução — aproximadamente 1 mL por ponto de infiltração — acarretou um consumo desproporcional de ativos biotecnológicos, sem que houvesse uma garantia de absorção homogênea pelas larvas abrigadas nas minas, resultando em dados inconsistentes e na inviabilidade de repetições estatísticas robustas.

Em relação ao protocolo de SIGS, as dificuldades residiram primordialmente na complexidade biológica do ciclo reprodutivo do inseto em ambiente controlado. A técnica exige que o dsRNA seja pulverizado sobre a folha para posterior ingestão após a eclosão, o

que demanda uma sincronia precisa entre a aplicação do spray e a oviposição. A execução desse bioensaio em gaiolas isoladas impôs uma demanda crítica por adultos devidamente sexados para assegurar taxas de infestação padronizadas, uma necessidade de material biológico tão elevada que se tornou um limitador logístico para o prosseguimento dos experimentos, juntamente às condições climáticas que vieram a afetar o ensaio com incidência de chuva sobre as plantas tratadas, visto que não havia disponível um ambiente com fatores abióticos controlados. A alta sensibilidade de *L. coffeella* a variáveis de estresse em laboratório e a dificuldade em manter a uniformidade da postura nessas condições resultaram em resultados inconclusivos, forçando a transição do foco investigativo para o método de *soaking*. Diferentemente das abordagens anteriores, o *soaking* permitiu o manejo individualizado das larvas de quarto ínstar, garantindo que o tempo e a concentração de exposição fossem rigorosamente controlados antes da avaliação fenotípica e molecular.

A análise da atividade biológica do silenciamento do gene alvo *notch* foi conduzida por meio do bioensaio de *soaking*. Esta metodologia foi empregada como uma alternativa de exposição sistêmica para testar a ação do dsRNA em diferentes formulações. Conforme o protocolo estabelecido, 20 larvas foram utilizadas em cada um dos quatro tratamentos, sendo 10 indivíduos destinados à avaliação em 24 horas e 10 indivíduos à avaliação em 96 horas.

É imperativo salientar que os dados plotados nos Gráficos 2 e 4 derivam dos mesmos grupos experimentais, estruturados de forma a garantir a robustez das observações em cada janela temporal. O delineamento baseou-se em triplicatas de 10 larvas para cada tratamento em ambos os horários de avaliação, resultando em um montante de 30 indivíduos para o intervalo de 24 horas e 30 indivíduos para o de 96 horas, perfazendo um total de 60 espécimes monitorados por tratamento. A opção pela representação em números absolutos visa evidenciar a letalidade e a disrupção do desenvolvimento larval observadas diretamente nesses conjuntos fixos, justificando-se a inexistência de barras de erro pela natureza discreta e totalizada das contagens efetuadas.

A mortalidade das larvas de *L. coffeella* foi avaliada nos tempos de 24 horas e 96 horas após a incubação na solução de tratamento, permitindo a comparação da eficácia entre as formulações de dsRNA e os respectivos controles. Em Gráfico 2, observa-se a variação na letalidade do dsRNA nos diferentes pontos temporais.

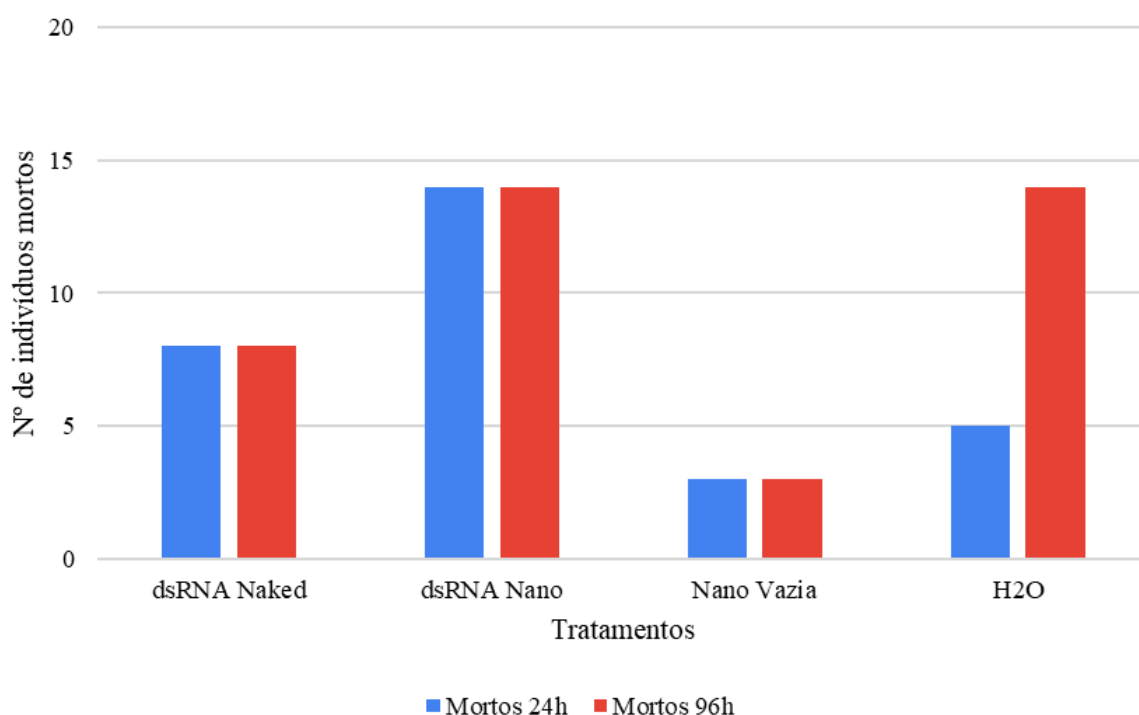


Gráfico 2: Representação da Taxa de Mortalidade em números absolutos em larvas L4 de *L. coffeella* após 24 horas e 96 horas do bioensaio de *soaking*. Os tratamentos comparados são dsRNA *Naked*, dsRNA Nano, Nano Vazia (nanocarreador sem dsRNA) e H₂O (Controle Negativo). Os dados são expressos em valores absolutos, referentes a um delineamento composto por três grupos de 10 indivíduos por tratamento em cada intervalo de tempo. Assim, cada ponto de avaliação (24 h e 96 h) totaliza 30 espécimes analisados, o que fundamenta a ausência de barras de erro e permite a observação direta da resposta biológica em cada pool amostral.

A administração do dsRNA *notch* na formulação dsRNA *Naked* resultou em uma morte total de 8 indivíduos em 3 repetições para ambos os horários de avaliação, indicando que a mortalidade nas primeiras 24 horas foi superior aos grupos controle (Nano Vazia e H₂O). Em contraste, o tratamento com a formulação dsRNA Nano demonstrou quase o dobro de letalidade comparado ao grupo exposto ao dsRNA *Naked*, com um total de 14 mortos nas primeiras 24 horas e o mesmo número no grupo avaliado em 96 horas, sugerindo que o nanocarreador pode ter sido capaz de otimizar a entrega da molécula no organismo do inseto. A eficácia da formulação dsRNA Nano na indução da morte larvária pode ser verificada visualmente pela comparação dos fenótipos apresentados na Figura 9.

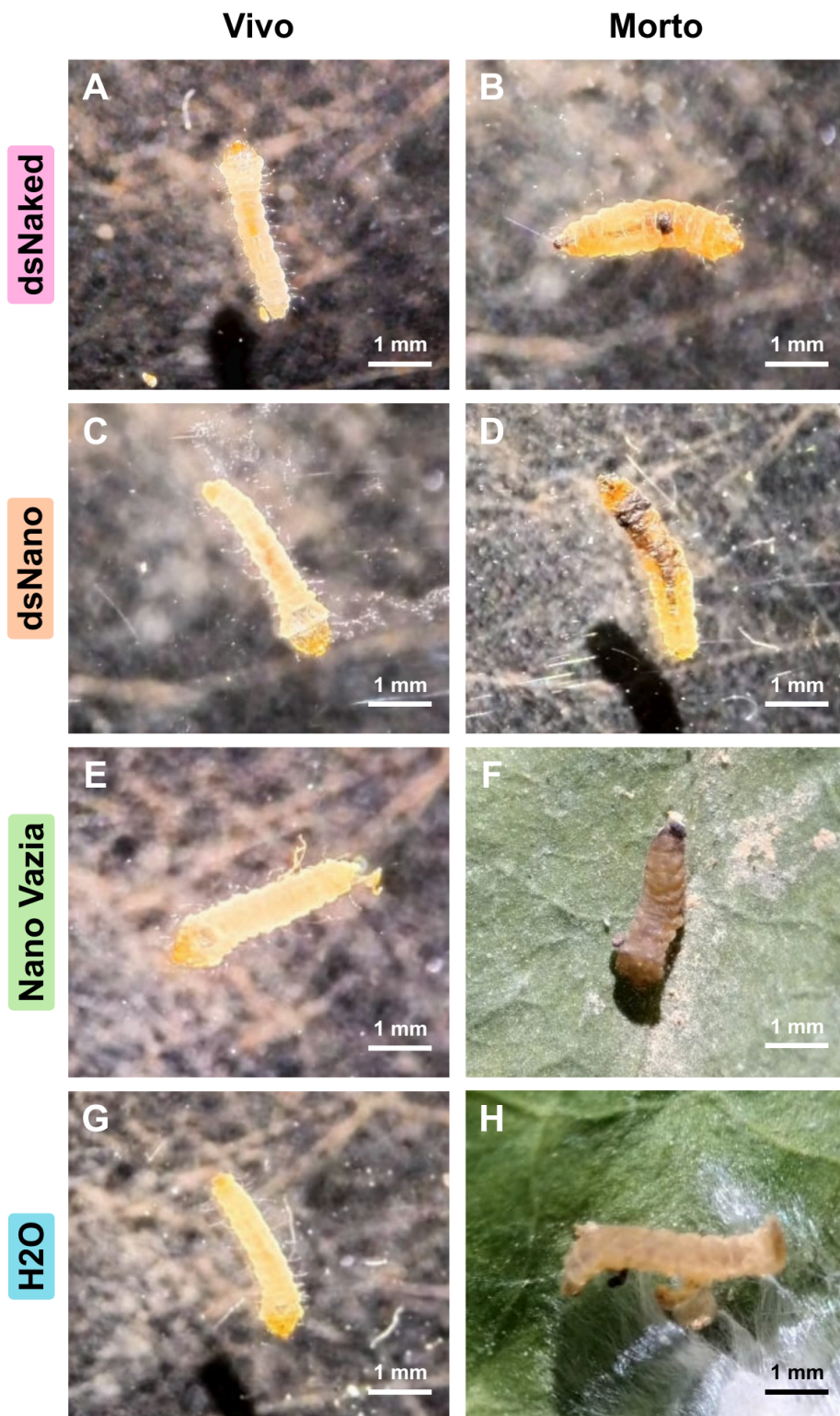


Figura 9: Caracterização fenotípica de larvas L4 de *Leucoptera coffeella* submetidas ao bioensaio de *soaking* para silenciamento do gene *notch*. As imagens ilustram o contraste entre indivíduos viáveis e a letalidade observada nos diferentes grupos experimentais em 96 horas após a exposição. (A) dsRNA *naked* - larva viva; (B) dsRNA *naked* - larva morta com deformações; (C) dsRNA nano - larva viva; (D) dsRNA nano - larva morta com

deformações; (E) Nanoformulação vazia - larva viva; (F) Nanoformulação vazia - larva morta e seca; (G) H₂O - larva viva; (H) H₂O - larva morta tentando iniciar o processo de formação de pupa.

Os tratamentos de controle, Nano Vazia e H₂O, apresentaram os menores valores de mortalidade nas primeiras 24 horas, o que potencialmente confirma a especificidade e os possíveis efeitos deletérios observados nos grupos tratados com o dsRNA. No entanto, nos grupos de 96 horas, a mortalidade se manteve igual para a Nanoformulação Vazia, mas o grupo tratado com H₂O apresentou um total de baixas igual ao grupo tratado com a formulação de dsRNA, indicando uma potencial sensibilidade do organismo do inseto à água após um longo tempo de incubação.

A acentuada mortalidade registrada no grupo controle tratado com H₂O após 96 horas de incubação evidencia a fragilidade biológica intrínseca do *L. coffeella* frente ao contato hídrico prolongado. Essa vulnerabilidade fisiológica corrobora observações clássicas da ecologia do inseto em campo descritas por Wolcott (1947), as quais identificam a pluviosidade como um dos determinantes primordiais da mortalidade natural da praga, visto que as minas foliares são permeáveis à água da chuva, acumulando líquido em seu interior e provocando o afogamento das larvas por asfixia durante períodos de precipitação intensa ou prolongada. Portanto, o método de soaking por tempo estendido simula uma condição de estresse hídrico letal que transcende a ação bioquímica do dsRNA, justificando a equivalência de baixas observada entre os grupos de longo prazo.

Os dados apresentados também indicaram que os efeitos do dsRNA no organismo do inseto alvo ocorrem dentro das primeiras 24 horas, visto que os grupos avaliados após 96 horas apresentavam uma taxa de mortalidade semelhante. Tal dado fortaleceu a necessidade de um experimento com uma curva de avaliação de 3 horas à 24 horas, onde os efeitos foram visualizados majoritariamente nas primeiras 3 horas (Gráfico 3).

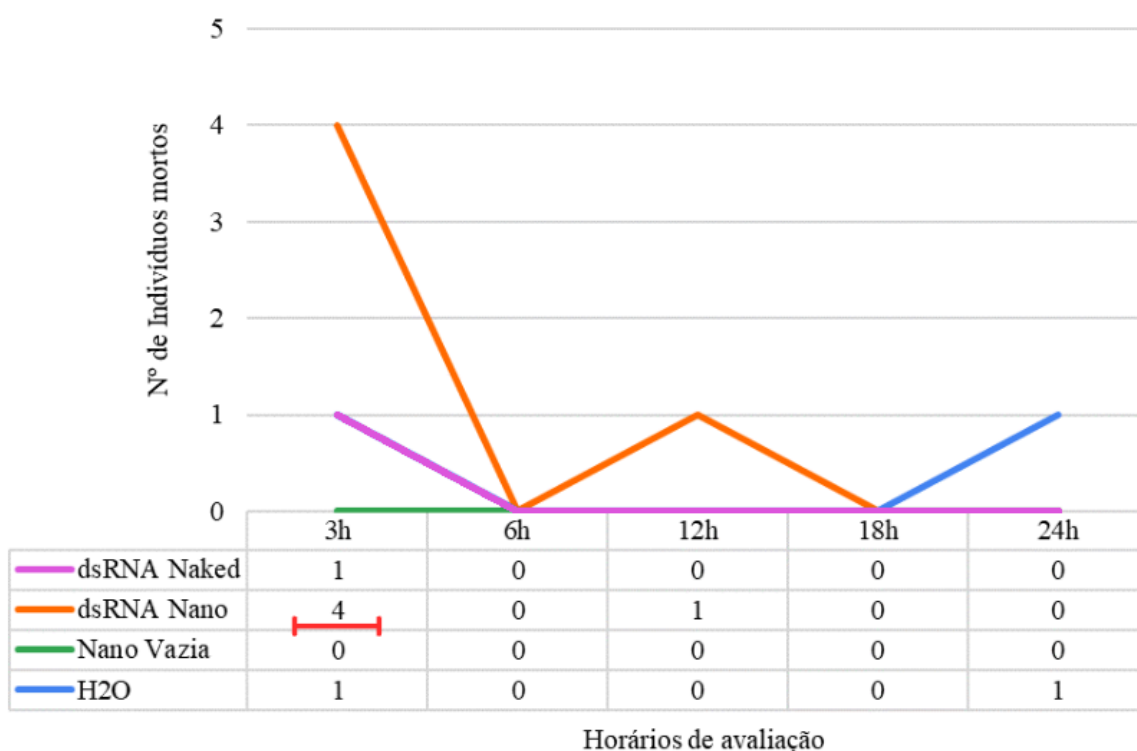


Gráfico 3: Taxa de mortalidade em números absolutos em larvas L4 de *L. coffeella* em curva de avaliação de 3, 6, 12, 18 e 24 horas após o bioensaio de *soaking*.

O experimento de curva de avaliação de curta duração (3h-24h), revelou que os efeitos letais do dsRNA *notch* se manifestaram rapidamente. No ensaio que utilizou 15 larvas por tratamento, o grupo dsRNA Nano apresentou 4 indivíduos mortos já nas primeiras 3 horas, e um total de 5 mortos até 24 horas. Em comparação, o grupo dsRNA *Naked* teve apenas 1 morto em 3 horas e nenhum outro óbito até 24 horas. Os controles (Nano Vazia e H2O) demonstraram baixa mortalidade nas 3 horas (0 e 1, respectivamente). A rapidez da resposta letal, especialmente com a nanoformulação, reforça a alta sensibilidade do *L. coffeella* ao silenciamento e a eficácia da entrega otimizada.

O impacto do silenciamento do gene *notch* no desenvolvimento larval e na metamorfose do *L. coffeella* foi monitorado pela contagem de formação de pupas nos tempos de 24 horas e 96 horas. O gene *notch* é reconhecido por seu papel fundamental em processos de desenvolvimento e determinação do destino celular em insetos, sendo um alvo crucial para estratégias de controle.

Os dados de formação de pupas estão ilustrados em Gráfico 4. Em todos os grupos tratados verificou-se que a metamorfose do inseto se deu majoritariamente no intervalo de 96 horas com maior formação em Nano Vazia e dsRNA *Naked*, indicando que o grupo controle

exposto apenas ao nanocarreador teve menor impacto e, por outro lado, possivelmente a ausência do nanocarreador associado à molécula de dsRNA causou a degradação da mesma no organismo do inseto. Por sua vez, o grupo dsRNA Nano exibiu menor quantidade de pupas formadas no total de indivíduos das 3 repetições, indicando possíveis efeitos de silenciamento no inseto e impacto no desenvolvimento.

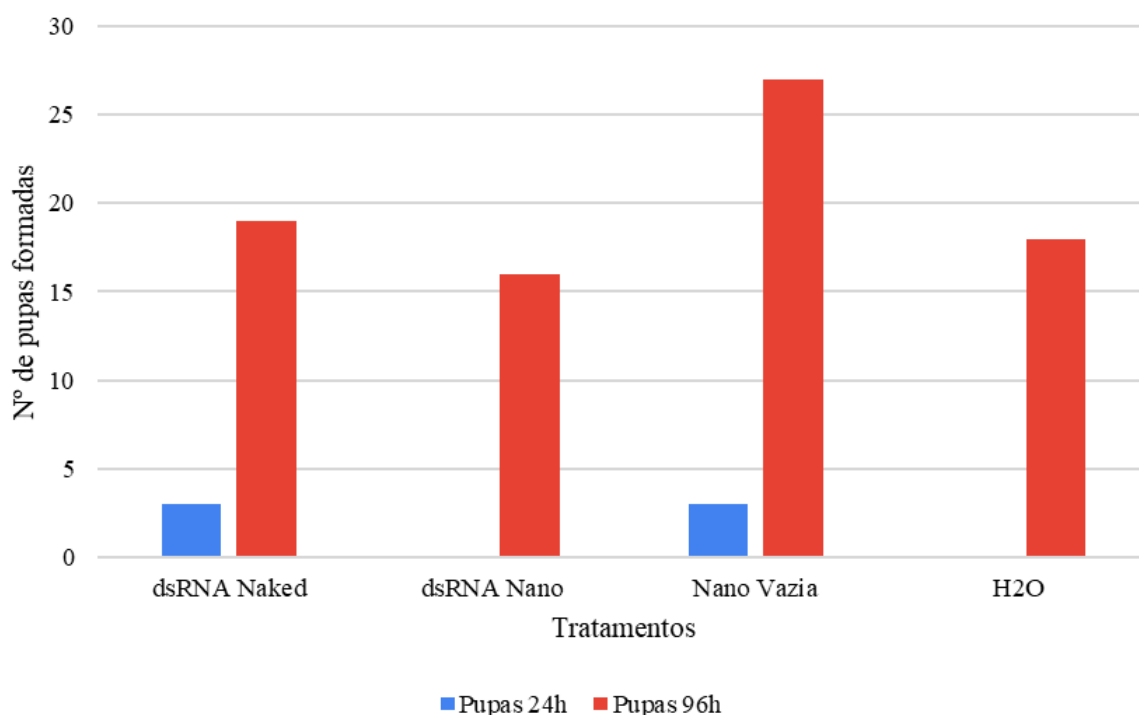


Gráfico 4: Representação da taxa de formação de pupas de *L. coffeella* em números absolutos após 24 horas e 96 horas do bioensaio de *soaking*. O resultado indica a disrupção do desenvolvimento larval após os diferentes tratamentos. Os dados são expressos em valores absolutos, referentes a um delineamento composto por três grupos de 10 indivíduos por tratamento em cada intervalo de tempo. Assim, cada ponto de avaliação (24 h e 96 h) totaliza 30 espécimes analisados, o que fundamenta a ausência de barras de erro e permite a observação direta da resposta biológica em cada pool amostral.

A comparação analítica entre os grupos tratados com dsRNA e os controles negativos (H₂O e Nano Vazia) no intervalo de 96 horas é imperativa para isolar o efeito biotecnológico do silenciamento gênico de variáveis de estresse e toxicidades inerentes ao carreador. O controle hídrico estabelece a linha de base para a vulnerabilidade fisiológica de *L. coffeella* ao contato prolongado com a água, condição que pode elevar a mortalidade natural, enquanto o controle de nanopartículas vazias permite descartar potenciais efeitos citotóxicos da quitosana. Essa diferenciação no ponto temporal de 96 horas evidencia a disrupção crônica da homeostase do inseto, manifestada pela drástica redução na formação de pupas e pela letalidade superior no grupo dsRNA Nano, consolidando a causalidade inequívoca entre a

interferência molecular no gene *notch* e o colapso do desenvolvimento larval para o controle sustentável da praga.

4.6 AVALIAÇÃO MOLECULAR DO SILENCIAMENTO GÊNICO DO GENE *NOTCH* POR RT-qPCR

A avaliação da eficácia do silenciamento gênico (RNAi) em *L. coffeella* requer a quantificação precisa da redução dos transcritos do gene alvo (*notch*). Devido à potencial instabilidade da molécula de dsRNA e à alta taxa de mortalidade observada em ensaios iniciais de cinética, que indicaram letalidade já nas primeiras horas de exposição (i.e., 3 horas), foi imperativo realizar ensaios de *soaking* de curta duração. Estes ensaios tiveram como objetivo capturar o momento inicial da absorção e processamento do dsRNA.

O ensaio de *soaking* de curta duração (2 horas) foi conduzido para capturar a cinética inicial de absorção (*uptake*) e o processamento primário do dsRNA, utilizando um pool de 10 larvas por tratamento. Os valores de ΔCt (Ciclo Limiar Normalizado), apresentados no Gráfico 5, permitem comparar a eficiência relativa de entrega entre as diferentes formulações. Esta métrica representa a expressão do gene *notch* normalizada pelo gene de referência utilizado, no caso o gene *EF1B*, corrigindo eventuais variações na quantidade inicial de RNA ou na eficiência da reação de cDNA entre as amostras.

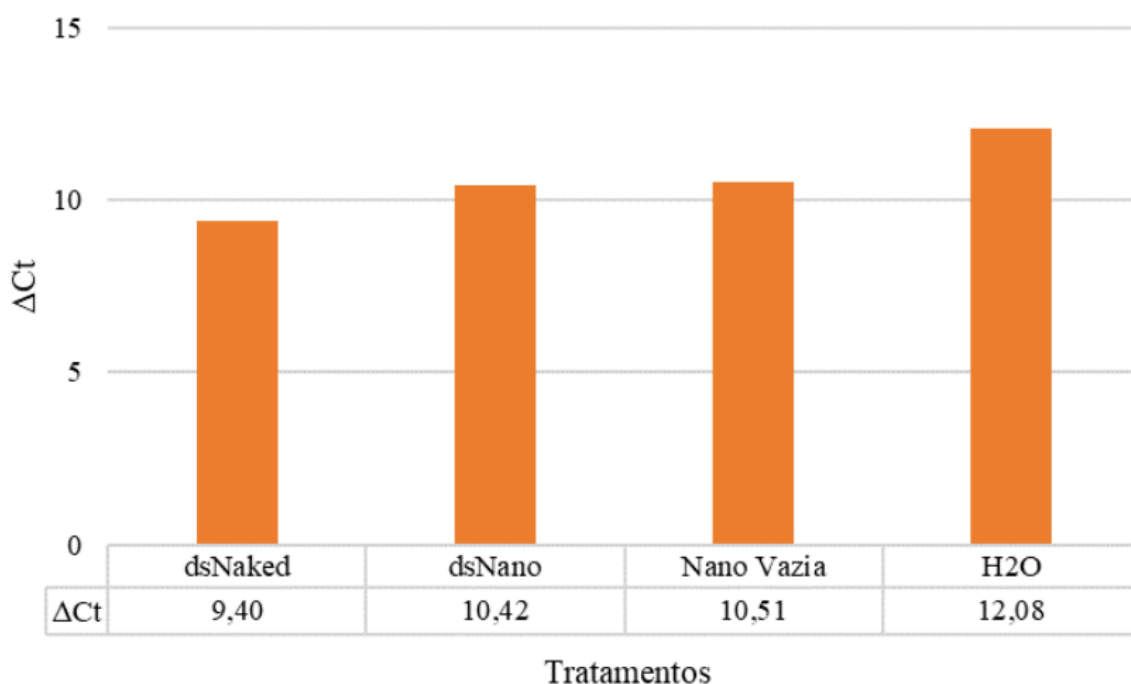


Gráfico 5: Valores de ΔCt para as amostras de larvas de *L. coffeella* no bioensaio de *soaking* de curta duração (2 horas). Os valores de ΔCt indicam a estabilidade da normalização pelo gene de referência *EF1B* (Elongation factor 1 beta) sob as condições de ensaio.

Neste intervalo de tempo agudo, a análise de 4 replicatas revelou que o tratamento dsRNA Nano apresentou um valor de ΔCt (10,42) superior ao do tratamento dsRNA Naked (9,40). Ressalta-se que, devido à limitação de material biológico viável decorrente da alta sensibilidade do inseto, este ensaio não permitiu o escalonamento para o cálculo de $\Delta\Delta Ct$ ou a aplicação de testes de inferência estatística (ANOVA e Tukey), restringindo-se a uma análise comparativa dos perfis de ΔCt . Contudo, considerando que um aumento no ΔCt reflete uma redução na abundância de transcritos do gene alvo, a tendência observada indica que a nanoformulação promoveu uma diminuição mais acentuada dos níveis de mRNA do gene notch em comparação ao dsRNA não formulado. Isso sugere que a associação com nanopartículas de quitosana otimizou a entrega da molécula evitando a degradação imediata, iniciando a cascata de interferência de forma mais eficiente já nas primeiras horas de contato.

A diferença observada em relação ao controle negativo (H_2O), que apresentou o maior ΔCt absoluto, pode ser atribuída à resposta fisiológica de estresse das larvas frente à introdução de material exógeno e componentes da formulação no curto prazo. Contudo, a comparação direta entre os tratamentos com dsRNA confirma a superioridade técnica da nanoformulação sobre a molécula nua no desencadeamento precoce do mecanismo de RNAi.

Paralelamente, foram realizados ensaios moleculares nas larvas coletadas nos tempos mais longos (24 horas e 96 horas) do experimento de *soaking*. Neste caso, a extração de RNA foi realizada em indivíduos isolados. Os valores de ΔCt obtidos para esses pontos temporais de 24h e 96h são apresentados em Gráfico 6. No entanto, a alta variabilidade biológica e a mortalidade observada após longos períodos de exposição comprometeram a estabilidade da normalização e a conclusividade deste ensaio de cinética mais longa.

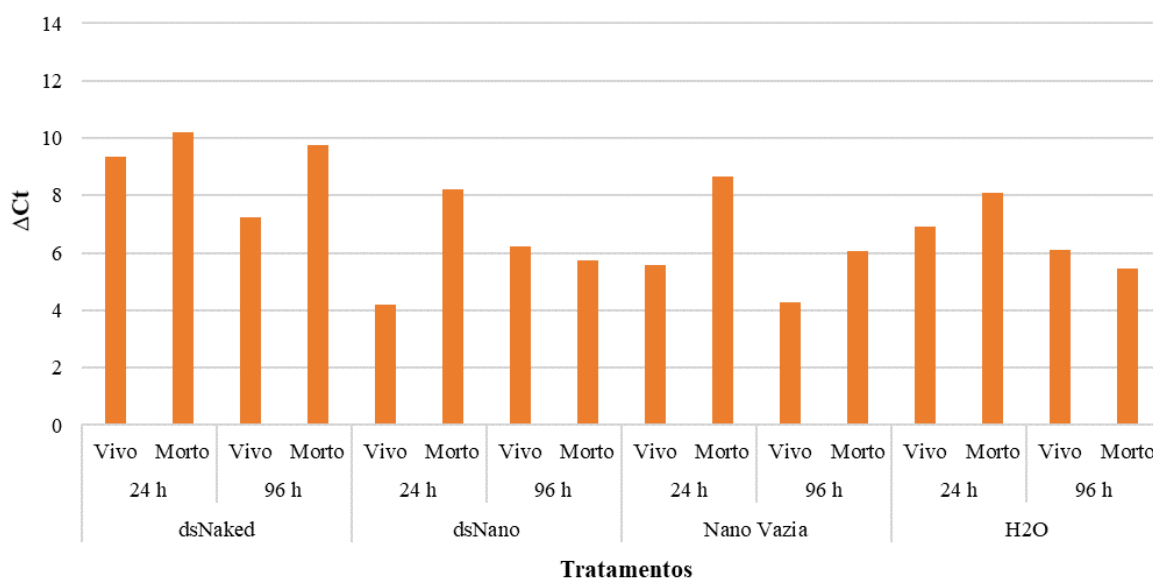


Gráfico 6: Representação dos valores de ΔC_t (Ciclo Limiar Normalizado) para as amostras de larvas de *L. coffeella* coletadas nos tempos de 24 horas e 96 horas do bioensaio de *soaking*. Os dados foram gerados a partir da extração de RNA de indivíduos isolados por tratamento.

5. DISCUSSÃO

A busca por estratégias de controle sustentável para o bicho-mineiro-do-cafeeiro (*L. coffeella*), dada a crescente resistência aos inseticidas convencionais, direcionou este estudo à avaliação da eficácia do silenciamento gênico por dsRNA de uso tópico, focando no gene *notch*. A tecnologia de RNAi baseia-se na especificidade de sequência, oferecendo uma alternativa de alta seletividade, essencial para o manejo integrado de pragas.

5.1 O GENE *NOTCH* COMO ALVO LETAL: ANÁLISE DO PERFIL CONSTITUTIVO E POTENCIAL COMO ALVO

A seleção do gene *notch* foi fundamentada em análises *in silico* que o identificaram como um gene de cópia única em Lepidoptera e altamente conservado no *L. coffeella*, um critério crucial para garantir a letalidade do alvo. A subsequente caracterização da expressão gênica por RT-qPCR confirmou que o gene *notch* é constitutivo, exibindo transcrição em todas as fases do ciclo de vida avaliadas (L4, pupa, macho e fêmea).

A expressão mais proeminente do *notch* na fase de pupa é coerente com a literatura, que atribui a este gene um papel essencial na metamorfose, diferenciação celular, neurogênese e desenvolvimento de apêndices em insetos lepidópteros. Essa ubiquidade de função, especialmente durante a transição larval para pupal e no desenvolvimento adulto, posiciona o

notch como um alvo molecular altamente sensível ao silenciamento, com a perda de sua função resultando em fenótipos deletérios e potencial letalidade.

5.2 EFICÁCIA FENOTÍPICA E O PAPEL DA NANOFORMULAÇÃO

O bioensaio de *soaking*, empregado como método de exposição sistêmica, revelou que o dsRNA direcionado ao *notch* é eficaz na indução de mortalidade e na interrupção do desenvolvimento larval. Os dados fenotípicos de 24 horas e 96 horas (Gráfico 2) indicaram que a formulação dsRNA Nano demonstrou maior letalidade (14 indivíduos mortos em 24 horas e outros 14 em 96 horas) em comparação com o dsRNA *Naked* (8 indivíduos mortos em 24h e outros 8 em 96 horas). Este aumento na eficácia sugere que a nanoformulação de quitosana conferiu proteção à molécula de dsRNA e otimizou sua entrega, um fator limitante conhecido em lepidópteros devido à atividade robusta de nucleases no trato digestivo. A quitosana, um polímero catiônico, é reconhecida por formar complexos estáveis com o dsRNA, protegendo-o da degradação biológica e facilitando a absorção celular.

A análise da taxa de formação de pupas (Gráfico 4) reforça a interrupção do desenvolvimento larval induzida pelo dsRNA *notch*. O grupo dsRNA Nano exibiu a menor quantidade total de pupas formadas em 96 horas, indicando um impacto significativo na metamorfose do inseto. A interrupção deste processo vital, diretamente ligada à função do gene *notch*, corrobora a estratégia de silenciamento.

É importante ressaltar a alta sensibilidade do *L. coffeella*, evidenciada tanto pela mortalidade precoce no grupo dsRNA Nano (dentro de 24 horas), quanto pela mortalidade no grupo H₂O em 96 horas reforçando o estresse hídrico letal após longos períodos, o que demonstra a fragilidade inerente deste organismo, uma limitação a ser considerada na interpretação de ensaios de longo prazo, além disso se fazendo necessário a adição de novos tratamentos de controle, como por exemplo, uma molécula de dsRNA de um gene exógeno. A observação de que os efeitos deletérios se manifestavam majoritariamente nas primeiras 24 horas, e até mesmo nas primeiras 3 horas (Gráfico 3), direcionou a avaliação molecular subsequente.

5.3 CONEXÃO ENTRE EFEITO FENOTÍPICO E MECANISMO MOLECULAR

A quantificação de transcritos, conduzida por RT-qPCR em larvas coletadas em apenas 2 horas de *soaking*, com extração de RNA em *pool* de 10 larvas, foi essencial para quantificar a redução dos transcritos do gene *notch* antes que a mortalidade severa pudesse comprometer

a qualidade do RNA (Gráfico 5). A análise dos valores de ΔC_t confirmou a estabilidade da normalização pelo gene de referência (*EF1B*).

Em contrapartida, os ensaios moleculares de cinética mais longa (24h e 96h), apresentados no Gráfico 6 (ΔC_t), realizados com extração de RNA em amostras de indivíduos isolados, não produziram resultados conclusivos, provavelmente devido à alta sensibilidade do *L. coffeella*, o que levou à mortalidade ou a alterações fisiológicas severas que afetaram a qualidade e estabilidade do RNA nas amostras individuais de longa duração.

5.4 PERSPECTIVAS E IMPLICAÇÕES

Em suma, este trabalho confirma o gene *notch* como um alvo promissor para o controle de *L. coffeella* e confirma a eficácia da formulação com nanocarreador na entrega e ação do dsRNA. Embora o silenciamento do *notch* tenha sido molecularmente confirmado e correlacionado à letalidade larval e interrupção do desenvolvimento, a ausência de sintomas visuais facilmente identificáveis, como atrofia de asas, sugere que investigações complementares, como a citolocalização por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), seriam necessárias para detalhar o mecanismo de ação.

Adicionalmente, os resultados obtidos com o *notch* reforçam a importância de prosseguir com a investigação de novos genes essenciais. Os genes *SNF7* e *AChE*, que já foram identificados e selecionados como candidatos promissores, devem ser submetidos a bioensaios de *soaking* e análise molecular para determinar sua eficácia intrínseca como ativos biotecnológicos.

Uma fronteira promissora de pesquisa é a aplicação de dsRNA em formulações de coquetel. A utilização de múltiplos alvos gênicos em uma única aplicação pode não apenas aumentar a eficácia letal, mas também é uma estratégia crucial para a gestão proativa da resistência, dificultando a evolução de mecanismos de escape por parte da praga. Além disso, a complexidade funcional da via de sinalização *notch* justifica a investigação aprofundada de outros genes que atuam a jusante (*downstream*) dessa via, identificando potenciais alvos moleculares secundários que possam ser mais sensíveis ao silenciamento.

Do ponto de vista fenotípico e ecológico, é crucial monitorar de forma detalhada o tempo de vida (*lifespan*) do *L. coffeella* submetido aos tratamentos, estendendo a avaliação além dos 96 horas, a fim de determinar o impacto dos dsRNAs na fecundidade e longevidade dos adultos emergentes, bem como na supressão completa do ciclo de vida.

O sucesso da estratégia de *soaking* de curta duração e a otimização da entrega por nanocarreadores abrem o caminho para a aplicação exógena (SIGS) do bioinseticida de dsRNA no controle sustentável do bicho-mineiro-do-cafeeiro. Nesse sentido, a busca por parcerias com empresas do setor de biopesticidas e biotecnologia agrícola é uma perspectiva crucial, visando otimizar os processos de produção em larga escala do dsRNA e das nanoformulações, facilitando a transição da pesquisa de bancada para a aplicação em campo. Ressalta-se que este trabalho possui potencial de proteção intelectual, o qual está sendo avaliado pela Embrapa.

BIBLIOGRAFIA

- ASHBURNER, Michael *et al.* Gene Ontology: tool for the unification of biology. **Nature Genetics**, v. 25, n. 1, p. 25–29, maio 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/75556>
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ (ABIC). **Indicadores da Indústria de Café**. Rio de Janeiro, 2025. Disponível em: <https://www.abic.com.br/estatisticas/indicadores-da-industria/>. Acesso em: 20 out. 2025.
- ASOKAN, R. *et al.* Effect of diet delivered various concentrations of double-stranded RNA in silencing a midgut and a non-midgut gene of *Helicoverpa armigera*. **Bulletin of Entomological Research**, v. 103, n. 5, p. 555–563, out. 2013. DOI: 10.1017/S0007485313000138
- ASOKAN, R. *et al.* Response of various target genes to diet-delivered dsRNA mediated RNA interference in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. **Journal of Pest Science**, v. 87, n. 1, p. 163–172, mar. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10340-013-0541-7>
- BROWN, Terry; MACKEY, Karol; DU, Tingting. Analysis of RNA by Northern and Slot Blot Hybridization. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 67, n. 1, jul. 2004. DOI: 10.1002/0471142727.mb0409s67
- BUELS, Robert *et al.* JBrowse: a dynamic web platform for genome visualization and analysis. **Genome Biology**, v. 17, n. 1, p. 66, dez. 2016. DOI: 10.1186/s13059-016-0924-1
- CAMARGO, Roberto A. *et al.* RNA interference as a gene silencing tool to control *Tuta absoluta* in tomato (*Solanum lycopersicum*). **PeerJ**, v. 4, p. e2673, 15 dez. 2016. DOI: 10.7717/peerj.2673
- CHALLIS, Richard J. *et al.* Lepbase: the Lepidopteran genome database. **bioRxiv**, 6 jun. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/056994>
- CHEN, Yao *et al.* Notch Signaling in Insect Development: A Simple Pathway with Diverse Functions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 18, p. 14028, 13 set. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms241814028>

CHRISTIAENS, Olivier *et al.* Increased RNAi Efficacy in *Spodoptera exigua* via the Formulation of dsRNA With Guanylated Polymers. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 316, 4 abr. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00316>

CHRISTIAENS, Olivier *et al.* Double-Stranded RNA Technology to Control Insect Pests: Current Status and Challenges. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 451, 21 abr. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00451>

CONAB, C. N. DE A. Café | Safra 2025 2º Levantamento. **Acompanhamento da safra brasileira de café**. v. 12, n. 2, p. 1-56, mai. 2025. Disponível em: <<https://www.gov.br/conab/pt-br/atuacao/informacoes-agropecuarias/safras/safra-de-cafe/2o-levantamento-de-cafe-safra-2025/boletim-cafe-maio-2025>>. Acesso em: 17 set. 2025.

COOPER, Anastasia Mw *et al.* Molecular mechanisms influencing efficiency of RNA interference in insects. **Pest Management Science**, v. 75, n. 1, p. 18–28, jan. 2019. DOI: 10.1002/ps.5126

COSTA, J. N. M. *et al.* Informações para facilitar a identificação das diferentes fases do bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) em campo. **Comunicado Técnico Embrapa**, Porto Velho, 384, out. 2012. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1010232/informacoes-para-facilitar-a-identificacao-das-diferentes-fases-do-bicho-mineiro-leucoptera-coffeella-em-campo>>. Acesso em: 26 set. 2025.

DA SILVA, Brenda K. R. *et al.* Spatial and dynamic distribution of *Chrysoperla spp.* and *Leucoptera coffeella* populations in coffee *Coffea arabica* L. **Precision Agriculture**, v. 25, n. 1, p. 327–346, fev. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11119-023-10070-4>

DANTAS, Juliana *et al.* A Comprehensive Review of the Coffee Leaf Miner *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae)—A Major Pest for the Coffee Crop in Brazil and Others Neotropical Countries. **Insects**, v. 12, n. 12, p. 1130, 17 dez. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/insects12121130>

DE CASTRO, Giovanni M. *et al.* Cross-species prediction of essential genes in insects. **Bioinformatics**, v. 38, n. 6, p. 1504–1513, 4 mar. 2022. DOI: 10.1093/bioinformatics/btac009

DE SOUZA, Júlio C.; REIS, Paulo R.; JÚNIOR, Américo I. C. Eficiência de thiamethoxam no controle do Bicho-Mineiro do Cafeeiro. II - Influência da época de aplicação via irrigação por gotejamento. **Coffee Science**, v. 1, n. 2, 2006. DOI: 10.5555/20093194048

DHANDAPANI, Ramesh K.; DUAN, Jian J.; PALLI, Subba R. Orally delivered dsRNA induces knockdown of target genes and mortality in the Asian long-horned beetle, *Anoplophora glabripennis*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 104, n. 4, p. e21679, ago. 2020. DOI: 10.1002/arch.21679

DIAS, N. P. *et al.* Insecticidal Gene Silencing by RNAi in the Neotropical Region. **Neotropical Entomology**, v. 49, n. 1, p. 1–11, fev. 2020. DOI: 10.1007/s13744-019-00722-4

DUNN, Nathan A. *et al.* Apollo: Democratizing genome annotation. **PLOS Computational Biology**, v. 15, n. 2, p. e1006790, 6 fev. 2019. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1006790

DUVAUD, Séverine *et al.* Expasy, the Swiss Bioinformatics Resource Portal, as designed by its users. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. W1, p. W216–W227, 2 jul. 2021. DOI: 10.1093/nar/gkab225.

FABRICK, Jeffrey A.; KANOST, Michael R.; BAKER, James E. RNAi-induced silencing of embryonic tryptophan oxygenase in the Pyralid moth, *Plodia interpunctella*. **Journal of Insect Science**, [S.d.]. DOI: 10.1093/jis/4.1.15

FIRE, Andrew *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, 391, p. 806-811, 19 fev. 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/35888>

GARCIA, Rayssa A. *et al.* Nucleases as a barrier to gene silencing in the cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*. **PLOS ONE**, v. 12, n. 12, p. e0189600, 20 dez. 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0189600

GILLET, François-Xavier *et al.* Investigating Engineered Ribonucleoprotein Particles to Improve Oral RNAi Delivery in Crop Insect Pests. **Frontiers in Physiology**, v. 8, p. 256, 28 abr. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00256>

GOLDBERG, Jay K. *et al.* A draft genome assembly of the agricultural pest *Leucoptera coffeella* and analysis of its dsRNA processing machinery is a key step towards RNAi-based biopesticides in Lepidoptera. **bioRxiv**, 31 jul. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2025.07.28.667214>

HAN, Shipeng *et al.* Selection and Evaluation of Reference Genes for qRT-PCR in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Insects**, v. 12, n. 10, p. 902, 3 out. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/insects12100902>

HE, Li; HUANG, Yanna; TANG, Xueming. RNAi-based pest control: Production, application and the fate of dsRNA. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, p. 1080576, 29 nov. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1080576>

HUVENNE, Hanneke; SMAGGHE, Guy. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review. **Journal of Insect Physiology**, v. 56, n. 3, p. 227–235, mar. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.10.004>

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. Coffee Year 2023/24 | Paving the way for a sustainable future through coffee diplomacy. **Annual Review**. Londres, 2024. Disponível em: <https://ico.org/annual-review/>. Acesso em: 11 out. 2025.

JUNQUEIRA, Camila. I. C. V. F. *et al.* Molecular Diagnostics for Monitoring Insecticide Resistance in Lepidopteran Pests. **Agronomy**, v. 14, n. 11, p. 2553, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/agronomy14112553>

KAWAHARA, Akito Y. *et al.* Phylogenomics reveals the evolutionary timing and pattern of butterflies and moths. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 45, p. 22657–22663, 5 nov. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1907847116>

LASHERMES, P. *et al.* Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 261, n. 2, p. 259–266, mar. 1999. DOI: 10.1007/s004380050965

LEITE, Suzany A. *et al.* Area-Wide Survey of Chlorantraniliprole Resistance and Control Failure Likelihood of the Neotropical Coffee Leaf Miner *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 113, n. 3, p. 1399–1410, 6 jun. 2020. DOI: 10.1093/jee/toaa017

LEITE, Suzany A. *et al.* Time-concentration interplay in insecticide resistance among populations of the Neotropical coffee leaf miner, *Leucoptera coffeella*. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 23, n. 2, p. 232–241, maio 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/afe.12425>

LU, Yanhui *et al.* Identification and Validation of Reference Genes for Gene Expression Analysis Using Quantitative PCR in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e68059, 9 jul. 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0068059

LUCENA-LEANDRO, Vivian S. *et al.* Current Scenario of Exogenously Induced RNAi for Lepidopteran Agricultural Pest Control: From dsRNA Design to Topical Application. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 24, p. 15836, 13 dez. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms232415836>

MARQUES, Kulian B. S. C. *et al.* Diversity of Hymenopteran Parasitoids in Coffee Plantations under Agroecological Transition and Its Impact on Coffee Leaf Miner (*Leucoptera coffeella*) Infestations. **Diversity**, v. 15, n. 1, p. 2, 20 dez. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/d15010002>

MARTINS, Natalia *et al.* Paving the Way for Gene Silencing in Lepidoptera: Integrated Sequencing Data Unveil the Rnai Core Machinery of *Leucoptera Coffeella*. **Preprints**, 29 ago. 2022. DOI:10.20944/preprints202208.0465.v1

MATIELLO, Jose B. *et al.* Cultura do café no Brasil: manual de recomendações ed. 2015. **Futurama Editora**, v. 1, 2016.

MEI, Yang *et al.* InsectBase 2.0: a comprehensive gene resource for insects. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. D1, p. D1040–D1045, 7 jan. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1090>

MELLO, Craig C. Return to the RNAi World: Rethinking Gene Expression and Evolution (Nobel Lecture). **Cell Death & Differentiation**, v. 14, p. 2013–2020, 16 nov. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402252>

MENDOZA-ALATORRE, Maribel *et al.* RNAi in Pest Control: Critical Factors Affecting dsRNA Efficacy. **Insects**, v. 16, n. 7, p. 737, 18 jul. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/insects16070737>

MITTER, Neena *et al.* Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses. **Nature Plants**, v. 3, n. 2, p. 16207, 9 jan. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.207>

MOTTA, I. O. et al. The coffee leaf miner, *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae): identification of the larval instars and description of male and female genitalia. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 65, n. 3, e20200122, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1806-9665-RBENT-2020-0122>

NI, Jian-Quan *et al.* Vector and parameters for targeted transgenic RNA interference in *Drosophila melanogaster*. **Nature Methods**, v. 5, n. 1, p. 49–51, jan. 2008. DOI: 10.1038/nmeth1146

NI, Jian-Quan *et al.* A *Drosophila* Resource of Transgenic RNAi Lines for Neurogenetics. **Genetics**, v. 182, n. 4, p. 1089–1100, 1 ago. 2009. DOI: 10.1534/genetics.109.103630

NISHIDE, Yudai *et al.* Effectiveness of orally-delivered double-stranded RNA on gene silencing in the stinkbug *Plautia stali*. **PLOS ONE**, v. 16, n. 1, p. e0245081, 14 jan. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245081>

NIU, Jinzhi *et al.* Beyond insects: current status and achievements of RNA interference in mite pests and future perspectives. **Pest Management Science**, v. 74, n. 12, p. 2680–2687, dez. 2018. Disponível em: DOI: 10.1002/ps.5071

ORTOLÁ, Beltrán; DARÒS, José-Antonio. RNA Interference in Insects: From a Natural Mechanism of Gene Expression Regulation to a Biotechnological Crop Protection Promise. **Biology**, v. 13, n. 3, p. 137, 21 fev. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biology13030137>

PINHEIRO, Daniele H. *et al.* Delivery of gene-specific dsRNA by microinjection and feeding induces RNAi response in Sri Lanka weevil, *Myloccerus undecimpustulatus undatus* Marshall. **Pest Management Science**, v. 76, n. 3, p. 936–943, mar. 2020. DOI: 10.1002/ps.5601

RANCUREL, Corinne *et al.* SATQPCR: Website for statistical analysis of real-time quantitative PCR data. **Molecular and Cellular Probes**, v. 46, p. 101418, ago. 2019. DOI: 10.1016/j.mcp.2019.07.001

REDDY, N. Veeramanikanta *et al.* Apprehending siRNA Machinery and Gene Silencing in Brinjal Shoot and Fruit Borer, *Leucinodes orbonalis*. **Archives of Insect Biochemistry and**

Physiology, v. 118, n. 1, p. e70029, jan. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/arch.70029>

RODRIGUES, Thais B. *et al.* First Sprayable Double-Stranded RNA-Based Biopesticide Product Targets Proteasome Subunit Beta Type-5 in Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata*). **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 728652, 18 nov. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.728652>

SANTOS-ORTEGA, Yulica; FLYNT, Alex. Double-Strand RNA (dsRNA) Delivery Methods in Insects: Diaphorina citri. *In*: VASCHETTO, Luis María (Org.). **RNAi Strategies for Pest Management**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer US, 2022. v. 2360 p. 253–277. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1633-8_19

SHARATH CHANDRA, Gaddelapati *et al.* Enhancing RNAi by using concatemerized double-stranded RNA. **Pest Management Science**, v. 75, n. 2, p. 506–514, fev. 2019. DOI: 10.1002/ps.5149

SHEN, Chen-Hui *et al.* Reference Genes for Expression Analyses by qRT-PCR in Phthorimaea operculella (Lepidoptera: Gelechiidae). **Insects**, v. 13, n. 2, p. 140, 28 jan. 2022. DOI: 10.3390/insects13020140

SONNHAMMER, Erik L. L.; EDDY, Sean R.; DURBIN, Richard. Pfam: A comprehensive database of protein domain families based on seed alignments. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, v. 28, n. 3, p. 405–420, jul. 1997. DOI: 10.1002/(sici)1097-0134(199707)28:3<405::aid-prot10>3.0.co;2-l

UNTERGASSER, Andreas *et al.* Primer3—new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 15, p. e115–e115, ago. 2012. DOI: 10.1093/nar/gks596

VOGEL, Elise *et al.* RNA Interference in Insects: Protecting Beneficials and Controlling Pests. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 1912, 11 jan. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01912>

WANG, Guandi *et al.* Effects of Double-Stranded RNA Degrading Nucleases on RNAi Efficiency in Beet Moth Spodoptera exigua (Lepidoptera: Noctuidae). **Insects**, v. 16, n. 2, p. 229, 19 fev. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/insects16020229>

WANG, Liuyang *et al.* Validation and Evaluation of Reference Genes for Quantitative Real-Time PCR Analysis in *Mythimna loreyi* (Lepidoptera: Noctuidae). **Insects**, v. 15, n. 3, p. 185, 10 mar. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/insects15030185>

WANG, Xiaodi *et al.* A promising approach to an environmentally friendly pest management solution: nanocarrier-delivered dsRNA towards controlling the destructive invasive pest *Tuta absoluta*. **Environmental Science: Nano**, v. 10, n. 4, p. 1003–1015, 2023. Disponível em: DOI <https://doi.org/10.1039/D2EN01076C>

WANG, Zhibo *et al.* Application technology of the sex pheromone of the tea geometrid *Ectropis grisescens* (Lepidoptera: Geometridae). **International Journal of Pest Management**, v. 64, n. 4, p. 372–378, 2 out. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09670874.2018.1447170>

WOLCOTT, G. N. A quintessence of sensitivity: the coffee leaf-miner. **Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, v. 31, p. 215-219, 1947.

YANG, Wenling *et al.* Advances in nanocarriers to improve the stability of dsRNA in the environment. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, p. 974646, 16 ago. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.974646>

YU, Xiudao; KILLINY, Nabil. The secreted salivary proteome of Asian citrus psyllid *Diaphorina citri*. **Physiological Entomology**, v. 43, n. 4, p. 324–333, dez. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/phen.12263>

ZHAO, Xiaoyu *et al.* Reference Genes for Expression Analysis Using RT-qPCR in *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Insects**, v. 13, n. 11, p. 1046, 13 nov. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/insects13111046>

ZOTTI, Moises *et al.* RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes. **Pest Management Science**, v. 74, n. 6, p. 1239–1250, jun. 2018. DOI: 10.1002/ps.4813