

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

LEONARDO ZIMMERMANN RODRIGUES

**Aplicação de dsRNA sintético ou associado a nanocarreadores de
zeína para controle de *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) por RNAi**

Piracicaba

2023

LEONARDO ZIMMERMANN RODRIGUES

Aplicação de dsRNA sintético ou associado a nanocarreadores de zeína para controle de *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) por RNAi

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira

**Piracicaba
2023**

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Zimmermann Rodrigues, L.

Aplicação de dsRNA sintético ou associado a nanocarreadores de zeína para controle de *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) por RNAi / Leonardo Zimmermann Rodrigues; Antonio Vargas de Oliveira Figueira. - - Piracicaba, 2023.

163 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2023.

1. Fitopatógenos 2. Insetos nocivos 3. Melhoramento genético vegetal 4. Micro-Tom 5. Nanobiotecnologia 6. Silenciamento gênico 7. Traça-do-tomateiro I. Título

CDU (602.8 + 632.9) : 595.782

Elaborada por:

Marília Ribeiro Garcia Henyei

CRB-8/3631

Resolução CFB N° 184 de 29 de setembro de 2017

Aos que estiveram comigo ao longo dessa trajetória,
dedico.

AGRADECIMENTOS

Às entidades que me iluminam, me regem e me guardam.

Aos familiares que me apoiaram e me motivaram.

Aos amigos da República Boia-fria, pela amizade e fraternidade.

Ao Prof. Dr. Antonio Figueira, pelos ensinamentos, conselhos e confiança.

Aos técnicos do Laboratório de Melhoramento de Plantas do CENA-USP, Felipe Campana, Paulo Cassieri e Wlamir Godoy, pelo suporte oferecido.

Aos colegas de laboratório, Albânia Torres, Ana Júlia Rodrigues, André Iuanami, André Pinheiro, Angélica Vargas, Anieli Baldo, Bruna Factor, Danielle Scotton, Daniele Paschoal, Eder Silva, Gabriel Siqueira, Gyanlucca Martins, João Vitor Mendes, Karoline Armando, Laura Cazetta, Lorena dos Reis, Lucas Melotto, Matheus Salvador, Maria Helena Pereira, Rafael Monteiro, e, em especial, ao Gabriel Ragazzo, à Larissa Costa de Souza e ao Sr. Bruno Navarro, pelo acolhimento, conselhos e incentivos.

Ao Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto, do Laboratório de Nanotecnologia Ambiental (UNESP-Sorocaba), e ao Dr. Anderson Espirito Santo, pela estimada colaboração para a execução do projeto.

Ao Prof. Dr. José Roberto Postali Parra, do Laboratório de Biologia de Insetos (ESALQ-USP), à técnica Neide Zério, ao Dr. Flávio Cardoso Montes e ao doutorando Paolo Mendoza, pela atenção e suporte com a criação de *Tuta absoluta*.

A Profa. Dra. Helaine Carrer, do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular de Plantas (ESALQ-USP), e a técnica Valentina de Fátima Orelli, pelo uso dos equipamentos de laboratório.

Ao Prof. Hudson Carvalho, do Laboratório de Instrumentação Nuclear (CENA-USP), e ao doutorando Gabriel Montanha, pelo suporte nos experimentos de rastreamento de nanopartículas em insetos.

Ao Prof. Dr. Ítalo Delalibera Júnior, do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano (ESALQ-USP), e à Dra. Natasha Iwanicki, pela ajuda nos experimentos de pulverização foliar.

Ao Prof. Dr. Humphrey Yiu, da Universidade de Heriot-Watt (Escócia, Reino Unido), pela colaboração e pelo fornecimento das nanopartículas de óxido de ferro.

Ao Prof. Dr. Ernani Pinto, do Laboratório de Biogeoquímica Ambiental (CENA-USP), e a mestrandia Jéssica Fadul, pela doação do inseticida comercial.

Aos funcionários do CENA-USP, em especial, aos das seções de Transporte e Manutenção, de Convênios, de Contabilidade, da Diretoria e da Secretaria de Pós-Graduação, por todo suporte.

Ao CENA e à USP, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Ensino Superior) - Código de Financiamento 001, pela concessão do auxílio financeiro.

A todos que participaram e contribuíram para meu desenvolvimento profissional e pessoal durante esses anos de mestrado.

"O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem."

Guimarães Rosa

RESUMO

ZIMMERMANN RODRIGUES, L. **Aplicação de dsRNA sintético ou associado a nanocarreadores de zeína para controle de *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) por RNAi.** 2023. 163 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2023.

O silenciamento gênico por RNA de interferência (RNAi) pode ser uma alternativa segura e sustentável para o controle da traça-do-tomateiro (*Tuta absoluta*), uma praga que causa prejuízos à produção de tomate pela destruição de folhas e frutos, além de facilitar infecções por patógenos. Novas tecnologias para a produção em larga escala de dsRNA *in vitro* têm reduzido os custos e tornado o desenvolvimento de biopesticidas à base de dsRNA sintéticos mais atraente. No entanto, a rápida degradação do dsRNA no ambiente e a baixa absorção celular em insetos são fatores limitantes que afetam a eficácia do controle de pragas por RNAi empregando dsRNA sintético. Todavia, estudos sugerem que a associação do dsRNA a nanocarreadores poderia superar essas limitações. Neste contexto, investigamos a eficácia da aplicação foliar de dsRNA sintético ou associado a nanocarreadores de zeína (nZ) em tomateiro Micro-Tom (MT) contra *T. absoluta*. Em ambos os casos foi utilizado dsRNA sintético homólogo a regiões dos genes *arginina kinase* (AK) ou *ATPase vacuolar subunidade A* (ATPase), além do *Green Fluorescent Protein* (GFP) como controle. A pulverização de nZ-dsRNA em MT não apresentou eficácia contra *T. absoluta* quando comparado ao dsRNA sintético (não-carreado), que causou alta mortalidade larval, redução do peso das larvas ou do dano foliar em MT. Por outro lado, nZ-dsRNA apresentou um potencial efeito para controle de *T. absoluta* na fase de ovo, o que não foi observado pelo dsRNA sintético (não-carreado). Por meio de microscopia confocal, foi confirmada a habilidade do dsRNA sintético ou nZ-dsRNA em penetrar as folhas e serem ingeridos por larvas, bem como a capacidade de absorção radicular e translocação do dsRNA sintético ou do nZ-dsRNA na planta, o que indica uma possível alternativa para o controle da praga pela entrega de dsRNA via radicular, embora a exposição de nZ via raízes possa ter prejudicado o tomateiro MT.

Palavras-chave: Biopesticidas. Micro-Tom. Nanobiotecnologia. Silenciamento gênico. Traça-do-tomateiro.

ABSTRACT

ZIMMERMANN RODRIGUES, L. **Application of synthetic dsRNA or associated with zein nanocarriers to control *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) by RNAi**. 2023. 163 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2023.

Gene silencing by RNA interference (RNAi) can be a safe and sustainable alternative to control the tomato leafminer (*Tuta absoluta*), one of the most serious pests of tomato production that causes significant damage by destroying leaves and fruits and facilitating infections by pathogens. Recently, new technologies for large-scale in vitro production of dsRNA have reduced costs and made the development of biopesticides based on synthetic dsRNA an attractive option. However, the rapid environmental degradation of synthetic dsRNA and low cellular uptake in insects are limiting factors that may affect the efficacy of pest control by RNAi. Nonetheless, studies indicate that the use of nanocarriers can overcome these limitations. In this context, we investigated the efficacy of foliar application of synthetic dsRNA or dsRNA associated with zein nanocarriers (nZ) in tomato Micro-Tom (MT) against *T. absoluta*. In both cases, synthetic dsRNA homologous to the target genes *arginine kinase* (*AK*) or *vacuolar ATPase* (*ATPase*), and *Green Fluorescent Protein* (*GFP*) as a control gene, were used. Spraying nZ-dsRNA on tomato plants did not show effective control of the tomato leafminer when compared to non-carried synthetic dsRNA, which caused high larval mortality, significant reduction in larval weight, or foliar damage in tomato MT. On the other hand, nZ-dsRNA showed a potential effect to control *T. absoluta* in the egg phase, which was not observed by non-carried synthetic dsRNA. Additionally, the ability of synthetic dsRNA or nZ-dsRNA to penetrate leaves and be ingested by larvae was confirmed, as well as the ability of the tomato root to absorb synthetic dsRNA or nZ-dsRNA and translocate them to the leaves, which indicates a possible alternative for pest control by RNAi through the delivery of synthetic dsRNA via the root system. However, a toxicity assay suggested that nZ root uptake may be harmful to tomato plant.

Keywords. Biopesticides. Gene silencing. Micro-Tom. Nanobiotechnology. Tomato leafminer.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Biotecnologia aplicada ao controle de pragas	17
2.1.1 Mecanismo de RNA de interferência	20
2.1.2. Controle de pragas por RNAi	23
2.1.3 Limitações no controle de pragas por RNAi	27
2.1.4 dsRNA sintético associado a nanocarreadores	30
2.2 Avanços no controle da traça-do-tomateiro por RNAi	33
REFERÊNCIAS	39
3. CONTROLE DA TRAÇA-DO-TOMATEIRO POR dsRNA SINTÉTICO	56
Resumo	56
Abstract	57
3.1 Introdução	58
3.2 Materiais e métodos	59
3.2.1 Criação da traça-do-tomateiro	59
3.2.2 Escolha dos genes-alvos de <i>T. absoluta</i> para silenciamento gênico	59
3.2.3 Aquisição do dsRNA sintético	60
3.2.4. Entrega de dsRNA sintético a <i>T. absoluta</i>	60
3.2.4.2 Pulverização em tomateiro “Micro-Tom”	63
3.2.5 Detecção de dsRNA sintético por microscopia confocal	66
3.2.6 Análises estatísticas	66
3.3 Resultados e discussão	67
3.3.1 Controle de <i>T. absoluta</i>	67
3.3.2 Microscopia confocal de escaneamento a laser	78
3.4 Conclusão	88
Referências	88
4. dsRNA SINTÉTICO ASSOCIADO A NANOCARREADORES DE ZEÍNA PARA CONTROLE DE <i>Tuta absoluta</i>	94
Resumo	94
Abstract	95
4.1 Introdução	96
4.2 Materiais e métodos	97

4.2.1 Obtenção de nanocarreadores de zeína (nZ)	97
4.2.2 Associação do dsRNA sintético a nZ (nZ-dsRNA).....	98
4.2.3 Pulverização do nZ-dsRNA em tomateiro “Micro-Tom”	100
4.2.4 Avaliação do potencial ovicida do nZ-dsRNA	101
4.2.5 Detecção de nZ-dsRNA por microscopia confocal	101
4.2.6 Efeitos do nZ em tomateiro Micro-Tom.....	102
4.2.7 Análises estatísticas	103
4.3 Resultados e discussão	104
4.3.1 Caracterização físico-química e molecular	104
4.3.3 Controle de <i>T. absoluta</i> por nZ-dsRNA.....	113
4.3.4 Microscopia confocal de escaneamento a laser	128
4.3.5 Toxicidade de zeína ao tomateiro MT	141
4.4 Conclusão	144
Referências.....	145
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	154
APÊNDICES	157
ANEXOS.....	161

1. INTRODUÇÃO

A segurança alimentar é uma preocupação global cada vez mais urgente, especialmente à medida que a população mundial continua a crescer e a demanda por alimentos aumenta, aliada a ameaças de mudanças climáticas (TANING et al., 2021). As crescentes preocupações com o impacto dos pesticidas químicos no ambiente e na saúde humana têm pressionado por novos métodos de controle de pragas agrícolas mais sustentáveis (ALBUQUERQUE et al., 2016; RANI et al., 2021).

Nesse contexto, a biotecnologia tem desempenhado um papel significativo na produção de alimentos mais seguros e ambientalmente mais amigáveis (HAMDAN et al., 2022). Desde a década de 1990, plantas transgênicas que expressam proteínas com propriedades inseticidas, as toxinas Cry, também conhecidas como plantas Bt, têm sido amplamente usadas no controle de pragas agrícolas, especialmente lepidópteros (KOCH et al., 2015). No entanto, evidências indicam que as plantas Bt podem favorecer a evolução de resistência de insetos às toxinas Cry e há riscos a biodiversidade em razão do potencial fluxo gênico com espécies selvagens (BRESSAN et al., 2020; OMOTO et al., 2016). Ao mesmo tempo, há um custo elevado e obstáculos na comercialização das plantas Bt devido à rejeição aos organismos geneticamente modificados (OGM) pela população (ADDEY, 2020; BEGHIN; GUSTAFSON et al., 2021).

A tecnologia de silenciamento gênico por RNA de interferência (RNAi) é apontada como uma alternativa viável e sustentável para o controle de pragas e doenças (TANING et al., 2021). O RNAi é um mecanismo altamente conservado em organismos eucariotos que permite a regulação da expressão gênica após a transcrição a partir da interceptação e destruição ou bloqueio dos RNAs mensageiros (mRNAs) antes da tradução de proteínas (PEREIRA, 2013).

Os mecanismos do RNAi foram primeiramente esclarecidos por FIRE et al. (1998), que demonstraram o potencial do uso de moléculas de RNA dupla-fita (dsRNA) para regular a expressão gênica do nematoide *Caenorhabditis elegans*. No entanto, o desenvolvimento da tecnologia de RNAi para controle de pragas enfrenta desafios relacionados às diferenças na resposta ao silenciamento gênico entre as diferentes ordens de insetos (RODRIGUES; FIGUEIRA, 2016). As pragas lepidópteras apresentam-se como recalcitrantes ao silenciamento gênico por RNAi, em relação a outras ordens de insetos (TERENIUS et al., 2011). Isso pode ser atribuído à ação de ribonucleases específicas para dsRNAs e à alcalinidade do intestino médio desses

insetos, que degradam precocemente os dsRNAs, bem como a ausência de homólogos de proteínas envolvidas na absorção celular de dsRNA, limitando o potencial de controle dessas espécies pela ingestão de dsRNA (KUNTE et al., 2020; LUCENA-LEANDRO et al., 2022). Contudo, mesmo sob condições adversas, foram relatados casos aumento da letalidade de diversas espécies de lepidópteros pela entrega de dsRNAs tanto por meio da expressão em plantas ou bactérias transgênicas quanto pela síntese *in vitro* e aplicação em plantas (BENTO et al., 2020; CAMARGO et al., 2016; WANG et al., 2023).

Pela abordagem *Spraying-Induced Gene Silencing* (SIGS), a aplicação do dsRNA sintético nas plantas no ambiente enfrenta uma importante limitação: a rápida degradação por fatores abióticos e bióticos (KUNTE et al., 2020). Neste sentido, a associação de dsRNAs sintético a nanocarreadores pode ser uma estratégia potencialmente viável para proteger o dsRNA da degradação ambiental e, ainda, durante a ingestão no intestino alcalino de lepidópteras, e facilitar a absorção pelo inseto alvo (CHRISTIAENS et al., 2018; WANG et al., 2023). Desta forma, o uso de dsRNAs nanocarreados pode ser uma abordagem inovadora para o desenvolvimento de pesticidas à base de dsRNA sintético mais eficientes e seguros (CAGLIARI et al., 2019; FLETCHER et al., 2020).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o uso de biopesticidas à base de dsRNA sintético para controlar *T. absoluta* em tomateiro 'Micro-Tom'. Foram avaliadas duas formas de aplicação foliar do dsRNA sintético (imersão de folhas ou pulverização de plantas) para silenciamento de dois genes-alvos de larvas de *T. absoluta* empregando *dsGFP* como gene-controle. Além disso, moléculas de dsRNA sintético foram associadas a nanocarreadores de zeína (nZ), caracterizadas por meio de análises físico-química e moleculares e avaliadas para controle de diferentes fases da traça-do-tomateiro. Pela marcação fluorescente do dsRNA sintético ou do nZ, foi examinada a capacidade de absorção foliar e ingestão e excreção pelas larvas por microscopia confocal de escaneamento a laser. Também foi avaliada a habilidade de absorção radicular e translocação para folhas do dsRNA sintético ou nZ-dsRNA em plantas de tomateiro "MT. Por fim, foi realizado um ensaio para avaliar a toxicidade do nZ em tomateiro MT via radicular.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biotecnologia aplicada ao controle de pragas

O controle de pragas é crucial na agricultura, pois o ataque de insetos reduz a produção agrícola global em cerca de 20% e causa perdas mundiais anuais de mais de US\$ 470 bilhões (SHARMA et al., 2017). No Brasil, defensivos agrícolas são comumente usados para controlar pragas, com cerca de 685 mil toneladas de ingredientes ativos vendidos no país em 2020 (IBAMA, 2020). No entanto, o uso excessivo de pesticidas na agricultura pode impactar o meio ambiente e a saúde humana (RANI et al., 2021).

Os inseticidas estariam diretamente relacionados à extinção massiva de polinizadores em ambientes agrícolas, o que pode afetar a biodiversidade, impactar as relações tróficas e prejudicar a produção de espécies vegetais dependentes da polinização (SARGENT et al., 2022). O uso excessivo de inseticidas também contribui para o aumento de insetos resistentes, o que reduz a eficiência dos agroquímicos (HAWKINS et al., 2018). Além disso, a contaminação de solo e água com pesticidas pode colocar em risco a saúde animal e humana (ALBUQUERQUE et al., 2016; FERNANDES et al., 2020). Por esses motivos, há preocupações sobre o uso excessivo de pesticidas no Brasil (BRAGA et al., 2020), enquanto que estão sendo implementadas políticas públicas para reduzir em 50% o uso de agroquímicos na Europa até 2030 (EUROPEAN COMMISSION, 2022) e a prática de uma agricultura livre de pesticidas na China até 2050 (WANG et al., 2022).

Na década de 1970, a biotecnologia permitiu o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, empregada na manipulação genética de plantas para obtenção de linhagens com características específicas (FITCHEN et al., 1993). Em 1983, a primeira planta transgênica foi produzida ao expressar um gene de resistência a antibióticos em tabaco (*Nicotiana tabacum*) (FRALEY et al., 1983). Na década de 1990 ocorreu o primeiro plantio comercial de um tomateiro (*Solanum lycopersicum*) transgênico, a cultivar Flavr Savr™, que foi modificado geneticamente empregando a tecnologia de antisenso para silenciar o gene *poligalacturonase (PG)*, resultando em frutos com tempo de prateleira prolongado (KRAMER; REDENBAUGH, 1994). Atualmente, as cultivares transgênicas mais comuns são desenvolvidas para conferir tolerância a herbicidas, favorecendo o manejo de plantas daninhas, e/ou resistentes às pragas, inviabilizando a sobrevivência dos insetos ou reduzindo os danos econômico nas plantações (ABBAS et al., 2018).

A resistência de cultivares transgênicas a insetos-praga é mediada principalmente pela ação das proteínas Cry (LAMBERT et al., 1992). As proteínas Cry são naturalmente produzidas pela bactéria de solo *Bacillus thuringiensis*, que foi isolada, pela primeira vez, no início do século XX, quando também foi demonstrado seu potencial inseticida (KOCH et al., 2015). Todavia, foi apenas em 1928 que *B. thuringiensis* passou a ser relevante no controle de pragas, sendo utilizada comercialmente pela aplicação direta em plantas, na forma de biopesticida (KOCH et al., 2015). O modo de ação de *B. thuringiensis* só foi elucidado na década de 1950, quando seu efeito inseticida foi atribuído às proteínas cristalinas Cry produzidas pelos esporos que se ligam a receptores específicos das células epiteliais do intestino, formando poros que promovem a entrada excessiva de cátions nas células (BRAVO et al., 2007). O excesso de cátions ocasiona o desbalanço osmótico celular, provocando a absorção de água em excesso, e conseqüentemente, o inchaço, lise celular e destruição da parede do intestino. Quando os esporos germinam, as bactérias, por meio das feridas do intestino, atingem outros tecidos, o que promove a infecção generalizada e, finalmente, a morte do inseto (BRAVO et al., 2007) (Figura 1).

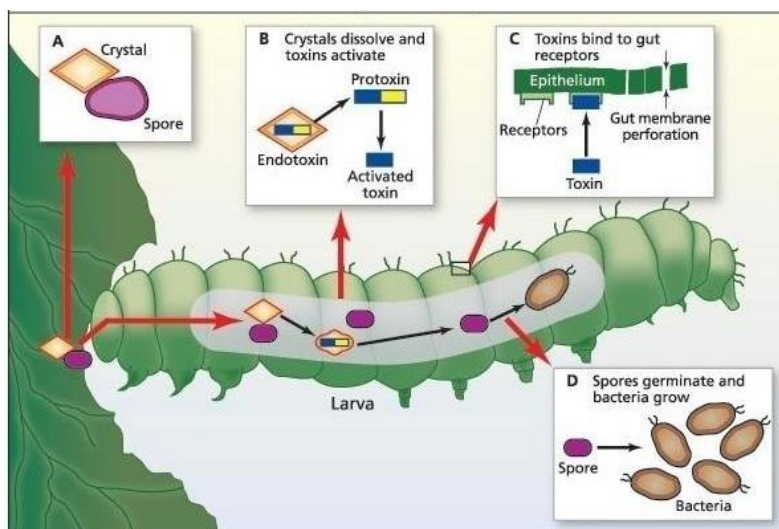


Figura 1. Representação do modo de ação das toxinas Cry em insetos (JAISWAL et al., 2018)

Apesar de atingir altas taxas de controle de pragas, em especial, de lepidópteros, a aplicação de *B. thuringiensis* em plantas apresenta importantes limitações (NASCIMENTO et al., 2022). A ação inseticida das toxinas Cry é lenta e não ocorre o efeito paralisante fulminante nos insetos, como observado em inseticidas sintéticos (NASCIMENTO et al., 2022). A aplicação foliar dos biopesticidas

Bt apresenta baixa persistência devido à degradação abiótica e lavagem por chuva, o que reduziria sua eficácia agrônômica (KOCH et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2022). Por fim, há uma disparidade nos efeitos inseticidas entre linhagens de *B. thuringiensis* devido a existência de diversos tipos de proteínas Cry (CARNEIRO et al., 2009). A partir dos anos de 1990, milhares de linhagens de *B. thuringiensis* foram isoladas, geneticamente caracterizadas e classificadas quanto à toxicidade aos diversos insetos no Brasil pela Embrapa (CARNEIRO et al., 2009).

O desenvolvimento da tecnologia de modificação genética de plantas foi empregado para a expressão heteróloga de proteínas Cry (LAMBERT et al., 1992). As primeiras cultivares comerciais de plantas transgênicas Bt foram lançadas em 1995, como o algodoeiro (*Gossypium* spp.) Bollgard™ e a batata (*Solanum tuberosum*) New Leaf™, da Monsanto e o milho (*Zea mays*) Maximizer™, da Ciba-Geigy® (JAMES; KRATTIGER, 1996). Hoje em dia, há cerca de 215 eventos transgênicos Bt registrados para dez culturas agrícolas (ISAAA, 2022), sendo as plantas Bt amplamente cultivadas na América, África e Ásia, em destaque aos EUA, ao Brasil e à Argentina (ISAAA, 2018). Em 2018, 84% e 58% das plantações brasileiras de milho e soja (*Glycine max*), respectivamente, continham a tecnologia Bt, enquanto que, nesse mesmo ano, foi realizado o primeiro plantio de cana-de-açúcar Bt no país (ISAAA, 2018).

Além de controlar pragas em níveis satisfatórios, a tecnologia Bt apresenta-se como uma opção sustentável; estima-se que o uso de plantas Bt reduza significativamente a aplicação de inseticidas e, conseqüentemente, a emissão de dióxido de carbono associada a produção industrial dos pesticidas sintéticos (BROOKES; BARFOOT, 2020). Por outro lado, evidências indicam que as plantas Bt podem colocar em risco à biodiversidade pela ocorrência do fluxo gênico entre variedades transgênicas e espécies selvagens (BRESSAN et al., 2020) ou por selecionar insetos resistentes às toxinas Cry (OMOTO et al., 2016). Fora isso, há um custo elevado e um período prolongado para o desenvolvimento e desregulamentação das plantas transgênicas, além de obstáculos na comercialização devido à rejeição aos OGMs pela população (ADDEY, 2020; BEGHIN; GUSTAFSON et al., 2021).

A tecnologia de silenciamento gênico por RNA de interferência (RNAi) é apontada como uma alternativa viável a tecnologia Bt, pois permitiria o controle de pragas e doenças de forma específica, com baixa toxicidade, competitividade econômica e sustentabilidade (NITNAVARE et al., 2021).

2.1.1 Mecanismo de RNA de interferência

RNAi é um mecanismo de regulação da expressão gênica pós-transcricional, altamente conservado em organismos eucariotos, que atua pela interceptação e destruição de RNAs mensageiros (mRNAs) anterior a etapa de tradução proteica (FIRE et al., 1998; PEREIRA, 2013). As primeiras evidências de silenciamento gênico mediado por RNAs surgiram no início da década de 1990, a partir de tentativas de intensificar a cor de flores de petúnias pela inserção de cópias extras de um gene envolvido na biossíntese de um pigmento floral (NAPOLI et al., 1990). Curiosamente, a inserção de cópias extras no genoma da planta fez com que algumas delas apresentassem flores parcial ou totalmente brancas, indicando um possível silenciamento deste gene; fenômeno que foi denominado então de “cossupressão” (NAPOLI et al., 1990). Fundamentado nisso, a investigação dos supostos mecanismos por trás da indução do silenciamento de genes levantou a hipótese de que as cópias exógenas, quando inseridas aleatoriamente no genoma da planta no sentido antisenso, produziram transcritos capazes de se hibridizar de forma complementar com o mRNA transcrito pelo próprio gene, formando moléculas de RNA de dupla-fita (em inglês, *double-stranded* RNA, dsRNA), que desencadeariam o fenômeno de silenciamento gênico (JORGENSEN et al., 1996; THIERRY; VAUCHERET, 1996; WATERHOUSE et al., 1998).

Entretanto, a elucidação do mecanismo molecular envolvido na supressão de genes ocorreu apenas quando Fire et al. (1998) avaliaram introduzir moléculas de dsRNA ou de RNA de fita simples no sentido senso ou no antisenso no nematoide *Caenorhabditis elegans* (Rhabditida: Rhabditidae). Observou-se que o fenômeno de silenciamento do gene-alvo em *C. elegans* era 10 a 100 vezes maior quando introduzidas moléculas de dsRNA de modo a confirmar que o RNA em dupla-fita era o principal indutor ao fenômeno de silenciamento gênico, que passou a ser denominado de RNA de interferência (FIRE et al., 1998).

O mecanismo de silenciamento por RNAi ocorre no citoplasma e é mediado por pequenos RNA interferentes (em inglês, *small interfering* RNAs, siRNAs), moléculas que variam de 19 a 24 nucleotídeos de comprimento e que são originárias do processamento do dsRNA por ribonucleases do tipo III, as enzimas Dicer (FIRE et al., 1998; RODRIGUES; FIGUEIRA, 2016). As moléculas de siRNAs são então recrutadas por um complexo enzimático denominado *RNA-induced silencing complex* (RISC), constituído por diversas proteínas, entre elas, as proteínas Argonauta (Ago),

que atuam na degradação dos mRNAs de forma altamente específica (PEREIRA et al., 2013). Uma das fitas do siRNA, acoplado ao RISC, é utilizado como RNA-guia para identificar os mRNAs com sequência complementar (PEREIRA, 2013). Uma vez feita a ligação, a Ago cliva o mRNA, que é degradado pela própria célula (PEREIRA, 2013; RODRIGUES; FIGUEIRA, 2016). Deste modo, a interação entre mRNAs, os siRNAs e o complexo RISC resultam no silenciamento de um gene específico quando o nível de transcritos do gene-alvo é drasticamente reduzido, interrompendo a síntese proteica (FACTOR et al., 2022) (Figura 2).

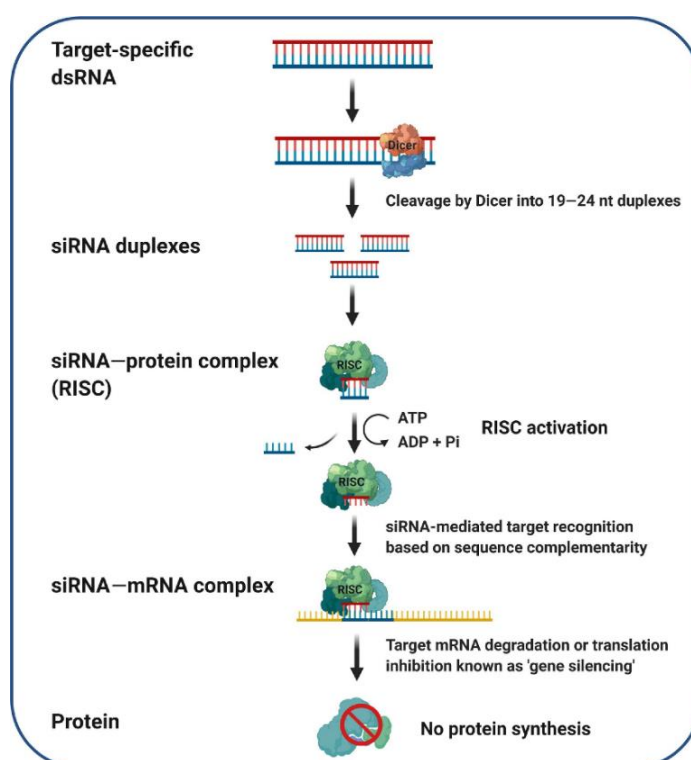


Figura 2. Representação esquemática do mecanismo molecular de RNAi (TANING et al., 2021).

A absorção celular de moléculas de dsRNA disponíveis no meio extracelular é conhecida como *environmental RNAi* (PEREIRA, 2013). Em *C. elegans*, a absorção celular ocorre por intermédio de canais de proteínas transmembranas *Systemic RNAi-defective* (SID-1) em cooperação com proteínas SID-2 (FEINBERG; HUNTER, 2003). Contudo, esse processo de absorção celular não é universal, podendo ocorrer variações, ou até mesmo inexistir em determinados organismos (SINGH et al., 2017). Outro mecanismo de absorção celular de dsRNA, já identificado em insetos e em mamíferos, é pela via de endocitose dependente de clatrina (CAPPELLE et al., 2016), apesar de que moléculas de dsRNA na forma de *paperclip* (pcRNA)

também puderam ser absorvidas por células de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) pela via endocítica independente de clatrina (ABBASI et al., 2020).

Após a absorção celular, pode ocorrer o processo de silenciamento gênico por RNA de interferência sistêmico através da indução da célula a partir de outra que já tenha absorvido o dsRNA anteriormente (HUVENNE; SMAGGHE, 2010). Acredita-se que os genes *RNAi spreading defect (Rsd)* estejam relacionados a esse processo sistêmico; todavia, tal processo não seria conservado até mesmo entre organismos próximos (IMAE et al., 2016; RODRIGUES; FIGUEIRA, 2016). A qualidade da transmissão do silenciamento intracelular depende da capacidade das células de amplificar os siRNAs em siRNAs secundários. (HUVENNE; SMAGGHE, 2010; PINZÓN et al., 2019). A enzima *RNA-dependent RNA polymerase (RdRP)* é responsável por essa amplificação e acreditava-se que a RdRP era exclusiva de determinados taxons, como plantas e nematoides (XIE et al., 2001; ZHANG et al., 2012; CAMARGO et al., 2015). Contudo, evidências indicaram a presença de homólogos de RdRP em uma ampla gama de animais, como aracnídeos, lacraias e alguns poucos insetos, como *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) (PINZÓN et al., 2019), embora acredita-se que, pelo menos em insetos, esta enzima não desempenharia função de amplificação do sinal de RNAi (MONDAL et al., 2021). Em organismos carentes de RdRP, necessita-se o constante fornecimento de dsRNA para manutenção do silenciamento gênico (MEZZETTI et al., 2020).

Quando comparado o silenciamento gênico entre *C. elegans* e artrópodes, é notável a maior recalcitrância dos artrópodes ao RNAi (JOGA et al., 2016; SINGH et al., 2017). Reconhece-se que *C. elegans* exiba maiores taxas de silenciamento gênico porque apresentaria maior atividade das proteínas SID-1 e SID-2, além de dispor da proteína RdRP, enquanto que os artrópodes supostamente não possuem RdRPs funcionais e dispõem apenas da proteína SID-1 (ou de uma proteína homóloga a ela, a *SID-like* ou SIL), ou, em casos extremos, podem não dispor de ambas proteínas (CAMARGO et al., 2015; JOGA et al., 2016; BANKS et al., 2022). Ademais, análises do transcriptoma de diversos artrópodes revelaram baixos níveis de expressão dos componentes da maquinaria de RNAi (NGANSO et al., 2020; YOU et al., 2020; BANKS et al., 2022). Tais características explicam a menor habilidade de absorção e processamento de dsRNA, assim como a deficiência de amplificação e transmissão do sinal de RNAi em células de artrópodes (RODRIGUES; FIGUEIRA et al., 2016).

2.1.2. Controle de pragas por RNAi

Após elucidação do mecanismo de RNAi (FIRE et al., 1998), a técnica de RNAi foi primeira e amplamente empregada em estudos de genômica funcional e genética reversa (NOVINA; SHARP, 2004; SEN; BLAU, 2006; KOURTIDIS et al., 2007). Paralelamente, a capacidade de silenciar genes de forma específica trouxe expectativas para seu uso como ferramenta no manejo de pragas agrícolas, sugerindo que o dsRNA poderia ser utilizado como uma molécula com potencial pesticida (GORDON; WATERHOUSE, 2007). O dsRNA entregue a um inseto poderia provocar o silenciamento específico de genes que desempenham funções críticas, ocasionando adversidades em seu desenvolvimento, sobrevivência ou fertilidade (MAKTURA et al., 2021).

As primeiras evidências do efeito do dsRNA em insetos-pragas foram obtidas na década de 2000, por meio da injeção direta no corpo dos insetos (TOMOYASU; DENELL, 2004) ou aplicação tópica em cultura de células (CLEMENS et al., 2000; KULKARNI et al., 2006). A habilidade de silenciar genes em insetos por ingestão de dsRNA foi posteriormente comprovado por meio do desenvolvimento de plantas transgênicas que expressavam versões em grampo de genes-alvo dos insetos (BAUM et al., 2007; MAO et al., 2007), o que levou a uma busca por estratégias agronômicas viáveis para a utilização do RNAi no controle de pragas (HUVENNE; SMAGGHE, 2010).

Baum et al. (2007) e Mao et al. (2007) são citados como pioneiros nos estudos de plantas transgênicas de RNAi para controlar pragas por meio do silenciamento de genes. A abordagem de entrega de dsRNA mediada por um organismo hospedeiro é denominada *Host-induced gene silencing* (HIGS), no qual o dsRNA é constantemente expresso em células do hospedeiro. Dessa forma, a praga-alvo ao se alimentar também consumiria o dsRNA (DEAN et al., 2005).

Linhagens transgênicas de cana-de-açúcar expressando dsRNA homólogo ao gene *ATPase vacuolar* (*ATPase*) reduziram o peso e provocaram a mortalidade de até 70% de larvas de *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae) (MOHAN et al., 2021), enquanto que uma linhagem transgênica de tomateiro expressando dsRNA para o mesmo gene-alvo retardou o desenvolvimento e elevou a mortalidade em até 54% de ninfas de mosca-branca (*Bemisia tabaci*) (Hemiptera: Aleyrodidae) (PIZETTA et al., 2022). A ingestão de plantas transgênicas de tabaco expressando uma construção que promovia o silenciamento de um gene de resposta imune fez com as

larvas de *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) fossem mais susceptíveis ao controle por uma bactéria entomopatogênica, demonstrando potencial de uso conjunto da tecnologia de RNAi com o controle biológico por microrganismos (Di LELIO et al., 2022).

Uma importante desvantagem do uso de plantas transgênicas de RNAi é o processamento do dsRNA em siRNA pela maquinaria de RNAi da própria planta (KUNTE et al., 2020). Evidências apontam que a ingestão de siRNA ocasiona menor silenciamento gênico em insetos em comparação com dsRNA, acarretando menor eficiência de controle da praga-alvo (ZHANG et al., 2015). Alternativamente, foi proposta a expressão do dsRNA a partir do genoma cloroplastidial com intuito de driblar a ação de ribonucleases da planta que processam o dsRNA em siRNA antes da ingestão pelos insetos (KAPLANOGLU et al., 2022). No entanto, mais recentemente, foi demonstrado que pode haver uma vantagem no processamento do dsRNA em siRNA pela maquinaria de RNAi da planta, uma vez que o siRNA seria utilizado para síntese de siRNA secundários pela RdRP da planta (ZHANG et al., 2022). Plantas de *Arabidopsis thaliana* nocauteadas para o gene *RdRP* expostas a dsRNA exógeno apresentaram desempenho menor na indução de mortalidade de uma praga que plantas não nocauteadas, possivelmente por não produzirem siRNAs secundários (ZHANG et al., 2022).

Comercialmente, a cultivar de milho SmartStax-PRO® (evento MON87411) da Bayer S. A. foi o primeiro produto transgênico registrado e aprovado em vários países, inclusive no Brasil, para controle de *Diabrotica* spp., combinando as tecnologias de RNAi e Bt (toxinas Cry) (HEAD et al., 2017; ISAAA, 2022).

A entrega de dsRNA por microrganismos transgênicos também tem sido proposta para uso no controle de pragas (ABRIEUX; CHIU, 2016). A utilização de *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae* expressando dsRNA contra *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) (BENTO et al., 2020) e *D. suzukii* (Diptera: Drosophilidae) (MURPHY et al., 2016), respectivamente, foi capaz de inibir a sobrevivência destas pragas. No entanto, a baixa persistência dos microrganismos no ambiente e os altos custos e o rígido processo de desregulamentação de OGM limitam o uso de organismos transgênicos para o controle de pragas agrícolas (KUNTE et al., 2020).

Como alternativa às plantas e microrganismos transgênicos, tem-se estudado a entrega de dsRNA a insetos denominada de *Spraying-induced gene silencing* (SIGS), centrada no uso de dsRNA sintético como biopesticidas (WANG et al., 2011). O dsRNA pode ser sintetizado *in vitro*, a partir da transcrição por uma T7 RNA polimerase de um molde de DNA contendo promotores T7 em ambas extremidades (Figura 3a) ou por bioprocessos industriais (KULKARNI et al., 2006; RODRIGUES et al., 2021a).

O uso de biopesticidas à base de dsRNA tem se tornado mais atrativo nos últimos anos, devido a uma redução significativa nos custos de produção com a implantação de novos processos *cell-free* para síntese em larga escala (RODRIGUES et al., 2021a, 2021b). Além disso, a produção de dsRNA *in vivo* por microrganismos livres, como *E. coli* e *S. cerevisiae*, é vista como uma alternativa viável para suprir a demanda por dsRNA para a fabricação comercial de biopesticidas a baixo custo (HASHIRO; YASUEDA, 2022; MA et al., 2022).

A aplicação foliar de biopesticidas à base de dsRNA pode ser uma estratégia viável para controlar pragas com hábitos minadores, sugadores ou insetos de solo que atacam as raízes (KUNTE et al., 2020), uma vez que evidências indicam a capacidade de penetração foliar e distribuição do dsRNA pelas diferentes partes das plantas, com resultados maiores na presença adjuvantes (DALAKOURAS et al., 2016; De SCHUTTER et al., 2022; JAIN et al., 2022). Os mecanismos de penetração e transporte de dsRNA nas plantas ainda não estão totalmente esclarecidos, no entanto, acredita-se que o dsRNA seja preferencialmente absorvido pelas folhas via estômatos e inicialmente difundido via apoplasto (HOANG et al., 2022). Contudo, após o processamento do dsRNA em siRNA pela Dicer da planta, o siRNA poderia também ser difundido via simplasto até os vasos condutores e distribuído por toda a planta via floema (HOANG et al., 2022).

A primeira demonstração de controle de praga por meio de dsRNA sintético foi realizada por meio de pulverização em dieta artificial contra ovos e larvas de *Ostrinia furnalis* (Lepidoptera: Crambidae) (WANG et al., 2011). O dsRNA homólogo ao gene *LIM protein* reduziu a eclosão das larvas em mais de 79%, em comparação com grupo controle, enquanto que o dsRNA correspondente ao gene *chymotrypsin-like serine protease C3* foi capaz de causar 100% de mortalidade larval após cinco dias de exposição (WANG et al., 2011). Pouco tempo depois, o controle de uma praga por meio de dsRNA sintético em plantas foi realizado pela primeira vez a partir da

aplicação foliar em plantas de batata (*S. tuberosum*) contra *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) (SAN MIGUEL; SCOTT, 2016). A exposição ao dsRNA resultou em efeito dose-dependente, atingindo até 100% de mortalidade larval e redução de até 95% no peso das larvas (SAN MIGUEL; SCOTT, 2016).

Mais recentemente, a aplicação de dsRNA sintético em discos foliares mostrou ser eficaz para reduzir a expressão de um gene-alvo e a sobrevivência de larvas de *Henosepilachna vigintioctopunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) (LÜ et al., 2020). Efeitos semelhantes foram observados em *Brassicogethes aeneus* (Coleoptera: Nitidulidae) quando alimentado com flores de colza (*Brassica napus*) expostas ao dsRNA sintético (WILLOW et al., 2021).

Além da aplicação foliar, já foram testadas outras formas de entrega de dsRNA sintético, como injeção no tronco de lenhosa (WISE et al., 2022), tratamento de sementes (AVNIEL et al., 2014) e absorção radicular (GHOSH et al., 2018; BRAGG; RIESKE, 2022a-b), demonstrando a versatilidade do RNAi como potencial ferramenta no manejo de pragas (Figura 3b) (KUNTE et al., 2020).

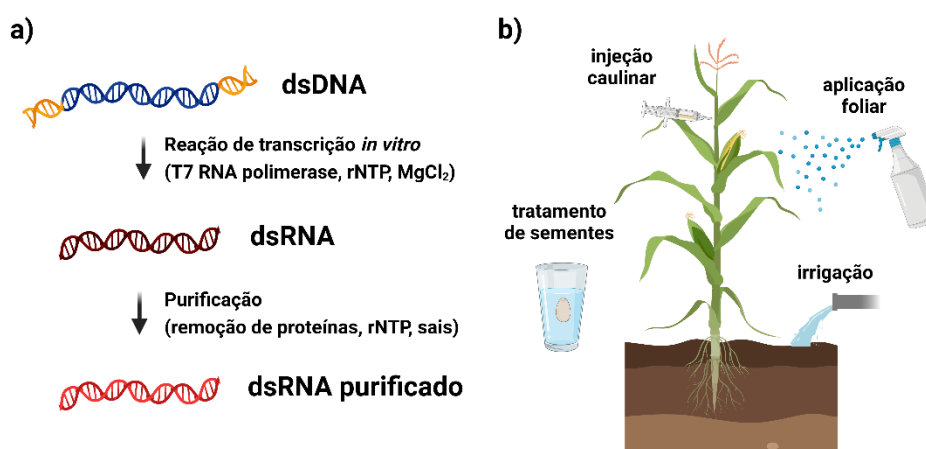


Figura 3. Estratégia para controle de pragas por SIGS: (a) transcrição *in vitro* de dsRNA e (b) métodos de entrega de dsRNA sintético (criado com Biorender.com)

O caso mais avançado de desenvolvimento de um biopesticida à base de dsRNA sintético é de Ledprona[®], da empresa norte-americana *GreenLight Biosciences*, e que está em comissionamento nos EUA (RODRIGUES et al., 2021a, 2021b; PALLIS et al., 2022). Ledprona[®] é usado para controlar *L. decemlineata* pelo silenciamento do gene *PSMB5*, envolvido na degradação de proteínas danificadas ou aberrantes (RODRIGUES et al., 2021a, 2021b; PALLIS et al., 2022). Testes em laboratório e campo mostraram a eficiência da aplicação foliar de Ledprona[®] em

causar alta mortalidade em *L. decemlineata* e reduzir o dano foliar em plantas de batata, com desempenho comparável a um inseticida convencional (RODRIGUES et al., 2021a, , 2021b; PALLIS et al., 2022).

2.1.3 Limitações no controle de pragas por RNAi

A escolha dos genes-alvo para o silenciamento gênico é um dos maiores gargalos do uso da tecnologia de RNAi para o controle de pragas (KUNTE et al., 2020). Novos genes-alvo são constantemente identificados e testados com o objetivo de encontrar aqueles que tenham maior impacto na viabilidade, letalidade ou esterilidade do inseto-alvo e na redução do dano causado pela praga (LI et al., 2022a; SATTELLE, 2022), e sem similaridade com sequências de outros organismos não-alvo, especialmente insetos benéficos, para reduzir o risco de efeitos secundários indesejados (KUNTE et al., 2020). Várias vias biológicas já foram utilizadas como genes-alvo (MAKTURA et al., 2021), mas a escolha de genes com alto nível de expressão não é considerada a mais adequada, pois pode exigir doses maiores para o silenciamento eficaz (PEREIRA, 2013).

A eficiência do silenciamento gênico em insetos também pode ser afetada por nucleases presentes no intestino e na saliva, bem como pela presença da membrana peritrófica que reveste o intestino médio dos insetos (ALLEN; WALKER, 2012; LI et al., 2022b; KUNTE et al., 2020). A presença de nucleases no intestino e na saliva pode degradar o dsRNA (LI et al., 2022b; ALLEN; WALKER, 2012), enquanto que a membrana peritrófica, composta por quitina e glicoproteínas de carga negativa, limitaria a entrada do dsRNA nas células intestinais (KUNTE et al., 2020).

Ao compararmos os resultados de silenciamento gênico em insetos, é evidente a existência de ordens, até mesmo famílias, mais ou menos sensíveis ao RNAi (SINGH et al., 2017). A ordem Coleoptera, especialmente a família Chrysomelidae, é conhecida por ser altamente sensível ao RNAi, enquanto que as ordens Lepidoptera e Diptera apresentam-se como as mais recalcitrantes ao silenciamento gênico (KOCH; KOGEL, 2014; WILLOW; VEROMANN, 2021). Diferenças fisiológicas e bioquímicas entre os insetos das diversas ordens influenciam a disparidade dos efeitos do RNAi (KATOCH et al., 2013). Coleópteros possuem o intestino médio com pH mais neutro, o que favorece a entrega de dsRNAs via oral, enquanto o intestino médio de lepidópteros e dípteros é mais alcalino, degradando o dsRNA mais rapidamente (KUNTE et al., 2020). Além disso, homólogos de SID-1 (ou SIL) foram identificados

em várias espécies de coleópteros e apenas alguns lepidópteros, enquanto que não há evidências de que as proteínas SID estejam presentes no genoma de dípteros (MAKTURA et al., 2021; RODRIGUES; FIGUEIRA, 2016). Acredita-se que sem as proteínas SID, o dsRNA poderia ser absorvido pela célula via endocitose, formando um endossomo (COOPER et al., 2019). No entanto, se a membrana endossomal não se rompe (e o dsRNA não é liberado no citosol), o endossomo pode ser fusionado a um lisossomo e ter seu conteúdo interno degradado (COOPER et al., 2019). Este processo é chamado de aprisionamento endossomal e também está relacionado à ineficiência do silenciamento gênico por RNAi (YOON et al., 2017).

Após devida absorção do dsRNA pelas células, dois importantes fenômenos hipotéticos podem colaborar com a ineficiência do silenciamento de genes: a sobreposição de vias de regulação gênica mediadas por RNAs e a saturação da maquinaria central de RNAi (COOPER et al., 2019).

Paralela à via de silenciamento gênico por siRNA, existem outras duas vias regulatórias da expressão gênica em insetos: a via mediada por microRNAs (miRNA) e a via mediada por PIWI-interacting RNA (piRNA) (LUCAS; RAIKHEL, 2013); estas duas vias regulam a expressão de genes, bloqueando a tradução de mRNA homólogos e interrompendo a expressão de elementos transponíveis em células germinativas, respectivamente (LUCAS; RAIKHEL, 2013) (Figura 4). Enquanto que o siRNA é, em geral, de origem externa, os miRNAs e os piRNAs são originados no genoma nuclear (LUCAS; RAIKHEL, 2013; LE THOMAS et al., 2014). Estas três vias de silenciamento gênico podem compartilhar componentes, como a enzima Dicer e as proteínas do RISC (ZHOU et al., 2008; LUCAS; RAIKHEL, 2013) (Figura 4), de modo que a sobreposição das vias pode impedir o processamento correto do dsRNA e a ligação ao mRNA homólogo (COOPER et al., 2019). Por outro lado, se defende a hipótese que a incapacidade de processamento de RNAs pela Dicer e recrutamento pelo RISC possa alterar o perfil de transcritos na célula, ocasionando a saturação da maquinaria central de RNAi (KUNTE et al., 2020). A saturação impediria regulação correta da expressão de genes envolvidos na síntese de hormônios, no controle de infecções virais ou na embriogênese, de modo a prejudicar o desenvolvimento, sobrevivência ou reprodução do inseto (KUNTE et al., 2020).

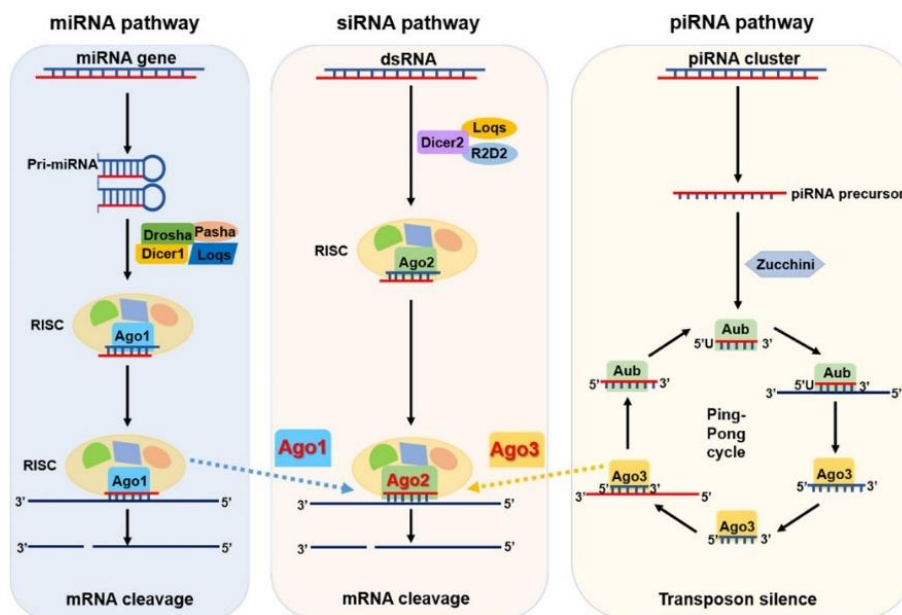


Figura 4. Vias de regulação gênica celular mediadas por RNAs (GAO et al., 2020)

A entrega do dsRNA para insetos pela abordagem SIGS é desafiada pela instabilidade e degradabilidade do RNA no ambiente (KUNTE et al., 2020). Em experimentos em laboratório, os ácidos nucleicos apresentaram baixa estabilidade e vida média curta em amostras de solo e água devido à fotólise, hidrólise e ação de microrganismos (DUBELMAN et al., 2014). No entanto, em outros estudos, o dsRNA sintético aplicado em plantas mostrou persistir na superfície foliar por até 28 dias (SAN MIGUEL; SCOTT, 2016) e ser detectado no tronco de macieiras por 141 dias (WISE et al., 2022). Além disso, dsRNA sintético armazenado a 4°C por 180 dias ainda mostrou eficácia no controle de *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) (BAI et al., 2023).

Os hábitos alimentares da praga-alvo podem influenciar na eficiência do controle por RNAi via oral (LIU et al., 2020), uma vez que seria necessário que o dsRNA estivesse disponível no floema para controle de insetos sugadores de seiva (JAIN et al., 2020) ou nas raízes para controlar pragas que atacam o sistema radicular (LIU et al., 2020).

Por fim, o surgimento de populações resistentes é uma preocupação relevante na aplicação da tecnologia de RNAi no controle de pragas (LI et al., 2022a). Em laboratório, para compreender supostos mecanismos de resistência de insetos ao RNAi, foram obtidas populações de *D. virgifera virgifera* e de *L. decemlineata* resistentes a uma linhagem transgênica de milho e a dsRNA sintético, respectivamente (KHAJURIA et al., 2018; MISHRA et al., 2021). Tais estudos

corroboram a necessidade de medidas profiláticas semelhantes às usadas no manejo de pragas tradicional para evitar o surgimento de populações resistentes à tecnologia de RNAi quando estiver disponível comercialmente. (MISHRA et al., 2021).

2.1.4 dsRNA sintético associado a nanocarreadores

Nanocarreadores são estruturas com dimensões na escala nanométrica, entre 1 e 100 nm (1 nm = 10^{-9} m) (TOMA, 2009), embora que objetos com até 500 nm também são incluídos (CHACKO et al., 2011). O potencial de nanocarreadores em influenciar mecanismos fisiológicos em plantas vêm sendo estudados para elevar a produtividade agrícola, seja pelo aumento da taxa de germinação de sementes, pela indução do crescimento vegetal ou pela atenuação de efeitos decorrentes de estresse abiótico ou biótico (ADREES et al., 2022). Além disso, tem sido explorado o uso de nanocarreadores para a entrega de moléculas para fins agrícolas, como fertilizantes (DUTTA et al., 2022), hormônios (KORPAYEV et al., 2021) e pesticidas, e em destaque, os biopesticidas baseados em dsRNA sintético (CHRISTIAENS et al., 2020).

Evidências indicam que a associação de dsRNA sintético com nanocarreadores poderia aumentar a eficácia do silenciamento gênico em insetos (PUGSLEY et al., 2021). O aumento do silenciamento gênico e da mortalidade de insetos está relacionado à habilidade de nanocarreadores em proteger o dsRNA contra a degradação por RNases ou hidrólise alcalina, em promover a absorção celular e em estimular o escape endossomal e liberação do dsRNA no citosol (CHRISTIAENS et al., 2018; JAIN et al., 2022; McGRAW et al., 2022; YANG et al., 2022). Nanocarreadores também podem estimular a penetração e distribuição do dsRNA na planta (WU; LI, 2022; YONG et al., 2022), o que poderia ser útil para controle de insetos-praga sugadores de seiva, minadoras de folhas, caules ou consumidores de raízes (KUNTE et al., 2020; JAIN et al., 2022).

A dimensionalidade de um nanocarreador é uma importante característica no que se diz respeito ao desenvolvimento de sistemas de entrega de biopesticidas à base de dsRNA (Figura 5) (ZHANG et al., 2022). A dimensão do nanocarreador pode influenciar a eficiência da entrega do dsRNA ao inseto e a penetração e translocação nas plantas (HU; LI, 2022; ZHANG et al., 2022). Nanomateriais de zero dimensão (0-D) apresentam todas as suas três dimensões na escala nanométrica, o que os tornaria mais eficientes na passagem pela membrana peritrófica do intestino dos

insetos e na penetração e transporte nas plantas (JOUDEH; LINKE et al., 2022; SINGH et al., 2022). Por outro lado, nanomateriais com dimensões maiores poderiam ter dificuldade em atravessar a membrana peritrófica dos insetos, ter absorção foliar mais complexa e lenta e penetração e distribuição nos tecidos vegetais limitada (JOUDEH; LINKE et al., 2022; ZHANG et al., 2021).

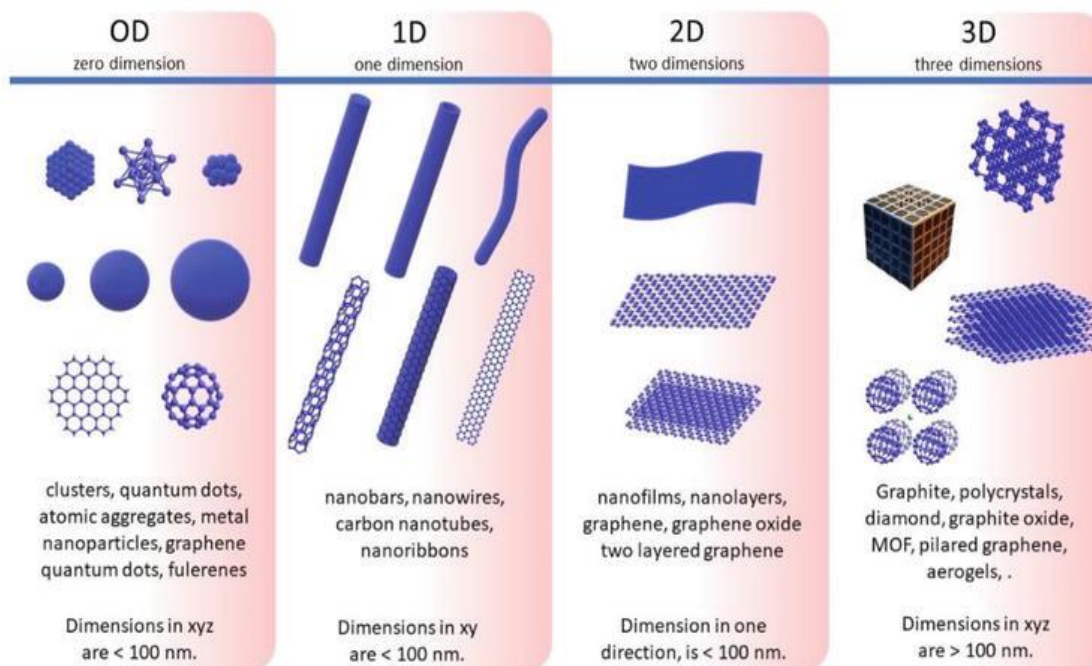


Figura 5. Classificação de nanomateriais de acordo com a dimensionalidade (GARCÍA-BETANCOURT et al., 2019)

Os nanomateriais são categorizados de acordo com sua composição entre os à base de carbono, orgânicos ou inorgânicos e as propriedades de suas matrizes podem influenciar na penetração foliar, distribuição nos tecidos vegetais e na eficiência na entrega de dsRNA para controlar pragas (Tabela 1).

Nanocarreadores de argila em dupla camada, denominado de “BioClay”, demonstraram excelente potencial de associação com dsRNA e controle de patógenos e pragas (JAIN et al., 2022). A aplicação foliar de dsRNA nanocarreado por BioClay foi capaz de controlar infecções virais e o fungo *Botrytis cinerea* em frutos de tomateiro e em plantas de tomateiro ou grão-de-bico (*Cicer arietinum*) (MITTER et al., 2017; WORRALL et al., 2019; NIÑO-SÁNCHEZ et al., 2022). Além disso, a aplicação de dsRNA-BioClay em algodoeiro resultou em uma maior redução dos transcritos dos genes-alvos e uma maior mortalidade de adultos de *B. tabaci* (JAIN et al., 2022).

O uso do BioClay como nanocarreador de dsRNA também foi eficaz na promoção da ação ovocida, o que não foi observado com o uso do dsRNA não-carreado (JAIN et al., 2022).

Tabela 1. Principais matrizes empregues na entrega de dsRNA por nanocarreadores

	Carbônicos	Orgânicos	Inorgânicos
Principais Matrizes	<p>Carbono: Pontos quânticos de carbono (CQD), nanotubos de carbono (CNTs)</p> <p>Grafeno: grafeno, óxido de grafeno</p> <p>Fulereo: <i>Bucky-bola</i> (C₆₀)</p>	<p>Poliméricos: carboidratos de cadeia longa (quitosana), proteínas ou peptídeos (CPP), ácidos nucleicos</p> <p>Lipídicos: lipídios catiônicos, fosfolipídios, lipossomos, colesterol, <i>Star polycation</i> (SPC)</p>	<p>Metálicos: ouro e prata</p> <p>Óxidos metálicos: óxidos de zinco, óxidos de ferro, óxidos de titânio e duplos hidróxidos em camadas (LDH)</p> <p>Ametais: sílica, fosfato de cálcio, argila</p>
Aplicação de RNAs em plantas	<ul style="list-style-type: none"> • CNTs-siRNA: alta eficiência em indução ao silenciamento gênico transiente por infiltração foliar de <i>Nicotiana benthamiana</i> (DEMIRER; LANDRY, 2021) • CNTs-PEI-siRNA: efeito de silenciamento gênico pela infiltração de folhas de <i>A. thaliana</i>, contudo observada toxicidade e morte celular (GONZÁLEZ-GRANDÍO et al., 2021) • CQD-dsRNA: alta taxa de silenciamento gênico e observação de alterações fenotípicas pela pulverização foliar com adição de surfactante em <i>N. benthamiana</i> e tomateiro (SCHWARTZ et al., 2020) • CQD-dsRNA: aumento da penetração foliar e do processamento em siRNA pela pulverização foliar em pepino (50 e 13x maior que siRNA não-carreado, respectivamente) (DELGADO-MARTÍN et al., 2022) 	<ul style="list-style-type: none"> • Nanoestruturas de DNA-siRNA: mais rápida internalização celular de sistemas coloidais com menor tamanho médio e habilidade de redução da expressão do gene-alvo pela infiltração foliar em <i>N. benthamiana</i> (ZHANG et al., 2020) • SPC-microRNA: habilidade de regular expressão do gene-alvo por meio da aplicação radicular em plantas de milho (YANG et al., 2022) • Nanopolímero fluorescente-siRNA: alta capacidade de penetração e excelente eficiência na entrega de siRNA em protoplastos de tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>) (SILVA et al., 2010) 	<ul style="list-style-type: none"> • Np Au funcionalizada: resistência à degradação por RNases, facilidade em penetrar a parede celular e elevada eficiência no silenciamento gênico pela infiltração foliar de <i>N. benthamiana</i> (ZHANG et al., 2021) • Np Au funcionalizada: tamanho médio do sistema coloidal influencia na penetração da parede celular células; alta eficiência na redução do nível de transcritos do gene-alvo pela infiltração foliar de <i>N. benthamiana</i> (ZHANG et al., 2022) • Np LDH-dsRNA: capacidade de penetração em grãos de pólen de tomateiro e maior inibição da expressão do gene-repórter (52% maior que dsRNA não-carreado) (YONG et al., 2021) • Np LDH-dsRNA: aumento do efeito de silenciamento do gene-alvo pela injeção em flores de tomateiro (MOLESINI et al., 2022)
Entrega de dsRNA para controlar insetos por RNAi	<ul style="list-style-type: none"> • CQD: mortalidade larval de <i>Chilo suppressalis</i> 70% maior que grupo-controle (WANG et al., 2020) • CQD: Alta mortalidade larval de <i>A. aegypti</i>; 4x maior que CQD-dsGFP (gene-controle) (DAS et al., 2015) • CNTs-dentrímeros: redução de cerca de 80% da sobrevivência de <i>T. castaneum</i>; 20% maior que dsRNA não-carreado (EDWARDS et al., 2020) 	<ul style="list-style-type: none"> • Np lipoproteica: Alta mortalidade larval de <i>S. frugiperda</i>; 3x maior que dsRNA não-carreado (DHANDAPANI et al., 2022) • SPC (com detergente): redução do peso e sobrevivência de <i>Grapholita molesta</i> e redução do dano em frutos de pera (<i>Pyrus</i> spp.) pela via transdermal (WEI et al., 2022) • Np quitosana: redução do peso e 100% de mortalidade larval em <i>Helicoverpa armigera</i> (KOLGE et al., 2023) • Np Polilisina + Etilenoglicol: redução em 50% de transcritos do gene-alvo, comparado com grupo-controle, e alterações fenotípicas em <i>Locust migratoria</i> (LU et al., 2022) • Np quitosana ou SPC: eficiência na redução do nível de transcritos do gene-alvo e redução do peso e emergência de adultos de <i>T. absoluta</i> (WANG et al., 2023) 	<ul style="list-style-type: none"> • Np Au funcionalizada: redução da expressão do gene-alvo em células de <i>S. frugiperda</i> (LAISNEY et al., 2020) • Np Ca₃(PO₄)₂ funcionalizada: redução de transcritos do gene-alvo em células de <i>S. frugiperda</i> (BADDAR et al., 2020) • Np SiO₂: baixa mortalidade de <i>A. aegypti</i>; estatisticamente igual a SN-dsGFP (gene-controle) (DAS et al., 2015)

Legenda: Np = nanopartícula

Embora as evidências indiquem que a associação de dsRNA sintético aos nanocarreadores possa melhorar a eficiência do controle de pragas por RNAi, são discutidos possíveis efeitos adversos da presença de nanomateriais no ambiente, em especial, às plantas e aos insetos benéficos (BENELLI, 2018; TRIPATHI, 2017). Comumente, a exposição foliar de nanocarreadores às plantas está associada a redução da atividade de enzimas antioxidantes, ao estresse oxidativo e necrose das folhas (DIETZ; HERTH, 2011; MUKHERJEE et al., 2016). A exposição radicular de nanocarreadores estaria associada à inibição do desenvolvimento de plantas pela obstrução dos poros da parede celular vegetal (ASLI; NEUMANN; 2009). Ademais, foram reportadas alterações significativas da microbiota no solo após aplicação de nanomateriais, o que poderia influenciar negativamente à produção vegetal, uma vez que microrganismos do solo desempenham atividades na nutrição, no crescimento e na proteção das plantas (DOOLETTE et al., 2016; MCGEE et al., 2018).

Efeitos de nanomateriais carbônicos e inorgânicos a artrópodes estão mais bem elucidados, com evidências de efeitos neurotóxicos, na inibição da atividade de enzimas antioxidantes, em alterações bioquímicas e estruturais, além de efeitos negativo no desenvolvimento e reprodução (BOTELHO et al., 2022; EL-ASHRAM et al., 2020; EL-SAMAD et al., 2022; SHAHRZAD; MANZOOR, 2019; ZACOUTEGUY et al., 2021). Evidências apontam o risco de biomagnificação de nanopartículas no ambiente (JUDY et al., 2011). No entanto, são necessários mais estudos para avaliação ecotoxicológica de nanoestruturas poliméricas ou lipídicas, pois as informações acerca da segurança de nanocarreadores orgânicos ao meio ambiente são limitadas (KUNTE et al., 2020).

2.2 Avanços no controle da traça-do-tomateiro por RNAi

A traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta*, é uma das mais importantes pragas da produção de tomate (DESNEUX et al., 2021). Originária da América do Sul, foi detectada na Espanha em 2006 e, logo em seguida, se espalhou por quase toda Europa e posteriormente chegou à África e Ásia (TONNANG et al., 2015; EPPO GLOBAL DATABASE, 2022) (Figura 6). Nos últimos anos, a distribuição global da traça-do-tomateiro se expandiu devido ao crescente risco de invasão a países líderes na produção de tomate, como os Estados Unidos e a China, o que poderia comprometer a produção mundial (USDA, 2011; PEDROSO et al., 2020; PONTI et al., 2021).

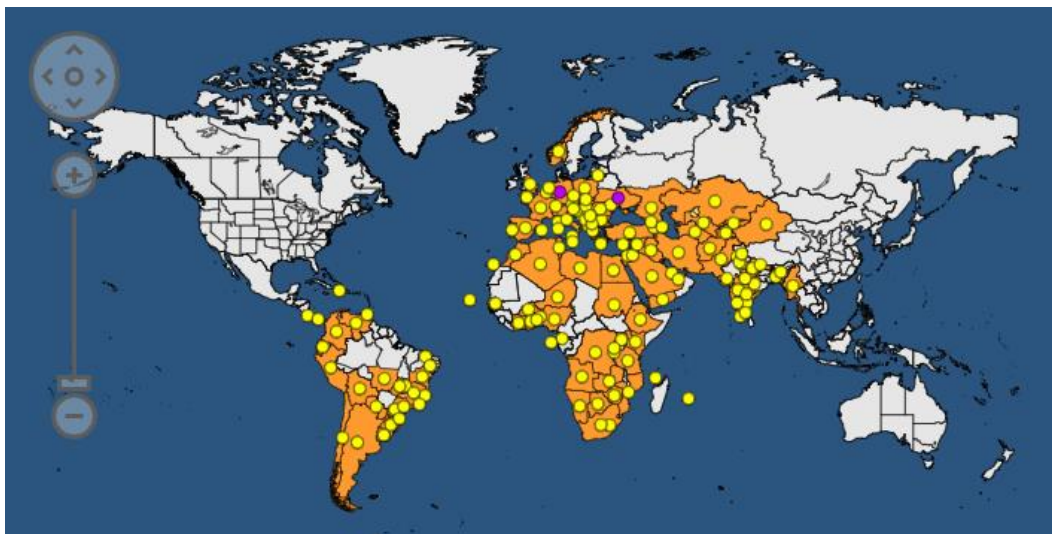


Figura 6. Distribuição global de *T. absoluta* (EPPO Global Database, 2022).

A presença da traça-do-tomateiro em regiões produtoras é uma preocupação, pois a fase juvenil do inseto ataca folhas e frutos do tomateiro, além de facilitar a infecção por patógenos (MICHEREFF FILHO et al., 2013). As larvas têm hábito minador e consomem o mesófilo da folha, formando galerias (Figura 7e) (MICHEREFF FILHO et al., 2013), enquanto que o ataque ao fruto ocorre pela perfuração da casca, reduzindo seu valor comercial (Figura 7f) (DIATTE et al., 2018). Quando não controlada, a traça-do-tomateiro pode causar a destruição de até 100% das plantas (Figura 7g) (URBANEJA et al., 2013).

A traça-do-tomateiro tem um ciclo de vida composto por quatro fases: ovo, larva (lagarta), pupa e adulto (mariposa) (Figura 7) (MICHEREFF FILHO et al., 2013). Os ovos são alongados, branco-amarelados e medem cerca de 0,36 mm (SANDA et al., 2018). As larvas iniciam amareladas e adquirem uma coloração verde e manchas roxas conforme se desenvolvem (URBANEJA et al., 2013). Elas precisam de temperaturas entre 25 e 30°C e baixa umidade relativa do ar para se desenvolver corretamente (NEGI et al., 2020). A partir do 10º dia, as larvas tendem a empupar no solo e os adultos emergem em até 10 dias após isso (HALDER et al., 2019). As mariposas são marrom acinzentadas, medem cerca de 7 mm e têm uma expectativa de vida de 10 a 15 dias (SANDA et al., 2018). As fêmeas colocam seus ovos nas nervuras das folhas, produzindo entre 100 e 300 ovos cada uma (SANDA et al., 2018; HALDER et al., 2019). Em geral, o ciclo de vida da traça-do-tomateiro dura entre 30 e 45 dias, podendo haver até 12 gerações por ano (MICHEREFF FILHO et al., 2013). No estado de São Paulo, foram registradas 9 gerações por ano (MIHSFELDT, 1998).

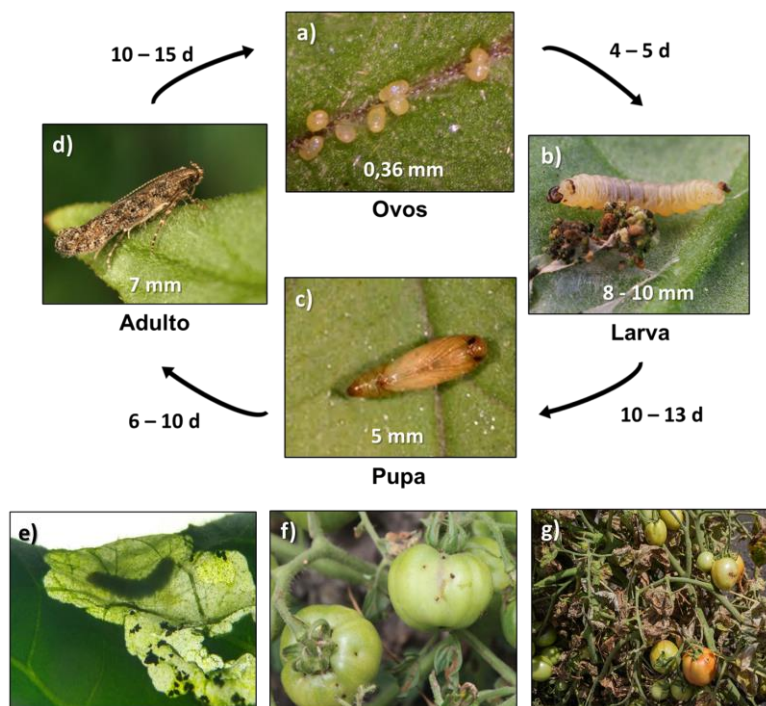


Figura 7. Ciclo de vida de *T. absoluta* e ataque às plantas de tomateiro. (a) fase de ovos (GOLDFREY et al., 2018), (b) fase larval (BIOBEST GROUP, 2020), (c) pupa (VISSER et al., 2017), (d) adulto (VISSER et al., 2017), (e) dano foliar, (f) danos em frutos (DIATTE et al., 2018) e (g) plantas destruídas (RWARE et al., 2020)

O controle químico é comumente utilizado para controlar a traça-do-tomateiro, mas o uso excessivo e não rotativo de inseticidas favorece o aparecimento de populações resistentes e diminui a eficácia agrônômica (DESNEUX et al., 2021). Populações resistentes a 17 ingredientes ativos já foram relatadas (INSECTICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE, 2022); no Brasil, houve relatos de resistência a inseticidas dos grupos químicos das abamectinas, espinosinas, piretroides e diamidas (SIQUEIRA et al., 2010; CAMPOS et al., 2014; SILVA et al., 2016; 2021). Alternativas ao controle químico incluem o uso de feromônios, controle biológico e melhoramento genético preciso (DESNEUX et al., 2021).

A utilização de armadilhas contendo feromônios sexuais pode ser uma alternativa para o monitoramento de pragas no campo, permitindo a identificação do momento e local mais adequado para a aplicação de inseticidas, com o objetivo de reduzir o impacto ambiental (SHARINI et al., 2021; BEVENGA et al., 2007). A aplicação de feromônios sintéticos no ambiente pode também ter como objetivo interferir no acasalamento dos insetos (DESNEUX et al., 2021). O excesso de feromônios femininos pode dificultar o reconhecimento das fêmeas pelos machos, reduzindo o número de cópulas e, conseqüentemente, o número de indivíduos na

população (COCCO et al., 2013). No entanto, só foram observados efeitos significativos pelo uso de feromônios sintéticos no controle de *T. absoluta* quando aplicados em grandes quantidades, o que comercialmente inviável devido ao seu alto custo de produção (COCCO et al., 2013; MEGIDO et al., 2013).

O controle biológico de *T. absoluta* tem sido amplamente implementado na Europa, África, Oriente Médio e, mais recentemente, na América do Sul (DESNEUX et al., 2021). Destacam-se no controle biológico o uso da bactéria *B. thuringiensis* e de fungos entomopatogênicos (DESNEUX et al., 2021; COLMENÁREZ et al., 2022). *B. thuringiensis* produz as proteínas Cry com propriedades inseticidas e é uma das mais utilizadas para controlar lepidópteros (QU et al., 2022). Versões comerciais de *B. thuringiensis* ou proteínas Cry isoladas mostraram eficácia para controlar larvas de *T. absoluta* em ensaios de laboratório e campo (JAMSHIDNIA et al., 2018; JALAPATHI et al., 2020). No entanto, relatos indicam possível baixa susceptibilidade de populações de *T. absoluta* a algumas toxinas Cry (SELALE et al., 2017; KUMAR et al., 2020).

Formulações comerciais de fungos endofíticos e entomopatogênicos, como *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, mostraram potencial para controlar *T. absoluta* com taxas de mortalidade de até 82% em larvas e 100% em pupas (NDEREYIMANA et al., 2019; ERASMUS et al., 2021). No entanto, a colonização lenta dos fungos nas plantas hospedeiras e a ação lenta sobre os insetos são limitações dos biopesticidas baseados em fungos (KLIEBER; REINEKE, 2015).

Os macrorganismos também são utilizados como agentes de controle biológico da traça-do-tomateiro, sendo encontrados mais de 200 potenciais inimigos naturais, destacando-se himenópteros e hemípteros (BIONDI et al., 2017; FERRACINI et al., 2018). Na América do Sul, o uso de parasitoides de ovos do gênero *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) resultou em taxas de controle superiores a 90% em experimentos em casa de vegetação e redução de danos de tomateiro em campo em mais de 75% (BIONDI et al., 2017; MANSOUR; BIONDI et al., 2020). *Nesidiocoris tenuis* e *Macrolophus pygmaeus* são as espécies predadoras mais utilizadas para o controle da traça-do-tomateiro, capazes de predação de ovos e larvas com eficiência (URBANEJA et al., 2009; DHANAPAL et al., 2021). Além do efeito direto sobre as pragas, supôs-se que a presença de *N. tenuis* em tomateiros modulou a defesa da planta contra *T. absoluta* pela regulação positiva de genes de defesa e indução da produção de metabólitos da rota do ácido jasmônico, relacionados a

resistência de plantas contra insetos (SARMAH et al., 2021). No entanto, a produção em larga escala dos inimigos naturais e a necessidade de múltiplas liberações em campo são desvantagens do uso comercial de macrorganismos para controlar pragas (PARRA; COELHO JUNIOR, et al., 2019).

O silenciamento gênico por RNAi é uma técnica que se baseia na entrega de dsRNA para inibir a expressão de genes específicos (FIRE et al., 1998). O sequenciamento e montagem do transcriptoma da traça-do-tomateiro revelou a presença da maquinaria de RNAi no inseto, indicando o potencial do uso da técnica com forma de controle de *T. absoluta* (CAMARGO et al., 2015). A clonagem de fragmentos dos genes *arginina quinase (AK)* ou *ATPase vacuolar (ATPase)* em vetor de expressão de *hairpin* permitiu a transformação genética de plantas de tomateiro com capacidade de expressar o dsRNA e induzir a mortalidade das larvas em 40% e redução de seus pesos em 50% (CAMARGO et al., 2016). Estudos posteriores avaliaram os efeitos do silenciamento de seis genes-alvo, incluindo *AK*, em larvas pela ingestão de *E. coli* HT115(DE3) expressando dsRNA (BENTO et al., 2020). A alimentação em dieta artificial com bactérias expressando dsRNA fez com que até 72% das larvas não completassem seu ciclo de vida, além de induzir significativamente o silenciamento do gene-alvo (BENTO et al., 2020).

A injeção em larvas de traça-do-tomateiro de dsRNA sintetizado *in vitro* homólogo a genes relacionados à transmissão sináptica resultou em uma mortalidade de até 92% dos insetos (MAJIDIANI et al., 2019). Foi sugerido que o dsRNA sintético absorvido por raízes e translocado para as folhas do tomateiro, quando fornecidas às larvas de *T. absoluta*, provocou mortalidade de aproximadamente 60% dos indivíduos (MAJIDIANI et al., 2019).

Biopesticidas baseados em dsRNA sintético aplicados em discos foliares foram utilizados com sucesso para controlar *T. absoluta* (RAMKUMAR et al., 2021). Cerca de 70% das larvas tratadas com dsRNA homólogo a um gene hormonal morreram 72 h após a ingestão, enquanto o nível de mRNA do gene-alvo foi significativamente menor comparado com as larvas do grupo controle (RAMKUMAR et al., 2021). Quando aplicado em folhas de tomateiro, o dsRNA sintético foi capaz de reduzir em 50% o dano foliar causado pelas larvas (RAMKUMAR et al., 2021).

A compatibilidade do dsRNA sintetizado *in vitro* com o agente biológico *N. tenuis* para controle de *T. absoluta* foi avaliada (SARMAH et al., 2021). A entrega do dsRNA de um gene-alvo de *T. absoluta* não causou danos ao predador, nem

alterou seu comportamento, indicando perspectivas positivas para incorporação dos biopesticidas à base de dsRNA sintético no manejo integrado de pragas (SARMAH et al., 2021).

A associação de dsRNA sintético homólogo a um gene envolvido na síntese de hormônio de *T. absoluta* com nanocarreadores de quitosana ou *Star polycation* (SPc) demonstrou relativa estabilidade, habilidade de penetração nas folhas de tomateiro, capacidade de reduzir a expressão do gene-alvo em larvas, a ponto de comprometer o empupamento e a emergência dos insetos, além de não afetar a sobrevivência de *N. tenuis* (WANG et al., 2023).

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o uso de biopesticidas à base de dsRNA sintético para controlar *T. absoluta* em tomateiro 'Micro-Tom'. Foram avaliadas duas formas de aplicação foliar do dsRNA sintético (imersão de folhas ou pulverização de plantas) para silenciamento de dois genes-alvos de larvas de *T. absoluta* empregando dsGFP como gene-controle. Além disso, moléculas de dsRNA sintético foram associadas a nanocarreadores de zeína (nZ), caracterizadas por meio de análises físico-química e moleculares e avaliadas para controle de diferentes fases da traça-do-tomateiro. Pela marcação fluorescente do dsRNA sintético ou do nZ, foi examinada a capacidade de absorção foliar e ingestão e excreção pelas larvas por microscopia confocal de escaneamento a laser. Também foi avaliada a habilidade de absorção radicular e translocação para folhas do dsRNA sintético ou nZ-dsRNA em plantas de tomateiro "MT. Por fim, foi realizado um ensaio para avaliar a toxicidade do nZ em tomateiro MT via radicular.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, M. S. T. Genetically engineered (modified) crops (*Bacillus thuringiensis* crops) and the world controversy on their safety. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 28, art. 52, 2018.
- ABBASI, R. et al. A novel paperclip double-stranded RNA structure demonstrates clathrin-independent uptake in the mosquito *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 127, art. 103492, 2020.
- ABRIEUX, A.; CHIU, J. Oral delivery of dsRNA by microbes: Beyond pest control. **Communicative & Integrative Biology**, v. 9, n.6, e1236163, 2016.
- ADDEY, K. A. The cost of partners' genetically modified organisms regulatory index on U.S. corn and soybean exports. **Food and Energy Security**, v. 10, n. 1, e265, 2020.
- ADREES, M. et al. Foliar spray of silicon nanoparticles improved the growth and minimized cadmium (Cd) in wheat under combined Cd and water-limited stress. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 29, n. 51, p. 77321-77332, 2022.
- ALBUQUERQUE, A. F. et al. Pesticides in Brazilian freshwaters: A critical review. **Environmental Science: Processes and Impacts**, v. 18, n. 7, p. 779–787, 2016.
- ALLEN, M. L., WALKER, W. B. Saliva of *Lygus lineolaris* digests double stranded ribonucleic acids. **Journal of Insect Physiology**, v. 58, p. 391-396, 2012.
- AMKUMAR, G. et al. RNA interference suppression of *V-ATPase b* and *juvenile hormone binding protein* genes through topically applied dsRNA on tomato leaves: developing biopesticides to control the South American pinworm, *Tuta absoluta* (Lepidoptera). **Frontiers in Physiology**, v. 12, art. 742871, 2021.
- ASLI, S.; NEUMANN, P. M. Colloidal suspensions of clay or titanium dioxide nanoparticles can inhibit leaf growth and transpiration via physical effects on root water transport. **Plant, Cell & Environment**, v. 32, n. 5, p. 577-584, 2009.
- AVNIEL, Amir et al. **Methods of introducing dsRNA to plant seeds for modulating gene expression**. Patent USA, n. WO 2014/106838 A2. Depósito: 30 dez. 2013. Concessão: 10 jul. 2014.
- BADDAR, Z. E. et al. Polymer-Coated Hydroxyapatite nanocarrier for Double-Stranded RNA delivery. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 25, p. 6811-6818, 2020.
- BAI, M. et al. Influence of diverse storage conditions of double-stranded RNA in vitro on the RNA interference efficiency in vivo insect *Tribolium castaneum*. **Pest Management Science**, v. 79, n. 1, p. 45-54, 2022.

BANKS, T. M. et al. A tale of two lobsters — transcriptomic analysis reveals a potential gap in the RNA interference pathway in the tropical rock lobster *Panulirus ornatus*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 19, art. 11752, 2022.

BAUM, J. et al. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 1322–1326, 2007.

BEGHIN, J. C.; GUSTAFSON, C. R. Consumer valuation of and attitudes towards novel foods produced with new plant engineering techniques: a review. **Sustainability**, v. 13, n. 20, art. 11348, 2021.

BENELLI, G. Mode of action of nanoparticles against insects. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 25, n. 13, p. 12329-12341, 2018.

BENTO, F. M. et al. Gene silencing by RNAi via oral delivery of dsRNA by bacteria in the South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*. **Pest Management Science**, v. 76, n. 1, p. 287–295, 2020.

BIOBEST GROUP. **Focus on *Tuta absoluta*, more than ever!**. Disponível em: <https://www.biobestgroup.com/en/news/focus-on-tuta-absoluta%2C-more-than-ever%21>. Acesso em: 22 out. 2022.

BIONDI, A. et al. Ecology, worldwide spread, and management of the invasive South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*: past, present, and future. **Annual Review of Entomology**, v. 63, n. 1, p. 239-258, 2018.

BOTELHO, M. T. et al. Genotoxic effects of silver nanoparticles on a tropical marine amphipod via feeding exposure. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 881, art. 503527, 2022.

BRAGA, A. et al. Global health risks from pesticide use in Brazil. **Nature Food**, v. 1, p. 312-314, 2020.

BRAGG, Z.; RIESKE, L. K. Feasibility of systemically applied dsRNAs for pest-specific RNAi-Induced gene silencing in White Oak. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, art. 830226, 2022a.

BRAGG, Z.; RIESKE, L. K. Spatial distribution and retention in loblolly pine seedlings of exogenous dsRNAs applied through roots. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 16, art. 9167, 2022b.

BRAVO, A. et al. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, n. 4: 423–435, 2007.

BRESSAN, E. A. et al. Assessment of gene flow to wild relatives and nutritional composition of sugarcane in Brazil. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, art. 598, 2020.

BROOKES, G.; BARFOOT, P. Environmental impacts of genetically modified (GM) crop use 1996–2018: impacts on pesticide use and carbon emissions. **Gm Crops & Food**, v. 11, n. 4, p. 215-241, 2020.

CAGLIARI, D. et al. Management of pest insects and plant diseases by non-transformative RNAi. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1319, 2019.

CAMARGO, R. A. et al. De novo transcriptome assembly and analysis to identify potential gene targets for RNAi-mediated control of the tomato leafminer (*Tuta absoluta*). **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, art. 635, 2015.

CAMARGO, R. A. et al. RNA interference as a gene silencing tool to control *Tuta absoluta* in tomato (*Solanum lycopersicum*). **PeerJ**, v. 4, art. 2673, 2016.

CAMPOS, M. R. et al. Spinosad and the Tomato Borer *Tuta absoluta*: a bioinsecticide, an invasive pest threat, and high insecticide resistance. **PloS One**, v. 9, n. 8, e103235, 2014.

CAPPELLE, K. et al. The involvement of clathrin-mediated endocytosis and two Sid-1-like transmembrane proteins in double-stranded RNA uptake in the Colorado potato beetle midgut. **Insect Molecular Biology**, v. 25, n. 3, p. 315-323, 2016.

CARNEIRO, A. et al. **Milho Bt**: teoria e prática da produção de plantas transgênicas resistentes a insetos-praga. Sete Lagoas: Embrapa, 2009. 26 p.

CHACKO, A. M. et al. Targeted nanocarriers for imaging and therapy of vascular inflammation. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 16, n. 3, p. 215-227, 2011.

CHRISTIAENS, O. et al. Increased RNAi efficacy in *Spodoptera exigua* via the formulation of dsRNA with guanylated polymers. **Frontiers in Physiology**, v. 9, art. 316, 2018.

CLEMENS, J.C. et al. Use of double-stranded RNA *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v. 97, p. 6499–6503, 2000.

COCCO, A. et al. Control of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lep. Gelechiidae) in greenhouse tomato crops using the mating disruption technique. **Journal of Applied Entomology**, v. 137, n.1, p. 16-28, 2013.

COLMENÁREZ, Y. C. et al. Sustainable management of the *invasive Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Journal of Integrated Pest Management**, v. 13, n. 1, p. 1-16, 2022.

COOPER, A. M. et al. Molecular mechanisms influencing efficiency of RNA interference in insects. **Pest Management Science**, v. 75, n. 1, p. 18-28, 2019.

DALAKOURAS, A. et al. Induction of silencing in plants by high-pressure spraying of in vitro-synthesized small RNAs. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, art. 1327, 2016.

DAS, S. *et al.* Chitosan, Carbon Quantum Dot, and Silica nanoparticle mediated dsRNA delivery for gene silencing in *Aedes aegypti*: a comparative analysis. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 7, n. 35, p. 19530-19535, 2015.

De SCHUTTER *et al.* Use of cell cultures in vitro to assess the uptake of long dsRNA in plant cells. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 58, p. 511–520, 2022.

DEAN, R. *et al.* The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Nature**, v. 434, p. 980-986, 2005.

DELGADO-MARTÍN, J. *et al.* Carbon Dots Boost dsRNA delivery in plants and increase local and systemic siRNA production. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 10, p. 5338, 2022.

DEMIRER, G.; LANDRY, M. Efficient transient gene knock-down in tobacco plants using carbon nanocarriers. **Bio-Protocol**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2021.

DESNEUX, N. *et al.* Integrated pest management of *Tuta absoluta*: practical implementations across different world regions. **Journal of Pest Science**, v. 95, n. 1, p. 17-39, 2021.

DHANAPAL, R. *et al.* Evaluation of predatory potential and prey stage preference of mirid bug, *Nesidiocoris tenuis* on tomato pinworm, *Tuta absoluta*. **Biologia**, v. 76, n. 10, p. 2965-2971, 2021.

DHANDAPANI, R. K. *et al.* Protamine–Lipid–dsRNA nanoparticles improve RNAi efficiency in the Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, n. 22, p. 6634-6643, 2022.

DI LELIO, I. *et al.* Transgenic plants expressing immunosuppressive dsRNA improve entomopathogen efficacy against *Spodoptera littoralis* larvae. **Journal of Pest Science**, n. 95, p. 1413-1428, 2022.

DIATTE, M. *et al.* Arthropod pest complex and associated damage in field-grown tomato in Senegal. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 38, n. 3, p. 243-253, 2018.

DIETZ, K.; HERTH, S. Plant nanotoxicology. **Trends in Plant Science**, v. 16, n. 11, p. 582-589, 2011.

DOOLETTE, C. L. *et al.* Quantifying the sensitivity of soil microbial communities to silver sulfide nanoparticles using metagenome sequencing. **PloS One**, v. 11, n. 8, e0161979, 2016.

DUBELMAN, S. Environmental fate of double-stranded RNA in agricultural soils. **PLoS ONE**, v. 9, art. 93155, 2014.

DUTTA, S. *et al.* Biopolymeric nanocarriers for nutrient delivery and crop biofortification. **ACS Omega**, v. 7, n. 30, p. 25909-25920, 2022.

EDWARDS, C. H. et al. Dendrimer-coated carbon nanotubes deliver dsRNA and increase the efficacy of gene knockdown in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. **Scientific Reports**, v. 10, art. 12422, 2020.

EL-ASHRAM, S. et al. Relative expression of microRNAs, apoptosis, and ultrastructure anomalies induced by gold nanoparticles in *Trachyderma hispida* (Coleoptera: tenebrionidae). **PloS One**, v. 15, n. 11, p. e0241837, 2020.

EL-SAMAD, L. M. et al. Silver nanoparticles instigate physiological, genotoxicity, and ultrastructural anomalies in midgut tissues of beetles. **Chemico-Biological Interactions**, v. 367, p. 110166, 2022.

EPPO Global Database. **Tuta absoluta**: distribution. 2022. Disponível em: <https://gd.eppo.int/taxon/GNORAB/distribution>. Acesso em: 22 out. 2022.

ERASMUS, R. et al. Susceptibility of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) pupae to soil applied entomopathogenic fungal biopesticides. **Insects**, v. 12, n. 6, p. 1-12, 2021.

EUROPEAN COMMISSION. **Regulation of the European parliament and of the council**: on the sustainable use of plant protection products and amending Regulation (EU) 2021/2115. Brussels: EC, 2022. 71 p.

FACTOR, B., BENTO, F. M., FIGUEIRA, A. Methods for delivery of dsRNAs for agricultural pest control: the case of lepidopteran pests. Cap. 23 p. 317-345. In: VASCHETTO, Luís Maria (Ed.). **Methods in Molecular Biology**. 1. ed. Berlin: Springer Nature, 2022. 369 p.

FEINBERG, E. H.; HUNTER, C. P. Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. **Science**, v. 301, n. 5639, p. 1545-1547, 2003.

FERNANDES, C. et al. Distribution of pesticides in agricultural and urban soils of Brazil: a critical review. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 22, n. 2, p. 256-270, 2020.

FERRACINI, C. et al. Natural enemies of *Tuta absoluta* in the Mediterranean basin, Europe and South America. **Biocontrol Science and Technology**, v. 29, n. 6, p. 578-609, 2019.

FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, p. 806-11, 1998.

FISCHER, J. R. et al. Aquatic fate of a double-stranded RNA in a sediment–water system following an over-water application. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, p. 727-734, 2017.

FITCHEN, J. H.; BEACHY, R. N. Genetically engineered protection against viruses in transgenic plants. **Annual Review of Microbiology**, v. 47, p. 739-763, 1993.

FRALEY, R. T. et al. Expression of bacterial genes in plant cells. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v. 80, n. 15, p. 4803-4807, 1983.

GAO, L. et al. Multiple Argonaute family genes contribute to the siRNA-mediated RNAi pathway in *Locusta migratoria*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 170, art. 104700, 2020.

GARCÍA-BETANCOURT, M. L. et al. Low Dimensional Nanostructures: measurement and remediation technologies applied to trace heavy metals in water. In: MURILLO-TOVAR, M. et al. (eds.). **Trace Metals in the Environment**. 1. ed. London: InTechOpen, 2019. chap. 9, p. 105-111.

GHOSH, J. C. et al. Trunk injection delivery of dsRNA for RNAi-based pest control in apple trees. **Pest Management Science**, v. 78, p. 3528-3533, 2022.

GHOSH, S. K. et al. Double-stranded RNA oral delivery methods to induce RNA interference in phloem and plant-sap-feeding hemipteran insects. **Journal of Visualized Experiments**, v. 135, e57390, 2018.

GODFREY, K. et al. ***Tuta absoluta*, the South American tomato leafminer**. Davis: ANR Publication, 2018. 7 p.

GONZÁLEZ-GRANDÍO, E. Carbon nanotube biocompatibility in plants is determined by their surface chemistry. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 19, n. 1, p. 431-431, 2021.

GORDON, K. H., WATERHOUSE, P. M. RNAi for insect-proof plants. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 11, p. 1231-2, 2007.

GUO, S.; KEMPHUES, K. J. *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. **Cell**, v. 81, n. 4, p. 611-20, 1995.

HALDER, J. et al. Biology and biorational management of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Proceedings of the Zoological Society**, v. 72, n. 2, p. 107-110, 2017.

HAMDAN, M. F. et al. Green revolution to gene revolution: technological advances in agriculture to feed the world. **Plants**, v. 11, n. 10, art. 1297, 2022.

HASHIRO, S.; YASUEDA, H. RNA Interference-based pesticides and antiviral agents: microbial overproduction systems for double-stranded RNA for applications in agriculture and aquaculture. **Applied Sciences**, v. 12, n. 6, art. 2954, 2022.

HAWKINS, N.J. et al. The evolutionary origins of pesticide resistance. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 3, n. 94, p. 135–155, 2018.

HEAD, G. P. et al. Evaluation of SmartStax and SmartStax PRO maize against western corn rootworm and northern corn rootworm: efficacy and resistance management. **Pest Management Science**, v. 73, p. 1883-1899, 2017.

HOANG, B. T. L. et al. RNAi as a foliar spray: efficiency and challenges to field applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, art. 6639, 2022.

HUVENNE, H.; SMAGGHE, G. 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, 2010.

IMAE, R. et al. Endomembrane-associated RSD-3 is important for RNAi induced by extracellular silencing RNA in both somatic and germ cells of *Caenorhabditis elegans*. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, art. 28198, 2016.

INSECTICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE – IRAC. **Arthropod Pesticide Resistance Database - APRD. *Tuta absoluta***. Disponível em: <https://www.pesticideresistance.org/display.php?page=species;arId=610>. Acesso em: 22 out. 2022.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**. Disponível em: <https://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>. Acesso em: 12 nov. 2022.

INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRIBIOTECH APPLICATIONS - ISAAA. **GM Crop Events approved in Brazil**. Disponível em: <https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/approvedeventsin/default.asp?CountryID=BR>. Acesso em: 06 nov. 2022.

INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRI-BIOTECH APPLICATIONS - ISAAA. **ISAAA's GM Approval Database**. Disponível em: <https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/>. Acesso em: 26 dez. 2023.

INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRI-BIOTECH APPLICATIONS - ISAAA. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2018: Biotech Crops Continue to Help Meet the Challenges of Increased Population and Climate Change**. Ithaca: ISAAA, 2018. 100 p.

JAIN, R. G. et al. Current scenario of RNAi-based hemipteran control. **Pest Management Science**, v. 77, n. 5, p. 2188-2196, 2020.

JAIN, R. G. et al. Foliar application of clay-delivered RNA interference for whitefly control. **Nature Plants**, v. 8, p. 535-548, 2022.

JAISWAL, D. et al. Contemporary approaches for genetic engineering in insect resistance transgenic plants. In: HASAN, W. et al. (eds.). **Advances in biodiversity conservation for sustainable development**. 1. ed. Parmar: Jharkhand, 2018. chap. 15, p. 238-241.

JALAPATHI, S. K. et al. Potential of Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* against the tomato pinworm, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Gelechiidae: lepidoptera). **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 30, n. 1, p. 1-4, 2020.

JAMES, C.; KRATTIGER, A. F. **Global Review of the Field Testing and Commercialization of Transgenic Plants, 1986 to 1995: The First Decade of Crop Biotechnology.** Ithaca: ISAAA, 1996. 31 p.

JAMSHIDNIA, A. et al. Efficiency of Spinosad, *Bacillus thuringiensis* and *Trichogramma brassicae* against the tomato leafminer in greenhouse. **Biocontrol**, v. 63, n. 5, p. 619-627, 2018.

JOGA, M. R. et al. RNAi efficiency, systemic properties, and novel delivery methods for pest insect control: What we know so far. **Frontiers in Physiology**, v. 7, art. 553, 2016.

JORGENSEN, R. A., RUNNING, M. P., MEYEROWITZ, E. M. *Chalcone synthase* cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. **Plant Molecular Biology**, v. 31, p. 957–973, 1996.

JOUDEH, N.; LINKE, D. Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 20, n. 1, art. 262, 2022.

JUDY, J. D.; UNRINE, J. M.; BERTSCH, P. M. Evidence for biomagnification of gold nanoparticles within a terrestrial food chain. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 2, p. 776-781, 2010.

KAPLANOGLU, E. et al. Plastid transformation of Micro-Tom tomato with a hemipteran double-stranded RNA results in RNA Interference in multiple insect species. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 7, art. 3918, 2022.

KATOCH, R. RNAi for insect control: current perspective and future challenges. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, n. 4, p. 847-873, 2013.

KHAJURIA, C. et al. Development and characterization of the first dsRNA-resistant insect population from western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte. **PLoS One**, v. 13, n. 5, e0197059, 2018

KLIEBER, J.; REINEKE, A. The entomopathogen *Beauveria bassiana* has epiphytic and endophytic activity against the tomato leaf miner *Tuta absoluta*. **Journal of Applied Entomology**, v. 140, n. 8, p. 580-589, 2015.

KOCH, A.; KOGEL, K. New wind in the sails: improving the agronomic value of crop plants through RNAi-mediated gene silencing. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, n. 7, p. 821-831, 2014.

KOCH, M. S. et al. The food and environmental safety of Bt crops. **Frontiers in Plant Science**, v. 29, n. 6, art. 283, 2015.

KOLGE, H.; KADAM, K.; GHORMADE, V. Chitosan nanocarriers mediated dsRNA delivery in gene silencing for *Helicoverpa armigera* biocontrol. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 189, art. 105292, 2023.

KORPAYEV, S. et al. Chitosan and silver nanoparticles are attractive auxin carriers: A comparative study on the adventitious rooting of microcuttings in apple rootstocks. **Biotechnology Journal**, v. 16, n. 8, p. 2100046, 2021.

KOTTAIPALAYAM-SOMASUNDARAM, et al. *Chitin Metabolism* as a potential target for RNAi-based control of the forestry pest *Hyblaea Puera* Cramer (Lepidoptera: Hyblaeidae). **Pest Management Science**, v. 78, p. 296–303, 2022.

KOURTIDIS, A. et al. RNAi applications in target validation. **Ernst Schering Research Foundation Workshop**, n. 61, p. 1-21, 2007.

KRAMER, M. G.; REDENBAUGH, K. Commercialization of a tomato with an antisense *polygalacturonase* gene: The FLAVR SAVR® tomato story. **Euphytica**, v. 79, p. 293–297, 1994.

KULKARNI, M. M. et al. Evidence of off-target effects associated with long dsRNAs in *Drosophila melanogaster* cell-based assays. **Nature Methods**, v. 3, n. 10, p. 833-838, 2006.

KUMAR, J. et al. Potential of standard strains of *Bacillus thuringiensis* against the tomato pinworm, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Egypt J. Biol. Pest Control**, v. 30, p. 123, 2020.

KUNTE, N., et al. Prospects, challenges and current status of RNAi through insect feeding. **Pest Management Science**, v. 76, p. 26-41, 2020.

LAISNEY, J. et al. RNAi in *Spodoptera frugiperda* Sf9 Cells via nanomaterial mediated delivery of dsRNA: a comparison of poly-l-arginine polyplexes and poly-l-arginine-functionalized Au nanoparticles. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 12, n. 23, p. 25645-25657, 2020.

LAMBERT, B.; PEFEROEN, M. Insecticidal Promise of *Bacillus thuringiensis*. **BioScience**, v. 42, n. 2, p. 112–122, 1992.

LE THOMAS, A.; TÓTH, K. F.; ARAVIN, A. A. To be or not to be a piRNA: genomic origin and processing of piRNAs. **Genome Biology**, v. 15, art. 204, 2014.

LI, X. et al. Application progress of plant-mediated RNAi in pest control. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, art. 963026, 2022a.

LI, J. et al. Identification and characterization of a double-stranded RNA degrading nuclease influencing RNAi efficiency in the rice leaf folder *Cnaphalocrocis medinalis*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 7, art. 3961, 2022b.

LIU, S. et al. RNA-based technologies for insect control in plant production. **Biotechnology Advances**, v. 39, art. 107463, 2020.

LÜ, J. et al. Double-stranded RNA targeting *vATPase B* reveals a potential target for pest management of *Henosepilachna vigintioctopunctata*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 165, art. 104555, 2020.

LU, Q. et al. Synthetic nanoscale RNAi constructs as pesticides for the control of *Locust Migratoria*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, n. 35, p. 10762-10770, 2022.

LUCAS, K.; RAIKHEL, A. Insect MicroRNAs: biogenesis, expression profiling and biological functions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 43, n. 1, p. 24–38, 2013.

LUCENA-LEANDRO, V. 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, art. 15836, 2022.

MA, Z. et al. A first greenhouse application of bacteria-expressed and nanocarrier-delivered RNA pesticide for *Myzus persicae* control. **Journal of Pest Science**, v. 22, p. 1-13, 2022.

MAJIDIANI, S. et al. RNAi in *Tuta absoluta* management: effects of injection and root delivery of dsRNAs. **Journal of Pest Science**, v. 92, n. 4, p. 1409-1419, 2019.

MAKTURA, G. C., PARANHOS, B., MARQUES-SOUZA, H. RNAi in fruit flies (Diptera: Tephritidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 145, n. 8, p. 740-756, 2021.

MANSOUR, R. et al. Releasing natural enemies and applying microbial and botanical pesticides for managing *Tuta absoluta* in the MENA region. **Phytoparasitica**, v. 49, n. 2, p. 179-194, 2020.

MAO, Y. B. et al. Silencing a cotton bollworm *P450 monooxygenase* gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 1307-1313, 2007.

MCGEE, C. F. et al. Concentration-dependent responses of soil bacterial, fungal and nitrifying communities to silver nano and micron particles. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 25, p. 18693–18704, 2018.

McGRAW, E. et al. Insight into cellular uptake and transcytosis of peptide nanoparticles in *Spodoptera frugiperda* cells and isolated midgut. **ACS Omega**, v. 7, n. 13, p. 10933-10943, 2022.

MEGIDO, R. C. et al. Pheromone-based management strategies to control the tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae): a review. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, v. 17, n. 3, p. 475-482, 2013.

MEZZETTI, B. et al. RNAi: what is its position in agriculture?. **Journal of Pest Science**, v. 93, n. 4, p. 1125-1130, 2020.

MICHEREFF FILHO, M. et al. **A traça-do-tomateiro no mundo**. Brasília, DF: Embrapa, 2013. 31 p.

MIHSFELDT, L. H. et al. Biologia de *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) em dieta artificial. **Scientia Agricola**, v. 56, n. 4, p. 769-776, 1998.

MISHRA, S. et al. Selection for high levels of resistance to double-stranded RNA (dsRNA) in Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) using non-transgenic foliar delivery. **Scientific Reports**, v. 11, art. 6523, 2021.

MITTER, N. et al. Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses. **Nature Plants**, v. 3, n. 2, p. 16207, 2017.

MOHAN, C. et al. hRNAi-mediated knock-down of *Sphenophorus levis* V-ATPase E in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp interspecific hybrid) affects the insect growth and survival. **Plant Cell Reports**, v. 40, p. 507-516, 2021.

MOLESINI, B. et al. Nanovector-mediated exogenous delivery of dsRNA induces silencing of target genes in very young tomato flower buds. **Nanoscale Advances**, v. 4, n. 21, p. 4542-4553, 2022.

MONDAL, M. et al. Environmental RNAi pathways in the two-spotted spider mite. **BMC Genomics**, v. 22, n. 1, p. 1-11, 2021.

MURPHY, K. A. et al. Ingestion of genetically modified yeast symbiont reduces fitness of an insect pest via RNA interference. **Scientific Reports**, v. 6, art. 22587, 2016.

NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a *chimeric chalcone synthase* gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous Genes in trans. **Plant Cell**, v. 2, n. 4, p. 279-289, 1990.

NASCIMENTO, J. et al. Adoption of *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides in agricultural systems and new approaches to improve their use in Brazil. **Biological Control**, v. 165, art. 104792, 2022.

NDEREYIMANA, A. et al. Pathogenicity of some commercial formulations of entomopathogenic fungi on the tomato leaf miner, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 70, n. 1, p. 1-5, 2019.

NEGI, S. et al. Thermal requirements of *Tuta absoluta* (Meyrick) and influence of temperature on its population growth on tomato. **Journal of Biological Control**, v. 34, n. 1, p. 73-81, 2020.

NGANSO, B. T. et al. A genome-wide screening for RNAi pathway proteins in Acari. **BMC Genomics**, v. 21, n. 1, p. 1-16, 2020.

NIÑO-SÁNCHEZ, J. et al. BioClay™ prolongs RNA interference-mediated crop protection against *Botrytis cinerea*. **J. Integr. Plant Biol.**, v. 64, n. 11, p. 2187-2198, 2022.

NITNAVARE, R. B. et al. Next Generation dsRNA-Based Insect Control: success so far and challenges. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, art. 673576, 2021.

NITNAVARE, R.B. Next Generation dsRNA-Based Insect Control: Success So Far and Challenges. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, art. 673576, 2021.

NOVINA, C.D; SHARP, P.A. The RNAi revolution. **Nature**, v. 430, p. 161-164, 2004.

OMANO, N.; MACINO, G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. **Molecular Microbiology**, v. 6, n. 22, p. 3343-3353, 1992.

OMOTO, C. et al. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science**, v. 72, p. 1727-1736, 2016.

PALLIS, S. et al. Toxicity of a novel dsRNA-based insecticide to the Colorado potato beetle in laboratory and field trials. **Pest Management Science**, v. 78, n. 9, p. 3836-3848, 2022.

PARRA, J. R. P.; COELHO Jr, A. Applied biological control in Brazil: from laboratory assays to field application. **Journal of Insect Science**, v. 19, n. 2, p. 1-6, 2019.

PEDROSO, M. T. M. **Estudo exploratório da cadeia produtiva do tomate para a indústria**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2020. 26 p.

PEREIRA, T. **Introdução à técnica de interferência por RNA - RNAi**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2013. 170 p.

PINZÓN, N. et al. Functional lability of RNA-dependent RNA polymerases in animals. **PLoS Genetics**, v. 15, n. 2, e1007915, 2019.

PIZETTA, C. S. R. et al. RNA interference-mediated tolerance to whitefly (*Bemisia tabaci*) in genetically engineered tomato. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 148, p. 281-291, 2022.

PONTI, L. et al. Biological invasion risk assessment of *Tuta absoluta*: mechanistic versus correlative methods. **Biological Invasions**, v. 23, n. 12, p. 3809-3829, 2021.

PUGSLEY, C. E. et al. Recent advances in engineered nanoparticles for RNAi-mediated crop protection against insect pests. **Frontiers in Agronomy**, v. 3, art. 652981, 2021.

QU, M. et al. Bioinsecticides as future mainstream pest control agents: opportunities and challenges. **Frontiers of Agricultural Science and Engineering**, v. 9, n. 1, art. 82, 2022.

RANI, L. et al. An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. **Journal of Cleaner Production**, v. 283, art. 124657, 2021.

RODRIGUES, T. 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. 1-15, 2021b.

RODRIGUES, T. et al. Development of dsRNA as a sustainable bioinsecticides: from laboratory to field. In: RAUZAN, B. M.; LORSBACH, B. A (eds.). **Crop Protection**

Products for Sustainable Agriculture. 1. ed. Washington, DC: ACS, 2021a. chap. 5, p. 65-82.

RODRIGUES, T.; FIGUEIRA, A. Management of insect pest by RNAi: a new tool for crop protection. In: ABDURAKHMONOV, I. (ed.). **RNA Interference**. 1. ed. Rijeka, Croacia: InTech, 2016. chap. 18, p. 371-390.

RWARE, H. et al. **Tomato farmers in Kenya believe area-wide pest management can easily be instituted and effectively control *Tuta absoluta***. 2020. Disponível em: <https://blog.invasive-species.org/2020/07/01/tomato-farmers-in-kenya-believe-area-wide-pest-management-can-easily-be-instituted-and-effectively-control-tuta-absoluta/>. Acesso em: 18 out. 2022.

SAN MIGUEL, K.; SCOTT, J. G. The next generation of insecticides: dsRNA is stable as a foliar-applied insecticide. **Pest Management Science**, v. 72, p. 801-809, 2016.

SANDA, N. B. et al. Biological invasion of tomato leaf miner, *Tuta absoluta* (Meyrick). **Asian Journal of Agricultural and Horticultural Research**, v. 1, n. 4, p. 1-14, 2018.

SARGENT, R.; CARRILLO, J.; KREMEN, C. Common pesticides disrupt critical ecological interactions. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 38, n. 3, p. 207-210, 2022.

SARMAH, N. *et al.* dsRNA-mediated pest management of *Tuta absoluta* is compatible with its biological control agent *Nesidiocoris tenuis*. **Insects**, v. 12, n. 4, p. 274, 2021.

SARMAH, N. *et al.* Metabolomic and genomic approach to study defense induction by *Nesidiocoris tenuis* against *Tuta absoluta* and *Tetranychus urticae* in tomato plants. **Metabolites**, v. 12, n. 9, p. 838, 2022.

SATTELLE, D. B. Invertebrate neurones, genomes, phenotypic and target-based screening; their contributions to the search for new chemical leads and new molecular targets for the control of pests, parasites and disease vectors. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 187, p. 105175, 2022.

SCHWARTZ, S. H. et al. Carbon Dots for efficient small interfering RNA delivery and gene silencing in plants. **Plant Physiology**, v. 184, n. 2, p. 647–657, 2020.

SELALE, H. et al. Cry1Ac-mediated resistance to tomato leaf miner (*Tuta absoluta*) in tomato. **Plant Cell Tiss Organ Cult.**, v. 131, p. 65–73, 2017.

SEN, G. L.; BLAU, H. M. A brief history of RNAi: the silence of the genes. **The FASEB Journal**, v. 20, n. 9, p. 1293-1299, 2006.

SHAHINI, S. *et al.* Effectiveness of bio-insecticides and mass trapping based on population fluctuations for controlling *Tuta absoluta* under greenhouse conditions in Albania. **Heliyon**, v. 7, n. 1, e05753, 2021.

SHAHZAD, K; MANZOOR, F. Nanoformulations and their mode of action in insects: a review of biological interactions. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 1, p. 1-11, 2021.

SHARMA, S.; KOONER, R.; ARORA, R. Insect Pests and Crop Losses. In: ARORA, R.; SANDHU, S. (eds.). **Breeding Insect Resistant Crops for Sustainable Agriculture**. 1. ed. London: Springer Nature, 2017. chap. 2, p. 45-66.

SILVA, A. T. et al. Conjugated polymer nanoparticles for effective siRNA delivery to tobacco BY-2 protoplasts. **BMC Plant Biology**, v. 10, art. 291, 2010.

SILVA, J. E. et al. High resistance to insect growth disruptors and control failure likelihood in Brazilian populations of the tomato pinworm *Tuta absoluta*. **Phytoparasitica**, v. 49, n. 4, p. 689-701, 2021.

SILVA, T. B. et al. Susceptibility levels of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to minor classes of insecticides in Brazil. **Crop Protection**, v. 79, p. 80-86, 2016.

SINGH, I. K. et al. Comparative analysis of double-stranded RNA degradation and processing in insects. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, at. 17059, 2017.

SIQUEIRA, H. A. A. et al. Abamectin resistance and synergism in Brazilian populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). **International Journal of Pest Management**, v. 47, n. 4, p. 247-251, 2010.

TANING, C. N. T. et al. Does RNAi-based technology fit within EU sustainability goals? **Trends in Biotechnology**, v. 39, n. 7, p. 644-647, 2021.

THIERRY, D.; VAUCHERET, H. Sequence homology requirements for transcriptional silencing of 35S transgenes and post-transcriptional silencing of nitrite reductase (trans)genes by the tobacco 271 locus. **Plant Molecular Biology**, v. 32, p. 1075–1083, 1996.

TOMA, H. E. **Nanotecnologia molecular: materiais e dispositivos**. 5. ed. São Paulo: Blucher, 2009. 335 p.

TOMOYASU, Y.; DENELL, R. E. Larval RNAi in *Tribolium* (Coleoptera) for analyzing adult development. **Development Genes and Evolution**, v. 214, n. 11, p 575-578, 2004.

TONNANG, H. E. Z. et al. Identification and risk assessment for worldwide invasion and spread of *Tuta absoluta* with a focus on Sub-Saharan Africa: Implications for phytosanitary measures and management. **PloS One**, v. 10, n. 9, p. e0138319, 2015.

TRIPATHI, D. K. et al. An overview on manufactured nanoparticles in plants: uptake, translocation, accumulation and phytotoxicity. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 110, p. 2-12, 2017.

URBANEJA, A. et al. Biology, ecology and management of the South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*. In: PEÑA, J. (ed.). **Potential Invasive Pests of Agricultural Crops**. Wallingford: CABI, 2013. p. 98-125.

URBANEJA, A. et al. Suitability of the tomato borer *Tuta absoluta* as prey for *Macrolophus pygmaeus* and *Nesidiocoris tenuis*. **Journal of Applied Entomology**, v. 133, n. 4, p. 292-296, 2009.

USDA. **New Pest Response Guidelines**: tomato leafminer (*Tuta absoluta*). Washington: USDA, 2011. 176 p.

VETUKURI, R. R. Spray-induced gene silencing: an innovative strategy for plant trait improvement and disease control. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 21, n. 1, art. 387921S11, 2021.

VISSER, D. First records of the tomato leaf miner *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) in South Africa. **BiolInvasions Records**, v. 6, n. 4, p. 301-305, 2017.

WANG, K. et al. Comparison of efficacy of RNAi mediated by various nanoparticles in the rice striped stem borer (*Chilo suppressalis*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 165, art. 104467, 2020.

WANG, X. 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, p. 1003-1015, 2023.

WANG, X. et al. Exploring China stepping into the dawn of chemical pesticide-free agriculture in 2050. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, art. 942117, 2022.

WANG, Y. et al. Second-Generation sequencing supply an effective way to screen RNAi targets in large scale for potential application in pest insect control. **PloS One**, v. 6, n. 4, p. 1-18644, 2011.

WATERHOUSE, P. M., GRAHAM M. W., WANG, M. B. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v. 95, p. 13959–13964, 1998.

WEI, H. et al. Nanocarrier-mediated transdermal dsRNA-NPF1 delivery system contributes to pest control via inhibiting feeding behavior in *Grapholita molesta*. **Journal of Pesticide Science**, v. 95, p. 983–995, 2022.

WHANG, X.; CHI, Y.; LI, F. Exploring China stepping into the dawn of chemical pesticide-free agriculture in 2050. **Front Plant Science**, v.13, art. 942117, 2022.

WHITTEN, M. et al. Symbiont-mediated RNA interference in insects. **Proceedings of the Royal Society Biological Sciences**, v. 283, n. 1825, art. 20160042, 2016.

WILLOW, J. et al. RNAi efficacy is enhanced by chronic dsRNA feeding in pollen beetle. **Communications Biology**, v. 4, n. 444, p. 1-8, 2021.

WILLOW, J.; VEROMANN, E. Highly variable dietary RNAi sensitivity among Coleoptera. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, art. 790816, 2021.

WISE, J. C. et al. Trunk injection delivery of dsRNA for RNAi -based pest control in apple trees. **Pest Management Science**, v. 78, n. 8, p. 3528-3533, 2022.

WORRALL, E. A et al. Exogenous application of RNAi-inducing double-stranded RNA inhibits aphid-mediated transmission of a plant virus. **Front. in Plant Science**, v. 10, p. 265, 2019.

WU, H.; LI, Z. Nano-enabled agriculture: how do nanoparticles cross barriers in plants?. **Plant Communications**, v. 3, n. 6, art. 100346, 2022.

XIE, Z. et al. An important role of an inducible RNA-dependent RNA polymerase in plant antiviral defense. **Proceedings of The National Academy of Sciences of the USA**, v. 98, n. 11, p. 6516-6521, 2001.

YANG, J. et al. Construction and application of star polycation nanocarrier-based microRNA delivery system in *Arabidopsis* and maize. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 20, art. 219, 2022.

YANG, W. et al. Advances in nanocarriers to improve the stability of dsRNA in the environment. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, art. 974646, 2022.

YAO, Y. et al. Multiple dsRNases involved in exogenous dsRNA degradation of fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. **Frontiers in Physiology**, v. 13, art. 850022, 2022.

YONG, J. et al. Clay nanoparticles efficiently deliver small interfering RNA to intact plant leaf cells. **Plant Physiology**, v. 190, n. 4, p. 2187-2202, 2022.

YONG, J. et al. Sheet-like clay nanoparticles deliver RNA into developing pollen to efficiently silence a target gene. **Plant Physiology**, v. 187, n. 2, p. 886–899, 2021.

YOON, J. S.; GURUSAMY, D.; PALLI, S. R. Accumulation of dsRNA in endosomes contributes to inefficient RNA interference in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 90, p. 53-60, 2017.

YOU, L. et al. Over-expression of RNA interference (RNAi) core machinery improves susceptibility to RNAi in silkworm larvae. **Insect Molecular Biology**, v. 29, n. 4, p. 353-362, 2020.

ZACOUTEGUY, A. M. B. et al. The adverse effects of injected functionalized multi-walled carbon nanotube (f-MWCNT) on in vivo neurosecretory brain cells of Jamaican field cricket, *Gryllus assimilis*. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 28, p. 66968–66977, 2021.

ZHANG, C.; RUVKUN, G. New insights into siRNA amplification and RNAi. **RNA Biology**, v. 9, n. 8, p. 1045-1049, 2012.

ZHANG, H. et al. Engineering DNA nanostructures for siRNA delivery in plants. **Nature Protocols**, v.15, p. 3064–3087, 2020.

ZHANG, H. et al. Nanoparticle cellular internalization is not required for RNA delivery to mature plant leaves. **Nature Nanotechnology**, v. 17, p. 197–205, 2022.

ZHANG, H. et al. RNA-dependent RNA polymerase could extend the lasting validity period of exogenous dsRNA. **Pest Management Science**, v. 78, n. 11, p. 4569-4578, 2022.

ZHANG, H. et al. Gold-Nanocluster-mediated delivery of siRNA to intact plant cells for efficient gene knockdown. **Nano Letters**, v. 21, n. 13, p. 5859-5866, 2021.

ZHANG, J. et al. Full crop protection from an insect pest by expression of long double-stranded RNAs in plastids. **Science**, v. 347, p. 991-4, 2015.

ZHENG, Y. et al. A polymer/detergent formulation improves dsRNA penetration through the body wall and RNAi-induced mortality in the soybean aphid *Aphis glycines*. **Pest Management Science**, v. 75, n. 7, p. 1993-1999, 2019.

ZHOU R. et al. Comparative analysis of Argonaute-dependent small RNA pathways in *Drosophila*. **Molecular Cell**, v. 32, p. 592–599, 2008.

3. CONTROLE DA TRAÇA-DO-TOMATEIRO POR dsRNA SINTÉTICO

Resumo

Tuta absoluta, também conhecida como a traça-do-tomateiro, é uma das pragas mais ameaçadoras do tomate (*Solanum lycopersicon*) devido à destruição direta do mesofilo foliar e dos frutos, facilitando também a infecção por patógenos. Casos de populações da traça-do-tomateiro resistentes a inseticidas têm sido frequentemente relatados. Deste modo, novas estratégias para controlar *T. absoluta* são urgentemente necessárias. Desde a descoberta de que o fenômeno de silenciamento gênico pode ser mediado pela entrega de moléculas de RNA de fita dupla (dsRNA), a técnica de RNA de interferência (RNAi) se tornou potencialmente útil para controlar pragas agrícolas. A redução de custos atrelada às novas tecnologias para a produção de dsRNA *in vitro* tornaram o desenvolvimento de biopesticidas à base de dsRNA sintéticos mais atraentes nos últimos anos. Neste contexto, avaliamos a eficácia do uso de dsRNA sintético no controle da traça-do-tomateiro por dois métodos de aplicação em tomateiro Micro-Tom (MT), imersão ou pulverização foliar, para dois genes-alvos, *arginina kinase* (AK) ou *ATPase vacuolar* (ATPase), empregando *Green Fluorescent Protein* (GFP) como gene-controle. Por meio de ambos os métodos, constatamos que o dsRNA sintético foi capaz de causar significativa mortalidade larval e reduzir o dano foliar em tomateiro, especialmente o dsAK. A redução significativa do acúmulo de transcritos dos genes-alvos foi confirmada por RT-qPCR em larvas alimentadas por 4 d. No entanto, após 8 d, observou-se a recuperação dos níveis de transcritos dos genes-alvos nas larvas, o que sugere a necessidade de aplicações sequenciais de dsRNA sintético para manutenção do silenciamento gênico. As imagens de microscopia confocal mostraram a capacidade de dsRNA sintético em penetrar nas folhas do tomateiro MT e ser ingerido pelas larvas de *T. absoluta*. Por fim, confirmamos a habilidade de penetração radicular e translocação para folhas do dsRNA sintético em tomateiro MT, o que indicaria uma alternativa para controle de *T. absoluta* por dsRNA sintético pela aplicação radicular.

Palavras-chave: Absorção radicular, Aplicação foliar, Controle de pragas, Imersão foliar, Pulverização.

Abstract

The tomato leafminer, *Tuta absoluta*, is one of the most serious pests of tomato plants (*Solanum lycopersicum*), causing direct destruction of leaf mesophyll and fruits while also facilitating infection by pathogens. Examples of tomato leafminer resistance to insecticides have been constantly reported. Therefore, novel strategies for controlling *T. absoluta* are urgently required. Since the discovery that gene silencing can be mediated by the delivery of double-stranded RNA (dsRNA) molecules, RNA interference (RNAi) has become a potentially useful approach for pest control. The decreasing costs and new technologies for in vitro production of dsRNA have made the development of biopesticides based on synthetic dsRNA attractive. In this context, we evaluated the efficacy of synthetic dsRNA to control the tomato leaf miner through two application methods in Micro-Tom tomato plants: immersion and foliar spraying. We used two target genes, *arginine kinase (AK)* or *vacuolar ATPase (ATPase)*, and *Green Fluorescent Protein (GFP)* as a control. Both application methods caused significant larval mortality and reduced leaf damage in tomato plants, especially dsAK. We confirmed a significant reduction in target gene expression in larvae fed for 4 d by RT-qPCR. However, after 8 d, we observed a recovery of target gene transcript levels in the larvae, suggesting the necessity of sequential applications of synthetic dsRNA to maintain gene silencing. Confocal microscopy images demonstrated the ability of synthetic dsRNA to penetrate Micro-Tom leaves and to be ingested by *T. absoluta* larvae. Finally, we confirmed the ability of synthetic dsRNA to be taken up by the roots and translocate to leaves in Micro-Tom tomato plants, indicating a potential alternative for *T. absoluta* control through root application of synthetic dsRNA.

Keywords: Foliar application. Root uptake. Pest Control. Soaking. Spraying.

3.1 Introdução

RNA de interferência (RNAi) é uma técnica molecular baseada no fenômeno de silenciamento gênico pós-transcricional em eucariotos e desencadeada pela entrega de moléculas de RNA em dupla fita (dsRNA), que tem sido amplamente empregada em estudos de genética funcional ou reversa (FIRE et al., 1998; NOVINA; SHARP, 2004). Paralelamente, a capacidade de silenciar genes específicos pela oferta de dsRNA possibilita o uso de RNAi para controlar pragas agrícola por meio do silenciamento de genes essenciais na sobrevivência, desenvolvimento ou reprodução dos insetos (JOGA et al., 2016). Deste modo, o RNAi representa como uma alternativa mais sustentável e segura para o controle de insetos (TANING et al., 2021).

As primeiras demonstrações que revelaram o potencial do RNAi para o controle de pragas foram realizadas pela embebição de cultura de células ou microinjeção em insetos (CLEMENS et al., 2000; TOMOYASU; DENELL, 2004). Contudo, a partir de evidências da ocorrência do silenciamento gênico em insetos pela ingestão de dsRNA, formas mais agronomicamente viáveis passaram a ser investigadas para o uso do RNAi no controle de pragas (BAUM et al., 2007; MAO et al., 2007).

Plantas transgênicas expressando dsRNA têm demonstrado excelente eficácia para controlar insetos, em especial os coleópteros (HEAD et al., 2017; MOHAN et al., 2021). No entanto, o baixo nível de expressão do dsRNA ou seu processamento pela maquinaria de RNAi da própria planta tendem a reduzir a eficácia das plantas transgênicas no controle de pragas (KAPLANOGLU et al., 2022; KUNTE et al., 2020). Além disso, a necessidade de altos investimentos em pesquisa e desenvolvimento, o longo processo de desregulamentação e as restrições na aceitação do consumo de OGM pela sociedade limitam a difusão da tecnologia de RNAi por cultivares transgênicas (KUNTE et al., 2020).

Microrganismos transgênicos que expressam dsRNA também têm sido testados para controlar pragas, resultando em índices satisfatórios de controle (ABRIEUX; CHIU, 2016; BENTO et al., 2020). Entretanto, a baixa persistência dos microrganismos no ambiente e as potenciais limitações relacionadas à desregulamentação ou aceitação de OGM pelos consumidores dificultam a exploração definitiva desta forma de entrega de dsRNA aos insetos (KUNTE et al., 2020).

Por outro lado, a aplicação de dsRNA sintetizado *in vitro* representa uma alternativa ao uso de modificações genéticas no controle de pragas (JOGA et al., 2016). A aplicação de dsRNA sintético sobre as plantas, na forma de um biopesticida, demonstrou eficácia para controlar o escaravelho-da-batata (*L. decemlineata*) em laboratório e em campo (RODRIGUES et al., 2021a, 2021b). No entanto, a rápida degradação no ambiente, possíveis efeitos adversos à insetos não-alvo benéficos e limitada eficiência de controle de lepidóptera e dípteras restringem seu uso (DUBELMAN et al., 2014; RODRIGUES; FIGUEIRA, 2016). Além disso, o alto custo de produção e a dificuldade de síntese em larga escala também limitam o desenvolvimento de biopesticidas à base de dsRNA sintético, embora novas tecnologias para biossíntese industrial de dsRNA possam vir a reduzir os custos e ampliar a oferta para o mercado agrícola (HASHIRO; YASUEDA, 2022; RODRIGUES et al., 2021a).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de dsRNA sintético pela aplicação em tomateiro MT para controle de *Tuta absoluta*.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Criação da traça-do-tomateiro

A criação de *Tuta absoluta* foi conduzida no Laboratório de Melhoramento de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), Piracicaba - SP. As larvas recém-eclodidas (neonatas) de *T. absoluta* eram mantidas em gaiolas de acrílico ou de plástico com dimensões 70×50×50 cm, nas quais eram adicionadas plantas de tomateiro “Santa Cruz” para alimentação das larvas. Depois de passarem pelas fases larval e pupal, os adultos (mariposas) eram coletados e transferidos para uma gaiola reservada à cópula e postura. Nesta gaiola eram acondicionadas apenas folhas para a centralização das posturas de forma a otimizar a coleta dos ovos. As gaiolas eram monitoradas diariamente para coleta de adultos recém-emergidos, fornecimento de plantas e limpeza de resíduos. A criação foi mantida em sala com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotofase de 14 h e umidade relativa entre 50 e 70%.

3.2.2 Escolha dos genes-alvos de *T. absoluta* para silenciamento gênico

Os genes *arginina quinase (AK)* e a *ATPase vacuolar subunidade A (ATPase)* foram escolhidos como alvos baseados em estudos anteriores realizados pelo grupo (CAMARGO et al., 2016; BENTO et al., 2020). O gene *green fluorescent protein (GFP)*

foi selecionado como gene-controle, supostamente incapaz de ocasionar silenciamento gênico em *T. absoluta* pela ausência de sequências homólogas no transcriptoma de insetos (RODRIGUES; FIGUEIRA, 2016).

3.2.3 Aquisição do dsRNA sintético

As moléculas de dsRNA sintético foram adquiridas da empresa RNA Greentech (Texas, EUA). As regiões-alvo dos genes *AK* e *ATPase* foram desenhadas por BENTO et al. (2019) a partir do banco de dados transcriptômicos de larvas de *T. absoluta* (CAMARGO et al., 2015). O dsRNA referente ao gene *green fluorescent protein (GFP)*, foi desenhado por SOUZA (2022) a partir do vetor *GFP:L4440*, de modo a ter tamanho similar ao ds*AK* (Tabela 2).

Tabela 2. Tamanho, em pb, das moléculas dsRNA sintético

Gene-alvo	Tamanho (pb)	% GC
<i>AK</i>	262	50,4
<i>ATPase</i>	285	53,3
<i>GFP</i>	262	30,5

O material recebido em solução foi purificado por precipitação com isopropanol gelado, adicionado na proporção 1:1, seguida do descarte do sobrenadante e centrifugação do *pellet*, seguido de lavagem com 70% etanol por três ciclos de centrifugação. Posteriormente, o dsRNA sintético foi ressuspensão em água tratada com 0,01% de dietilpirocarbonato autoclavada (água DEPC inativada) e armazenado em refrigerador a -20°C.

3.2.4. Entrega de dsRNA sintético a *T. absoluta*

Foram avaliadas duas formas de aplicação do dsRNA sintético em plantas de tomateiro "Micro-Tom" (MT). A primeira envolveu a imersão de folhas em uma solução de dsRNA sintético (*soaking*), enquanto que o segundo método avaliou a pulverização de dsRNA sintético nas plantas com a ajuda de um equipamento de alta pressão (*spraying*).

3.2.4.1 Imersão de folhas de tomateiro “Micro-Tom”

Previamente, foram conduzidos dois ensaios para avaliar a viabilidade de folhas destacadas de MT em placas de Petri para estimar a quantidade de líquido retido nas folhas quando imergidas em solução com água e adjuvante. Para avaliar a viabilidade de sobrevivência de folhas destacadas de MT em placas de Petri de plástico de 10 x 15 cm, folhas de plantas MT de 35 d foram cuidadosamente destacadas e mantidas sob quatro condições: com papel-filtro no fundo da placa, adição de algodão no pecíolo das folhas, ambos ou nenhum deles. As placas de Petri foram vedadas com plástico filme e dispostas em câmara de germinação a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotofase de 14 h e umidade relativa entre 50 e 70%. As folhas foram avaliadas após 15 d. Em seguida, foi conduzido um ensaio para estimar a quantidade de líquido retido nas folhas de MT quando imersas em solução de água DEPC inativada e 0,03% de Silwet-L77 (adjuvante). Doze folhas de diversas plantas MT de 35 d foram destacadas, pesadas e imersas em água com adjuvante. Após a remoção do excesso de líquido, as folhas foram novamente pesadas e a diferença de peso foi usada para estimar a quantidade de líquido retidos na superfície foliar de cada folha.

O ensaio de entrega de dsRNA sintético a *T. absoluta* por imersão de folhas de MT foi conduzido a partir de folhas de plantas de 35 d, sendo seis folhas por tratamento. Foram preparadas soluções de dsRNA sintético (*dsAK* ou *dsATPase*) diluídas em água DEPC inativada com 0,03% de Silwet L-77 em doses correspondentes a 2,5, 5, 10 e 20 μg de dsRNA sintético por folha. As folhas de MT eram destacadas da planta com auxílio de uma lâmina, removendo apenas os três folíolos da extremidade (Figura 8a). Imediatamente, as folhas foram imersas nas soluções de dsRNA sintético em vidro-relógio mantido sobre o gelo (Figura 8b). Após a imersão, as folhas eram delicadamente sacudidas para remoção do excesso de líquido. Em seguida, foram adicionados pedaços de algodão umedecidos no pecíolo de cada folha, que eram colocadas em placas de Petri de plástico contendo papel-filtro umedecido. As placas eram mantidas entreabertas por até uma hora para secagem do excesso de umidade das folhas (Figura 8c). Depois de secas, foram aplicadas três larvas neonatas de *T. absoluta* por folha, sendo uma lagarta por folíolo (Figura 8d).

Como tratamentos controles, foram utilizadas soluções de dsRNA sintético para silenciamento de *GFP*, bem como uma solução contendo apenas água DEPC inativada com adjuvante. Também foi implementado um tratamento positivo utilizando o inseticida comercial Match EC® (MH) (Syngenta, Basileia, Suíça), do grupo químico das benzoiluréias (inibidores da biossíntese de quitina), na dose recomendada pelo fabricante.

Foram estabelecidas seis repetições por tratamento. As placas foram fechadas, vedadas com plástico filme e alocadas aleatoriamente em câmaras de crescimento com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotofase de 14 h e umidade relativa de $60 \pm 10\%$ (Figura 8e).

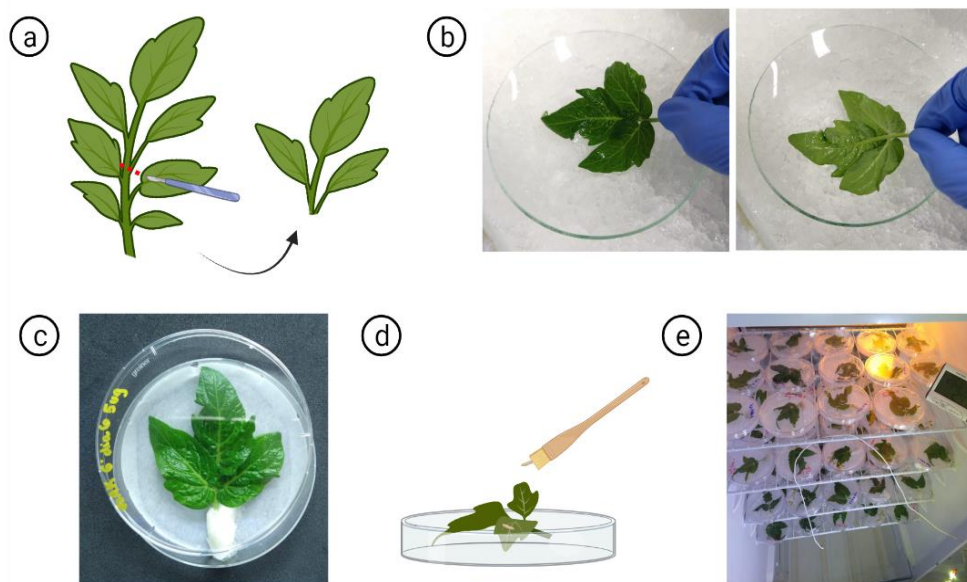


Figura 8. Ensaio de entrega de dsRNA sintético por imersão foliar: **(a)** secção de folíolo de tomateiro MT, **(b)** imersão em solução de dsRNA sintético, **(c)** alocação da folha tratada com dsRNA sintético em placa de Petri, **(d)** inoculação de neonatas de *T. absoluta* **(e)** disposição das placas em câmara de crescimento (criado com Biorender.com)

As avaliações das larvas e das folhas foram realizadas no sétimo dia após aplicação, sendo verificada a mortalidade larval e estimada a área das lesões de *T. absoluta* nas folhas de MT. A mortalidade das larvas foi avaliada pela observação dos aspectos físicos e movimentação dos insetos. A área das lesões foi estimada a partir de imagens fotográficas das folhas, que foram analisadas usando o *software* ImageJ.

3.2.4.2 Pulverização em tomateiro “Micro-Tom”

Os ensaios de pulverização de dsRNA sintético em plantas de tomateiro MT foram feitos com auxílio de um aerógrafo. Previamente, foram realizados ensaios para determinar a quantidade adequada de solução para aplicação homogênea nas plantas de tomateiro. Para isso, diversos volumes de água destilada com 0,03% de Silwet L-77 e corante rosa alimentício foram pulverizados com o auxílio de um aerógrafo (Steula, Pedreira, SP, Brasil) conectado a uma bomba compressora (Kohlbach, Jaraguá do Sul, SP, Brasil). A aplicação foi feita lateralmente a uma distância de 25 cm das plantas, que estavam alocadas em um suporte plástico, e a planta era girada no sentido horizontal à medida que avançava a aplicação para garantir uma cobertura uniforme. Determinou-se que 1,5 mL de solução era suficiente para uma aplicação homogênea nas plantas de tomateiro.

Para a entrega de dsRNA sintético às larvas de *T. absoluta* por pulverização foliar, plantas MT de 40 d foram mantidas em câmara-úmida por até 12 h para estimular a abertura estomática (Figura 9a). Após, as plantas foram pulverizadas com 1,5 mL de solução de dsRNA sintético com auxílio de um aerógrafo a 25 cm de distância com vazão de ar de 1,55 kgf/cm² (Figura 9b). As plantas eram movimentadas lentamente no sentido horizontal para cobrir toda a superfície foliar. Foram aplicadas doses crescentes de dsRNA sintético (2,5, 5 e 10 µg de dsRNA por planta), diluídas em água DEPC inativada com 0,03% de Silwet L-77, para os genes-alvo *AK*, *ATPase* ou *GFP*. Também foram realizadas aplicações simultâneas de *dsAK* e *dsATPase* (proporção 1:1) nas doses de 2,5, 5 e 10 µg de dsRNA sintético por planta. Como controle negativo, foi usada água e, como controle positivo, o inseticida comercial Malation 1000 EC[®] (ML) (FMC Co., Filadélfia, PA, EUA), do grupo dos organofosforados (inibidores de acetilcolinesterase), foi usado na dose recomendada pelo fabricante. O pH das soluções de dsRNA sintético também foi verificado com tiras de papel medidor de pH.

Nove larvas neonatas de *T. absoluta* foram inoculadas por planta (três larvas por folha, três folhas por planta) (Figura 9c). Cada tratamento contou com oito repetições (total de 72 larvas por tratamento). As plantas infestadas com larvas foram dispostas em estantes com luz artificial e fotófase de 14h em sala com temperatura de 25 ± 1°C e umidade relativa de 60 ± 10%.

A mortalidade de *T. absoluta* e o dano foliar em tomateiro foram avaliados no décimo dia seguindo os mesmos procedimentos realizados no ensaio de fornecimento de dsRNA sintético por imersão foliar.

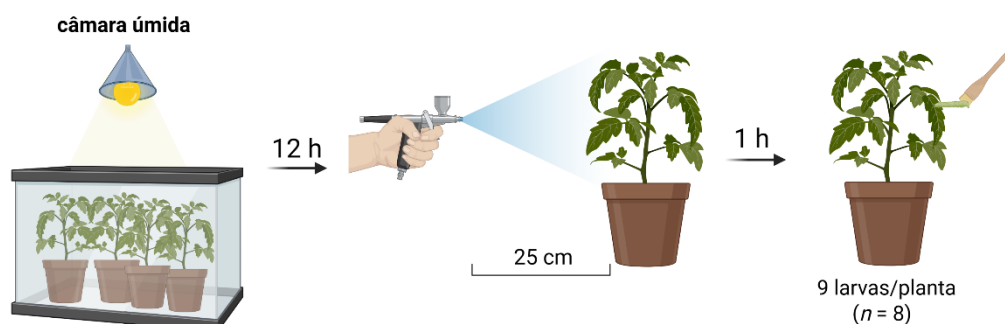


Figura 9. Ensaio de pulverização de dsRNA sintético em plantas “MT”: (a) plantas submetidas à câmara úmida por 12h; (b) pulverização com aerógrafo; (c) inoculação das larvas em plantas pulverizadas (criado com Biorender.com)

3.2.4.3 Silenciamento gênico em *T. absoluta*

Para verificar o efeito da entrega de dsRNA sintético na redução do nível de mRNA dos genes-alvo em *T. absoluta*, foi implementado um ensaio para coleta de larvas alimentadas com dsRNA sintético e posterior extração de RNA total, transcrição reversa (RT) e análise da expressão gênica relativa por PCR quantitativo (qPCR).

Oito plantas MT de 40 d foram pulverizadas na dose de 10 µg dsRNA para os genes-alvo *AK*, *ATPase* ou *GFP*. Larvas alimentadas com plantas pulverizadas com água e adjuvante formaram o grupo-controle. Cerca de 250 larvas neonatas foram inoculadas nas plantas, que foram alocadas em caixas de plástico transparente (40x50x50cm) cobertas com telas para evitar a fuga das larvas. As caixas foram mantidas em estante de luz com condições controladas ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, 14:8h e $60 \pm 10\%$). Nos dias 4 e 8 após a pulverização, 80 larvas foram cuidadosamente coletadas e divididas entre quatro microtubos (20 larvas por tubo), que eram condicionados em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenados a -80°C .

A extração de RNA total foi realizada a partir de um *pool* de 20 larvas por amostra. As amostras foram maceradas com o auxílio de um pistilo em microtubos de 1,5 mL em um cadinho preenchido com nitrogênio líquido. Para a extração do RNA total das amostras maceradas, foram utilizados o reagente TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MS, EUA) e o kit RNA Direct-Zol™ RNA Miniprep (Zymo Research, Irvine, CA, EUA). O RNA total extraído foi quantificado em Nanodrop

(Thermo Fisher Scientific) e tratado com DNase I (Thermo Fisher Scientific). Para síntese de DNA complementar (cDNA), foram utilizados 1 µg de RNA tratado com DNase I (Thermo Fisher Scientific), 1 µL de oligo(dT) (50 µM), 1 µL de dNTP (10 µM) e água DEPC inativada. As amostras foram incubadas a 65°C por 5 min e logo resfriadas em gelo por 1 min. Em seguida, foram adicionados 4 µL de 5X *First-Strand Buffer*, 1 µL de DTT (0,1 M), 40 U (unidades) de Ribolock (Thermo Fisher Scientific) e 200 U de SuperScript® III RT (Thermo Fisher Scientific) e submeteu-as a 50°C por 60 min e posterior aumento para 70°C por 15 min. A qualidade do cDNA foi verificado por amplificação via PCR convencional com *primers* específicos para o gene *elongation factor 1-alpha (EF1 alpha)* (Tabela 3).

A análise de expressão gênica relativa foi realizada por RT-qPCR, adicionando-se 1 µL de cDNA, diluído em 1:2 ou 1:4 (v/v) em água deionizada autoclavada para amostras de larvas tratadas com *dsAK* ou *dsATPase*, respectivamente, 0,5 µM de *primers* de *AK* ou *ATPase* (*reverse* e *forward*) (Tabela 1) e 5 µL de *SYBR Green qPCR Master Mix* (Invitrogen, Waltham, MA, EUA), em volume final igual a 10 µL. A análise de RT-qPCR foi realizada no RotorGene-6000 (Qiagen, Hilden, NW, Alemanha) em duplicatas técnicas e com a inclusão de dois controles negativos sem cDNA. As condições de amplificação no termociclador foram inicialmente 50°C por 2 min e 95°C por 2 min, seguido de 40 ciclos de três etapas: 95°C por 20 s, 60°C por 30 s e 72°C por 30 s. Após a amplificação, foi determinado a curva de dissociação entre 72 e 95°C.

Tabela 3. Sequências de *primers* específicos utilizados nas reações de PCR e qPCR

Gene	Sequência senso	Sequência antisenso	Amplicon (pb)
<i>ATPase vacuolar subunidade A (ATPase)</i>	ACCTGTCGGAGATCGTGC AG	AACGGGCAGAAACGGTCC TA	139
<i>Arginina quinase (AK)</i>	GGCACATTCTACCCACTC AC	GATGGTCCTCTTCGTTGC AC	190
<i>Fator de alongamento 1 alfa (EF1)</i>	CCTGGGCACAGAGATTTTC AT	GTCCGTTCTTGGAGATAC CG	118

A expressão relativa foi padronizada usando o gene *fator de alongamento 1 alfa (EF1)* como gene de referência e calculada utilizando a equação de LIVAK; SCHMITTGEN (2001), a partir dos valores de ciclo de quantificação (C_q).

3.2.5 Detecção de dsRNA sintético por microscopia confocal

Para visualização do dsRNA sintético em plantas e em larvas por microscopia confocal de escaneamento a laser C2 (Nikon, Minato, Japão) o dsRNA (gene-alvo *AK*) foi marcado com cianina 3 (Cy3) utilizando o kit *Silencer* (Thermo Fisher Scientific).

3.2.5.1 Pulverização em tomateiro “Micro-Tom”

Plantas de tomateiro MT de 40 d foram pulverizadas com 2,5 µg de dsRNA-Cy3 de forma similar ao descrito em “3.2.4.2 Pulverização em tomateiro “Micro-Tom”. Após secas, larvas de *T. absoluta* em 1-2^o ou 3-4^o instar foram inoculadas nas plantas, que foram mantidas em estante de luz com condições controladas. Após 24 h, amostras das folhas foram coletadas e utilizadas para montagem de lâmina, enquanto que as larvas foram recolhidas e sacrificadas por congelamento. Os materiais foram analisados por microscopia confocal (λ igual 554/568 nm). Como grupo-controle, amostras de folhas e larvas tratados com 2,5 µg de dsRNA sintético não-marcado (gene-alvo *AK*) foram coletados e também analisados por microscopia confocal.

3.2.5.2 Absorção radicular e translocação em tomateiro “Micro-Tom”

Plantas de tomateiro MT de duas semanas foram lavadas em água-corrente para remoção de substrato de suas raízes. Logo após, foram colocadas em tubos de 50 mL contendo 15 mL de solução de 2,5 µg de dsRNA-Cy3 diluído em água DEPC inativa, de modo que apenas as raízes tivessem em contato com a solução. Os tubos foram parcialmente cobertos com papel alumínio e tiveram suas tampas furadas para permitir passagem de ar. As plantas foram mantidas em estante de luz em condições controladas de temperatura, umidade relativa do ar e fotoperíodo controlados ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14h). Após 2 e 4 dias, foram seccionadas amostras de 1 cm das raízes, 0,2 cm de largura dos caules e 1 cm² de folhas para montagem de lâminas que foram analisadas por microscopia confocal (λ igual 554/568 nm). Como tratamento-controle, foram utilizadas amostras de tecidos de plantas tratadas com 2,5 µg de dsRNA não-marcado.

3.2.6 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram conduzidas nos *softwares* R ou GraphPad Prism. As análises estatísticas da mortalidade de larvas de *T. absoluta* foram realizadas por

ANOVA e testes de Dunnet, a fim de comparar os tratamentos e o grupo-controle (água), bem como para comparar os efeitos entre as doses de dsRNA sintético.

No experimento de estimativa do dano foliar causado pelo ataque de larvas de *T. absoluta* foi utilizada a análise estatística Kruskal-Wallis e testes de Dunn para comparar os tratamentos e o grupo-controle (água), assim como para comparar os efeitos entre as doses de dsRNA sintético.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Controle de *T. absoluta*

A tecnologia de RNAi é apontada como uma alternativa inovadora e sustentável para controlar pragas agrícolas (KUNTE et al., 2020). A habilidade de silenciamento gênico em insetos pela ingestão de dsRNA e a capacidade de a produção de dsRNA sintético em larga escala a um baixo custo permitiria que a tecnologia de RNAi fosse empregada no controle de pragas em campo por meio da aplicação direta em plantas (JOGA et al., 2018; SAN MIGUEL; SCOTT, 2016).

A escolha de um método adequado para aplicação de dsRNA sintético é um fator crítico para o sucesso do controle de uma praga (CAGLIARI et al., 2019). Para insetos que atacam as folhas, o dsRNA sintético poderia ser aplicado diretamente na superfície foliar (CAGLIARI et al., 2019). Por outro lado, para insetos minadores de folhas, que consomem apenas o conteúdo interno foliar, como a traça-do-tomateiro, o dsRNA sintético necessitaria penetrar a folha e estar disponível no mesófilo (HOANG et al., 2022; MAJIDIANI et al., 2019). Embora as evidências indiquem que o dsRNA sintético é capaz de penetrar as folhas, os mecanismos envolvidos ainda não estão elucidados (BENNETT et al., 2020; DALAKOURAS et al., 2016).

Neste contexto, avaliamos a eficiência da aplicação foliar de dsRNA sintético homólogo aos genes *AK* ou *ATPase* na mortalidade de larvas de *T. absoluta* e no dano foliar em tomateiro por meio da imersão de folhas ou pulverização em superfície de plantas. Em ambos os casos foi adicionado adjuvante não-iônico ao dsRNA sintético para facilitar a molhabilidade das folhas.

Os ensaios para avaliar as condições de manutenção de folhas de tomateiro MT em placa de Petri durante a duração do experimento demonstraram que a inclusão de papel-filtro no fundo da placa e de algodão no pecíolo das folhas mantiveram mais adequadamente a viabilidade das folhas, enquanto as demais condições testadas favoreceram o aparecimento de clorose, necrose ou murcha nas folhas (Figura 1,

Apêndices). Deste modo, os ensaios de aplicação de dsRNA sintético foram conduzidos em folhas mantidas com algodão em placas de Petri sob papel-filtro umedecidos. Enquanto isso, os ensaios realizados para estimar a quantidade de líquido retido na superfície foliar após a imersão das folhas de tomateiro MT em uma solução contendo água e adjuvante demonstraram que, em média, cerca de 200 μL de líquido ficam retidos em cada folha (Tabela 1, Apêndice).

As análises dos dados de mortalidade larval em folhas imersas em dsRNA sintético indicaram que os tratamentos com dsAK ou dsATPase foram capazes de causar mortalidade significativamente maior que do grupo-controle (água) apenas nas maiores doses (10 ou 20 μg de dsAK ou 20 μg de dsATPase por folha) (Figura 10a). As análises estatísticas não apontaram diferença significativa na mortalidade entre doses de um mesmo gene-alvo (Figura 10b, 10c, 10d).

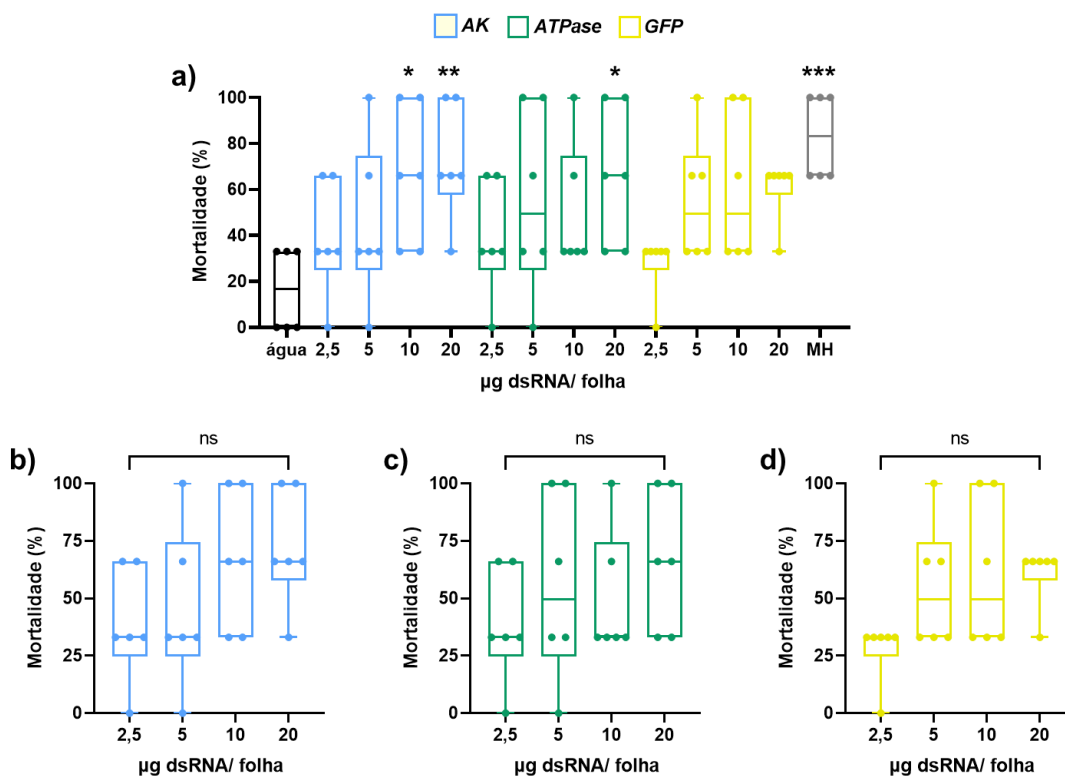


Figura 10. Mortalidade de larvas de *T. absoluta* alimentadas em folhas de MT tratadas por imersão em solução de dsRNA sintético homólogos aos genes-alvo *AK* ou *ATPase*, o gene-controle *GFP* e Match EC® (MH) após 7 d. (a) comparação entre os tratamentos e o grupo-controle (água), e comparação entre doses nos tratamentos com (b) dsAK (c) dsATPase ou (d) dsGFP ($n = 6$; análise estatística por ANOVA e teste de comparações múltiplas por Dunnet; * $< p = 0,5$; ** $< p = 0,1$; *** $< p = 0,05$)

O dano foliar em tomateiro MT neste experimento só foi estatisticamente menor que o grupo controle para os tratamentos com *dsGFP* ou *dsAK* na dose de 20 µg dsRNA/ folha ou de *dsATPase* na dose de 10 µg dsRNA/ folha, além do inseticida comercial Match EC® (MH) (Figura 11 a). Só houve diferença estatística na redução do dano foliar entre doses quando comparada a maior e a menor dose de dsRNA homólogo ao gene-alvo *AK*, enquanto não houve diferenças estatísticas no dano foliar entre doses de *dsATPase* ou *dsGFP* (Figura 11 c, 11 d).

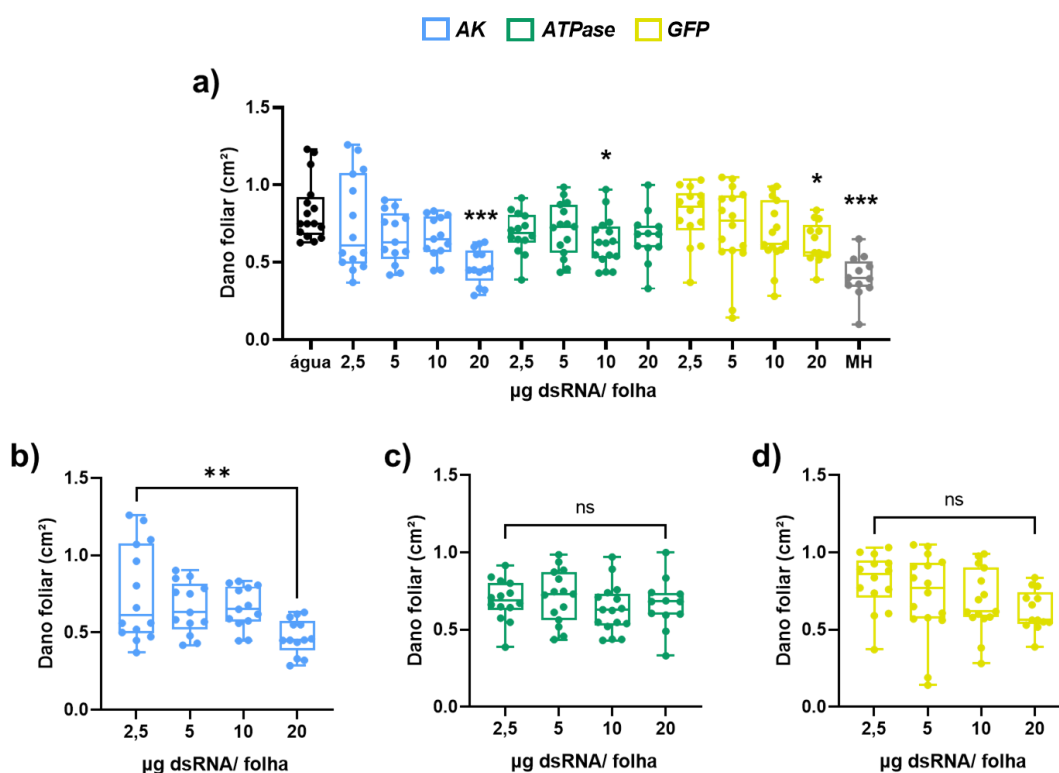


Figura 11. Dano foliar causado por larvas de *T. absoluta* em folhas de MT imersas em solução de dsRNA sintético para silenciamento dos genes-alvo aos genes-alvo *AK* ou *ATPase*, o gene-controle *GFP* e Match EC® (MH) após 7 d. (a) comparação entre os tratamentos e o grupo-controle (água), e comparação entre doses nos tratamentos com (b) *dsAK*, (c) *dsATPase* ou (d) *dsGFP* ($n = 11-16$; análise estatística por Kruskal-Wallis e teste de comparações múltiplas por Dunn; * $< p = 0,5$; ** $< p = 0,1$; *** $< p = 0,05$)

Uma vez observado um possível efeito da ingestão de dsRNA sintético em larvas da traça-do-tomateiro por meio da imersão de folhas, passamos a explorar aplicação de dsRNA sintético por pulverização foliar. A pulverização foliar é uma das formas mais comuns e viáveis de aplicar pesticidas em plantas (SPADOTTO et al., 2010). No entanto, estima-se que cerca de 90% do volume do pesticida seja perdido durante a pulverização devido à deriva, o que aumenta os riscos ambientais e à saúde

humana e eleva os custos de operações, além de causar prejuízos ao atingir organismos não-alvo (SPADOTTO et al., 2010; KÖHLER; TRIEBSKORN, 2013). Em contrapartida, o silenciamento gênico por RNAi é altamente específico, afetando apenas a praga-alvo com especificidade maior, reduzindo assim o impacto ambiental e o risco à saúde humana (RODRIGUES; PETRICK, 2020).

A aplicação foliar de dsRNA sintético pode apresentar importantes limitações, tais como a difícil molhabilidade das folhas, devido à hidrofobicidade da cutícula foliar e das ceras, além da presença de tricomas (HOANG et al., 2022). Ademais, o dsRNA sintético aplicado sobre a superfície de plantas está sujeito à degradação por radiação UV e por microrganismos, além de ser lavado da superfície das plantas pela ação da chuva (HOANG et al., 2022; KUNTE et al., 2020). No entanto, foi relatado que o dsRNA sintético, após secar, não é facilmente removido das folhas pela ação da chuva (SAN MIGUEL; SCOTT, 2015).

A aplicação de biopesticidas à base de dsRNA sintético poderia ser melhorada pela adição de surfactantes que aumentem a aderência das moléculas nas plantas, aumentando a espalhabilidade do dsRNA sintético sobre as folhas e facilitando a penetração foliar (JAIN et al., 2022). Há evidências que o uso de pulverizadores de alta pressão possa promover a penetração do RNAs sintético nas folhas (DALAKOURAS et al., 2016; SCHWARTZ et al., 2020), o que poderia aumentar a disponibilidade do dsRNA no mesófilo para ingestão por insetos minadores de folhas, como a traça-do-tomateiro.

A pulverização foliar de dsRNA sintético resultou em mortalidade larval de *T. absoluta* significativamente maior para todas as doses de dsRNA homólogo ao gene *AK*, com cerca de 60% de mortalidade na maior dose testada (10 µg de dsRNA/planta) (Figura 12a). Ao compararmos a mortalidade larvas entre as doses de ds*AK*, observou-se uma diferença estatística apenas entre a maior e a menor dose, enquanto a dose intermediária (5 µg dsRNA/planta) não apresentou desempenho estatisticamente diferente das demais (Figura 12 a, 12 b).

Em um trabalho anterior de nosso grupo, a utilização de *E. coli* expressando ds*AK* em uma dieta artificial produziu uma taxa de mortalidade larval de mais de 70% (BENTO et al., 2020). Deste modo, sugere-se que o gene *AK* é um potencial gene-alvo para silenciamento gênico por RNAi para controle de *T. absoluta*.

Por outro lado, apenas o grupo de larvas expostas ao *dsATPase* na maior dose teve uma mortalidade estatisticamente superior ao grupo-controle (Figura 12 a). Além disso, não houve um efeito dose-dependente entre as doses testadas, o que foi semelhante aos resultados obtidos no ensaio de imersão de folhas em solução de dsRNA sintético (Figura 10d).

Anteriormente, a aplicação dsRNA sintético homólogo ao gene *ATPase sub. B* em discos foliares de tomateiro promoveu a morte de 60% das larvas, mas utilizando uma dose de 50 µg/cm² de folha (RAMKUMAR et al., 2021). Deste modo, os resultados indicam que o gene *ATPase* pode não ser tão adequado quanto o gene *AK* para controle de *T. absoluta*.

A entrega simultânea de *dsAK* e *dsATPase* teve um efeito estatisticamente maior na mortalidade larval em relação ao grupo-controle (Figura 12 a). No entanto, embora tenham sido superiores aos tratamentos com somente *dsATPase* (Figura 12 g), os tratamentos com *dsAK* e *dsATPase* não apresentaram um efeito sinérgico, sendo estatisticamente equivalentes aos tratamentos com a aplicação de apenas *dsAK* (Figura 12 f). Deste modo, não é possível afirmar que o uso simultâneo de dois genes-alvo seja mais eficaz para o controle de *T. absoluta* do que o uso de apenas um deles.

Enquanto isso, o inseticida comercial Malation 1000 EC[®] causou a morte de quase 100% das larvas (Figura 12 a). Deste modo, o uso do inseticida comercial foi aparentemente mais eficaz do que o dsRNA sintético contra a traça-do-tomateiro. No entanto, é importante ressaltar que o uso de inseticidas químicos pode ter impactos negativos na saúde humana e no meio ambiente, enquanto o uso de dsRNA sintético como é uma alternativa mais seletiva e sustentável a longo prazo (TANING et al., 2021).

Adicionalmente, as doses de 5 ou 10 µg de *dsGFP* por planta resultaram em mortalidade larval superior ao grupo-controle (Figura 12 a), todavia, não houve diferença estatística entre as doses (Figura 12 d). A mortalidade larval observada nos tratamentos com *dsGFP* pode ser atribuída a possíveis fenômenos de sobreposição de vias de regulação gênica mediadas por RNAs ou saturação da maquinaria central de RNAi (COOPER et al., 2019). Esses fenômenos, por sua vez, podem causar uma regulação descontrolada da expressão gênica, afetando diferentes sistemas biológicos, como o imunológico e o hormonal, além de falhas no controle da expressão de elementos genéticos móveis presentes no genoma do inseto (KUNTE et al., 2020).

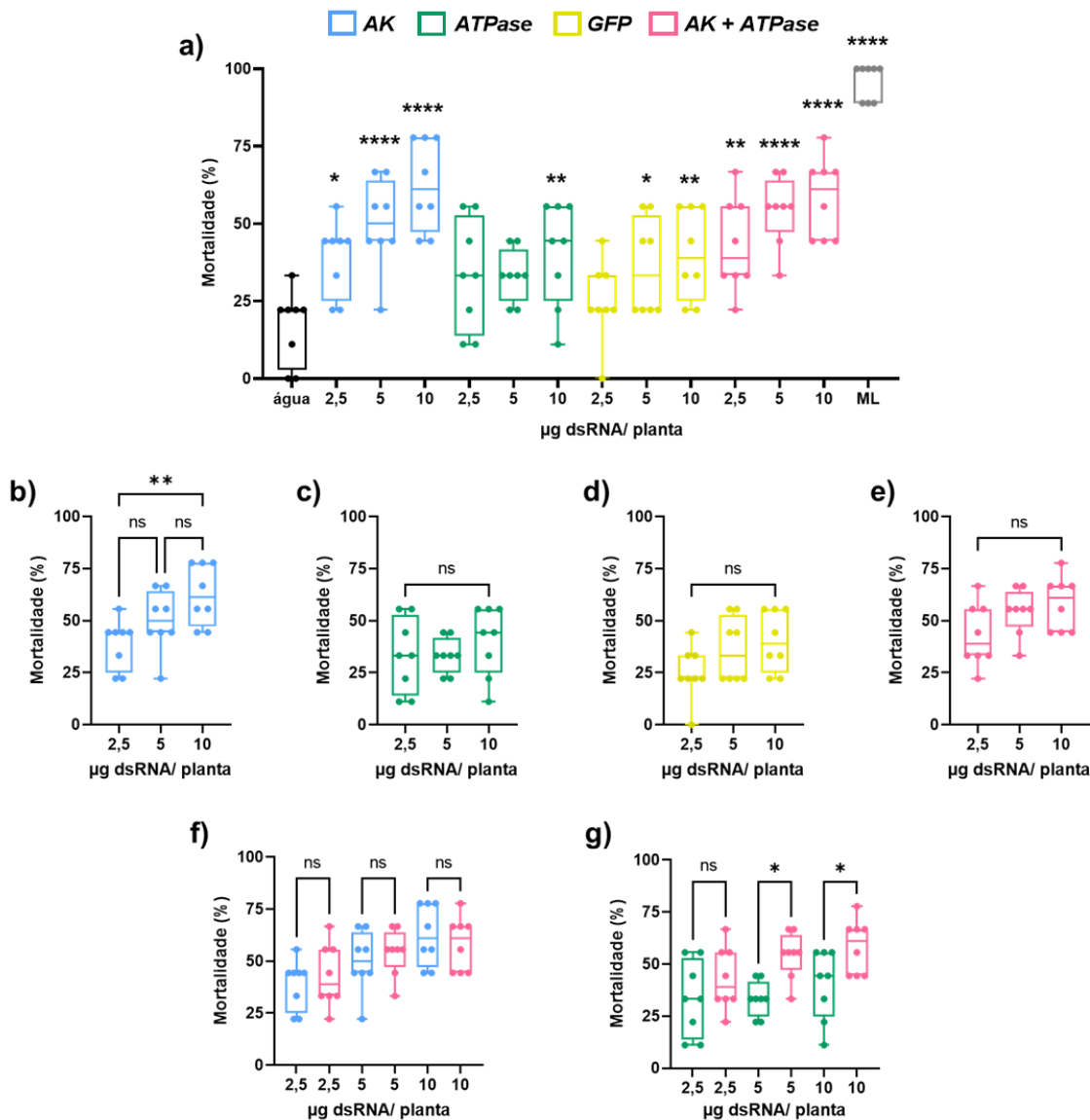


Figura 12. Mortalidade de larvas de *T. absoluta* após 10 dias de exposição a plantas de tomateiro MT pulverizadas com dsRNA sintético (*dsAK*, *dsATPase* ou *dsGFP*) ou Malation 1000 EC®. **(a)** comparação entre tratamentos e grupo-controle (água), comparação entre doses nos tratamentos com **(b)** *dsAK*, **(c)** *dsATPase*, **(d)** *dsGFP* ou **(e)** *dsAK* + *dsATPase* (1:1), e comparação entre a entrega de *dsAK* e *dsATPase* simultaneamente e **(f)** *dsAK* ou **(g)** *dsATPase* ($n = 8$; análise estatística por ANOVA e teste de comparações múltiplas por Dunnet; ns = não significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$).

Após avaliarmos o dano foliar causado pelas larvas de *T. absoluta* em tomateiro MT pulverizado com dsRNA, constatamos que apenas o tratamento com *dsAK* na maior dose (10 µg dsRNA/planta) resultou em redução do dano foliar em comparação com o grupo-controle (água) (Figura 13 a). Por outro lado, a utilização do dsRNA sintético *dsAK* nas doses de 2,5 até 10 não apresentou diferença estatisticamente significativa entre si (Figura 13 b). A média do dano foliar nos tratamentos com

dsAK na maior dose foi de cerca de 0,7 cm², enquanto que no grupo-controle foi de 1,05 cm², resultando em redução de aproximadamente 35% no dano foliar no tomateiro MT.

Em relação ao uso do ds*ATPase*, não houve redução significativa do dano foliar nas plantas (Figura 13 a), embora tenha sido observada diferença estatística entre a maior dose e as duas menores (Figura 13 c). Adicionalmente, a aplicação de ds*GFP* nas plantas não causou redução no dano foliar médio, em comparação com o grupo-controle, não sendo observada diferença estatística entre as doses testadas (Figura 13 d).

Além disso, os tratamentos com dsAK e ds*ATPase* também não resultaram em redução significativa do dano foliar em MT (Figura 13 a, 13 e), além de não apresentarem diferença estatística com os tratamentos com um só tipo de dsRNA (Figura 13 f, 13 g) indicando que a silenciamento simultânea dos dois genes-alvo testados pode não ser uma estratégia adequada contra a traça-do-tomateiro.

É possível que a discrepância entre a alta mortalidade larval e a baixa redução no dano foliar observada nos tratamentos com dsRNA sintético esteja atribuída ao tempo necessário para que ocorra o processo de silenciamento gênico nas larvas de *T. absoluta*. O silenciamento dos genes-alvo dsAK ou ds*ATPase* pode não ter interrompido imediatamente a alimentação das larvas, permitindo que elas continuassem a consumir e causar danos nas plantas, indicando ausência do efeito paralisante fulminante. Este efeito é comumente observado em inseticidas químicos, especialmente, aqueles cujo modo de ação atua no sistema nervoso central dos insetos (WICKHAM et al., 1974). A ausência desse efeito é também observada pela ação de microrganismos entomopatogênicos, o que representa uma importante limitação no controle biológico de pragas (NASCIMENTO et al., 2022).

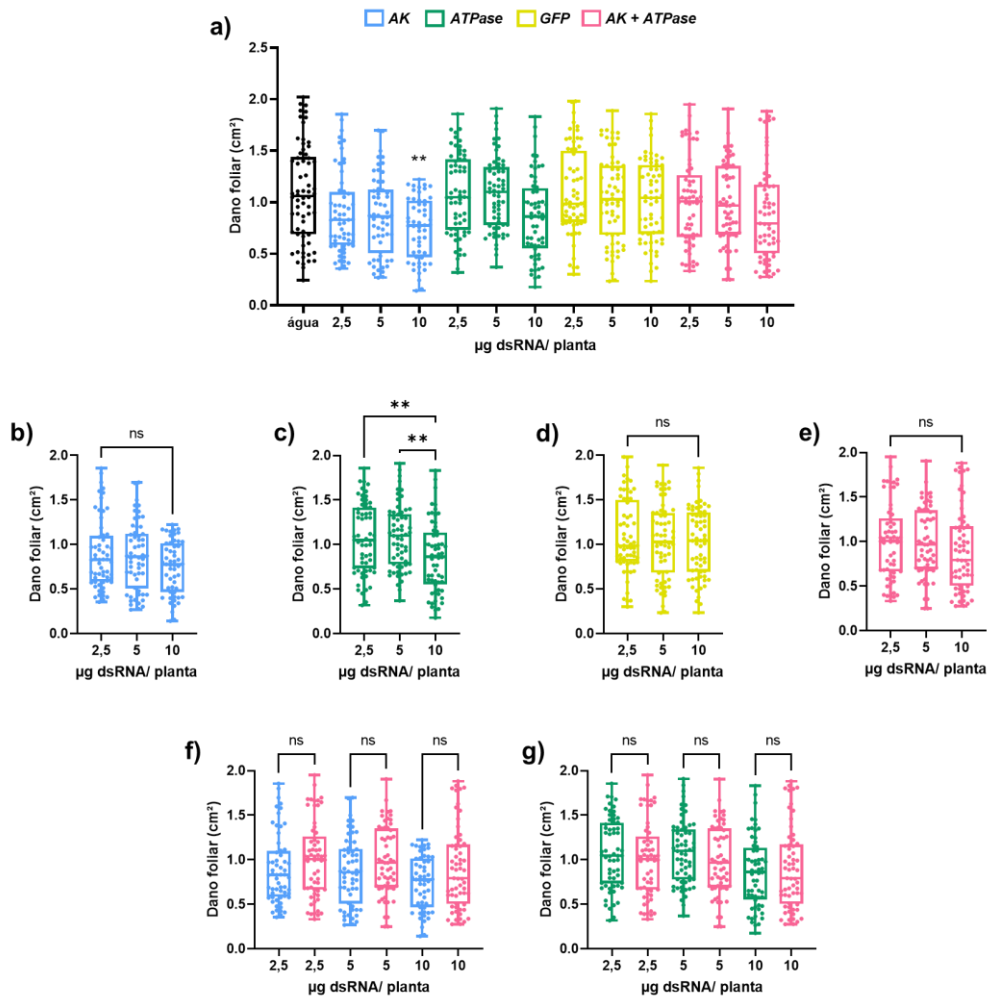


Figura 13. Dano foliar em tomateiro MT pulverizadas com dsRNA sintético (*dsAK*, *dsATPase* ou *dsGFP*) ou Malation 1000 EC®. **(a)** comparação entre tratamentos e grupo-controle (água), comparação entre doses nos tratamentos com **(b)** *dsAK*, **(c)** *dsATPase*, **(d)** *dsGFP* ou **(e)** *dsAK* + *dsATPase* (1:1), e comparação entre a entrega de *dsAK* e *dsATPase* simultaneamente e **(f)** *dsAK* ou **(g)** *dsATPase* ($n = 55-62$; análise estatística por Kruskal-Wallis e teste de comparações múltiplas por Dunn; ns = não significativo; $** < p = 0,1$).

Foi verificado por meio de fitas de papel indicador que o pH das soluções contendo dsRNA sintético com adjuvante variou entre 5 e 5,5. Esse pH ácido é benéfico para manter a estabilidade do dsRNA antes da aplicação, já que o pH ótimo para estabilidade de ácidos nucleicos está entre 4,5 e 5,5 (OIVANEN et al., 1998). A superfície foliar apresenta um pH ligeiramente ácido (OERTLI et al., 1977). Quando o pH da solução é próximo ao pH da superfície foliar, a cutícula foliar se torna mais permeável (REED; TUKEY, 1978), o que pode ter facilitado a penetração do dsRNA sintético e, conseqüentemente, aumentado a eficácia no controle de *T. absoluta*.

A manutenção das plantas em um ambiente úmido antes da aplicação do dsRNA sintético por pulverização foliar também pode ter contribuído para ampliar o potencial de controle contra a traça-do-tomateiro. Isso porque a umidade estimula a abertura estomática, o que poderia favorecer a penetração do dsRNA sintético nas folhas, visto que os estômatos são considerados a principal via de entrada de dsRNA nas folhas (HOANG et al., 2022). Wang et al. (2023) relataram que a pulverização foliar de dsRNA sintético com equipamento de alta pressão possibilitou um maior controle da traça-do-tomateiro que a imersão foliar, possivelmente por facilitar a penetração do dsRNA na folha.

Para além da mortalidade larval e do dano foliar, foi avaliada a capacidade de redução do acúmulo dos transcritos dos genes-alvo em larvas de *T. absoluta* pela entrega de dsRNA sintético, utilizando a técnica de RT-qPCR. O objetivo foi confirmar que as alterações fenotípicas observadas nas larvas foram causadas pelo silenciamento dos genes-alvo.

As análises de expressão relativa de *AK* ou *ATPase* em larvas alimentadas com *dsAK* ou *dsATPase* na dose de 10 µg de dsRNA sintético, respectivamente, mostraram redução significativa no nível de transcritos dos genes-alvos no quarto dia, em comparação ao grupo-controle e ao tratamento com *dsGFP* (Figura 14 a, 14 c). Porém, no oitavo dia, a expressão relativa do gene *AK* em larvas tratadas com dsRNA sintético homólogo ao gene-alvo *AK* foi equivalente à expressão em larvas alimentadas com *dsGFP* (Figura 14 b), enquanto que o nível de expressão de *ATPase* foi até mesmo superior em larvas tratadas com *dsATPase* que larvas do grupo-controle (Figura 14 d). A análise dos resultados de expressão gênica sugeriu que o silenciamento gênico por meio da entrega de dsRNA sintético é eficiente em reduzir a expressão dos genes *AK* ou *ATPase* em larvas de *T. absoluta* aos 4 d após o tratamento. No entanto, a recuperação da expressão gênica ao longo do tempo indicaria a necessidade de aplicações repetidas para manter o efeito do silenciamento, possivelmente devido à ausência de RPdR funcionais em insetos ou menor distribuição sistêmica (CAMARGO et al., 2015; MONDAL et al., 2021).

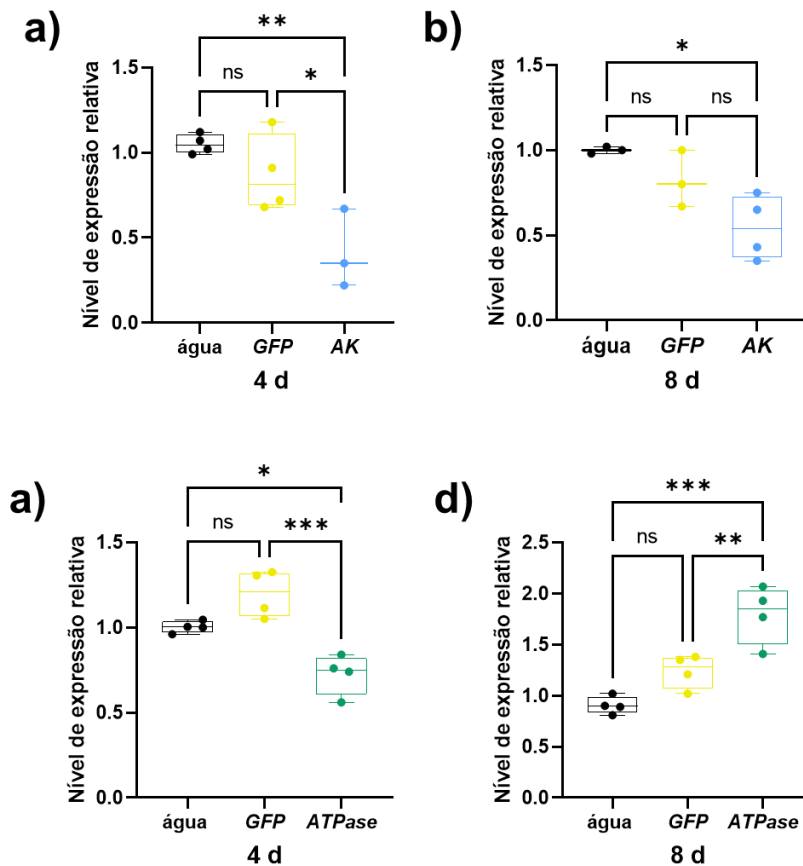


Figura 14. Nível de expressão relativa dos genes *AK* ou *ATPase* em larvas de *T. absoluta* alimentadas com tomateiro Micro-Tom pulverizado 10 μ g dsRNA sintético homólogos ao gene *AK* (a) no dia 4 ou (b) no dia 8 após o tratamento; ou ao gene *ATPase* (c) no dia 4 ou (d) 8 após o tratamento ($n = 3-4$; análise estatística por ANOVA e teste de comparações múltiplas por Dunnet; * $< p = 0,5$; ** $< p = 0,1$; *** $< p = 0,05$; ns = não significativo)

Os genes *ATPase* e *AK* estão diretamente envolvidos no metabolismo energético celular (LU et al., 2023). Estudos anteriores demonstraram que o silenciamento desses genes resultou em adversidades em coleópteros, lepidópteros, dípteros e hemípteros, sugerindo potencial como alvos para silenciamento gênico por RNAi para controlar pragas (BENTO et al., 2020; CAMARGO et al., 2016; KHAN et al., 2023; LIU et al., 2015; MENG et al., 2020).

O gene *AK* é responsável pela codificação de uma fosfotransferase que desempenha um papel crítico no metabolismo energético celular de invertebrados (NEWSHOLME et al., 1978). Além disso, o gene *AK* não é encontrado em vertebrados, o que pode torná-lo um gene-alvo mais específico e seguro com menor risco (LIU et al., 2015).

O gene *ATPase* está associado à regulação do pH intracelular e transporte de prótons através das membranas celulares (NELSON et al., 2000). Contudo, é importante notar que a proteína *ATPase* é formada por diferentes subunidades (KHAN et al., 2023). Um estudo demonstrou que o silenciamento gênico de diversas subunidades de *ATPase* causou mortalidade variável em *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) (KHAN et al., 2023).

Anteriormente, nosso grupo desenvolveu plantas de tomateiro MT ou bactérias *E. coli* HT115(DE3) transgênicas expressando dsRNA homólogo ao gene *ATPase sub. A* ou *AK* de *T. absoluta* que foram capazes de reduzir significativamente o nível de expressão dos gene-alvos, bem como causar a morte das larvas da traça-do-tomateiro, atingindo níveis de controle efetivos (BENTO et al., 2020; CAMARGO et al., 2016).

No presente trabalho, nossos resultados indicaram que a pulverização em tomateiro MT com dsRNA sintético homólogo aos genes *ATPase* ou, principalmente, *AK* apresentou eficácia contra *T. absoluta*, promovendo o silenciamento gênico, mortalidade larval e redução do dano foliar em tomateiro MT. No entanto, em um cenário mais real, os biopesticidas à base de ds*AK* ou ds*ATPase* podem não ser economicamente viável no controle de *T. absoluta*. A dose de dsRNA necessária para o controle das larvas em cultivos comerciais de tomateiro seria significativamente maior do que a dose utilizada no experimento em laboratório com plantas de tomateiro MT. As plantas comerciais de tomateiro são maiores (>1 m de altura) do que o tomateiro Micro-Tom (~15 cm de altura), o que demandaria uma quantidade maior de dsRNA para cobrir toda a área das plantas e, portanto, aumentaria o custo do tratamento (CAMPOS et al., 2010).

Além disso, as condições ambientais de campo, como a exposição à radiação UV, chuva, vento e altas temperaturas, podem acelerar a degradação do dsRNA sintético (HOANG et al., 2022; KUNTE et al., 2020). Certamente seria necessário aplicar doses ainda maiores de dsRNA para garantir que a eficácia contra a traça-do-tomateiro em campo fosse próxima a dos ensaios em laboratório, o que também encareceria o custo do tratamento. Em termos de custo e escala de produção, considera-se economicamente viável a aplicação de 2 a 10 g de dsRNA sintético por hectare (ZOTTI et al., 2018). Por outro lado, investigações sobre o potencial de dsRNA associado a nanocarreadores para controlar *T. absoluta* podem ser uma alternativa economicamente encorajadora, uma vez que estudos têm mostrado que o uso de

nanocarreadores pode aumentar a eficácia do dsRNA sintético, além de reduzir a quantidade necessária para obter o mesmo efeito, o que poderia tornar a aplicação viável em larga escala (CHRISTIAENS et al., 2018; WANG et al., 2023).

Por outro lado, o uso de dsRNA sintético poderia ser combinado com outras formas de controle de pragas, como por agentes biológicos (DI LELIO et al., 2022; SARMAH et al., 2021). Essa abordagem não apenas pode reduzir a quantidade de dsRNA aplicado, mas também pode ampliar a eficácia do controle e prevenir a seleção de indivíduos resistentes ao silenciamento gênico por RNAi, o que poderia comprometer a eficácia dos biopesticidas à base de dsRNA em longo prazo (KHAJURIA et al., 2018; MISHRA et al., 2021).

3.3.2 Microscopia confocal de escaneamento a laser

3.3.2.1 Pulverização em plantas

A redução dos custos e o incremento de novos processos de produção industrial de dsRNA geram perspectivas positivas para o uso do dsRNA sintético em larga escala e a um custo competitivo (RODRIGUES et al., 2021 a, 2021 b). Diante da proximidade dos biopesticidas à base de dsRNA sintético estarem disponíveis no mercado, pesquisas têm sido realizadas para identificar formas viáveis de utilização do produto em campo (CAGLIARI et al., 2019).

A aplicação do dsRNA sintético por meio da pulverização foliar pode se tornar agronomicamente viável (SPADOTTO et al., 2010; KUNTE et al., 2020). Em ensaios em campo, a pulverização foliar de Ledprona[®], biopesticida à base de dsRNA sintético desenvolvido pela *GreenLight Bioscience*, apresentou desempenho satisfatório no controle de *L. decemlineata* em plantas de batata, sendo comparável a um inseticida comercial (RODRIGUES et al., 2021 a, 2021 b; PALLIS et al., 2022).

A aplicação foliar de dsRNA sintético também seria compatível com as novas tecnologias para aplicação de (bio)pesticidas no campo, como os veículos aéreos não-tripulados (drones), que prometem maior eficiência, menor desperdício e cobertura mais ampla devido à facilidade em alcançar áreas de difícil acesso (MOGILI; DEEPAK, 2018). No entanto, a aplicação foliar de dsRNA sintético pode apresentar limitações consideráveis devido à difícil molhabilidade das folhas, causada pela hidrofobicidade da cutícula foliar e das ceras, bem como a presença de tricomas (HOANG et al., 2022). Além disso, o dsRNA sintético aplicado sobre a superfície de plantas estaria exposto a degradação por radiação UV e por microrganismos (HOANG et al., 2022;

KUNTE et al., 2020). Fora isso, o dsRNA sintético poderia ser lavado da superfície das plantas pela chuva (KUNTE et al., 2020), embora tenha sido relatado que o dsRNA sintético, após seco, não seria facilmente removido das folhas pela ação da chuva (SAN MIGUEL; SCOTT, 2015).

Foram descritas evidências da capacidade de penetração de dsRNA (ou siRNA) sintético em folhas de *A. thaliana* (KISELEV et al., 2021), *N. benthamiana* (BENNETT et al., 2020; DALAKOURAS et al., 2016) e algodão (JAIN et al., 2022). Entretanto, os mecanismos de penetração foliar do dsRNA sintético ainda são pouco conhecidos. Supõe-se que o dsRNA possa ser mais facilmente absorvido por meio das aberturas dos estômatos, enquanto que a penetração pela cutícula seria limitada (HOANG et al., 2022). A cutícula foliar é formada por poros com até 1 nm de diâmetro que permitem a difusão de água para o interior da folha (RUNDEL, 1982). Moléculas de dsRNA de 300 pares de base (pb) necessitariam de aberturas com mais de 3 nm de diâmetro para passagem (HOANG et al., 2022). Dessa forma, é mais provável que o dsRNA penetre a folha pelas aberturas estomáticas do que pela cutícula foliar (HOANG et al., 2022). Por outro lado, algumas estratégias podem ser utilizadas para facilitar a penetração foliar do dsRNA sintético, como a adição de surfactantes, pulverização foliar com equipamentos de alta pressão ou associação do dsRNA com nanocarreadores (HOANG et al., 2022; JAIN et al., 2022).

Após a entrada na folha, o dsRNA pode seguir diferentes rotas dependendo do seu processamento em siRNA (HOANG et al., 2022). Caso seja absorvido pelas células do parênquima, o dsRNA poderia ser processado em siRNAs pela enzima Dicer, sendo utilizados para síntese de siRNAs secundários pela RPD (DEVERS et al., 2020; XIE et al., 2001). Logo em seguida, o siRNA poderia ser difundido via simplasto a outras células até atingir o floema, sendo, então, transportado para outras partes da planta (DEVERS et al., 2020). Em contrapartida, o dsRNA não processado em siRNA, de tamanho de 300 pb ou cerca de 200 kDa, tende a ser difundido via apoplasto, já que a abertura dos plasmodesmos é limitada às moléculas de 40 a 50 kDa (HOANG et al., 2022; ROBERTS.; OPARKA, 2003). O transporte de dsRNA pelo floema ainda é incerto; contudo, há evidências de que o dsRNA pôde se acumular no floema de plantas de cevada (*Hordeum vulgare*) e causar o silenciamento gênico em um fungo inoculado em folhas distantes do local de aplicação do dsRNA, sugerindo a movimentação do dsRNA pelo floema (KOCH et al., 2016).

Nesta perspectiva, buscamos confirmar a penetração do dsRNA sintético por meio da pulverização foliar em tomateiro MT. As imagens obtidas por meio de microscopia confocal de escaneamento a laser das folhas de plantas de tomateiro MT pulverizadas com dsRNA sintético marcado com sonda fluorescente (Cy3) revelaram a presença do dsRNA-Cy3 no interior foliar (Figura 15 a.4), sugerindo que o dsRNA sintético tem capacidade de penetrar as folhas do tomateiro MT.

Além da penetração foliar, procuramos confirmar a capacidade de ingestão do dsRNA sintético pulverizado em tomateiro MT pelas larvas de *T. absoluta*. As imagens de microscopia confocal das larvas após 24 h de alimentação com plantas tratadas com dsRNA-Cy3 indicam que o dsRNA foi eficazmente ingerido pelas larvas em diferentes estágios de desenvolvimento (Figura 15 b.4-6 e 15 c.1-3).

Outros estudos também confirmaram por microscopia confocal a ingestão de dsRNA sintético por insetos, sendo o dsRNA entregue via absorção peciolar (PAMPOLINI et al., 2020), por aplicação na superfície foliar (JAIN et al., 2022) ou raízes (LI et al., 2015) ou pela adição em dieta artificial (GURUSAMY et al., 2020; ZHANG et al., 2013). Anteriormente, Camargo et al. (2016) demonstrou que dsRNA sintetizado *in vitro* com ribonucleotídeos marcado com Cy3 (MEGAclear™ RNAi Kit) (Ambion, Carlsbad, CA, EUA) foi capaz de ser absorvido pelo pecíolo de folhas de tomateiro a partir de uma solução e ser ingerido por larvas de *T. absoluta*. Nossos resultados representam um progresso ao sugerirem que pulverização foliar pode ser um método viável para aplicação de dsRNA sintético em tomateiros para controlar *T. absoluta*.

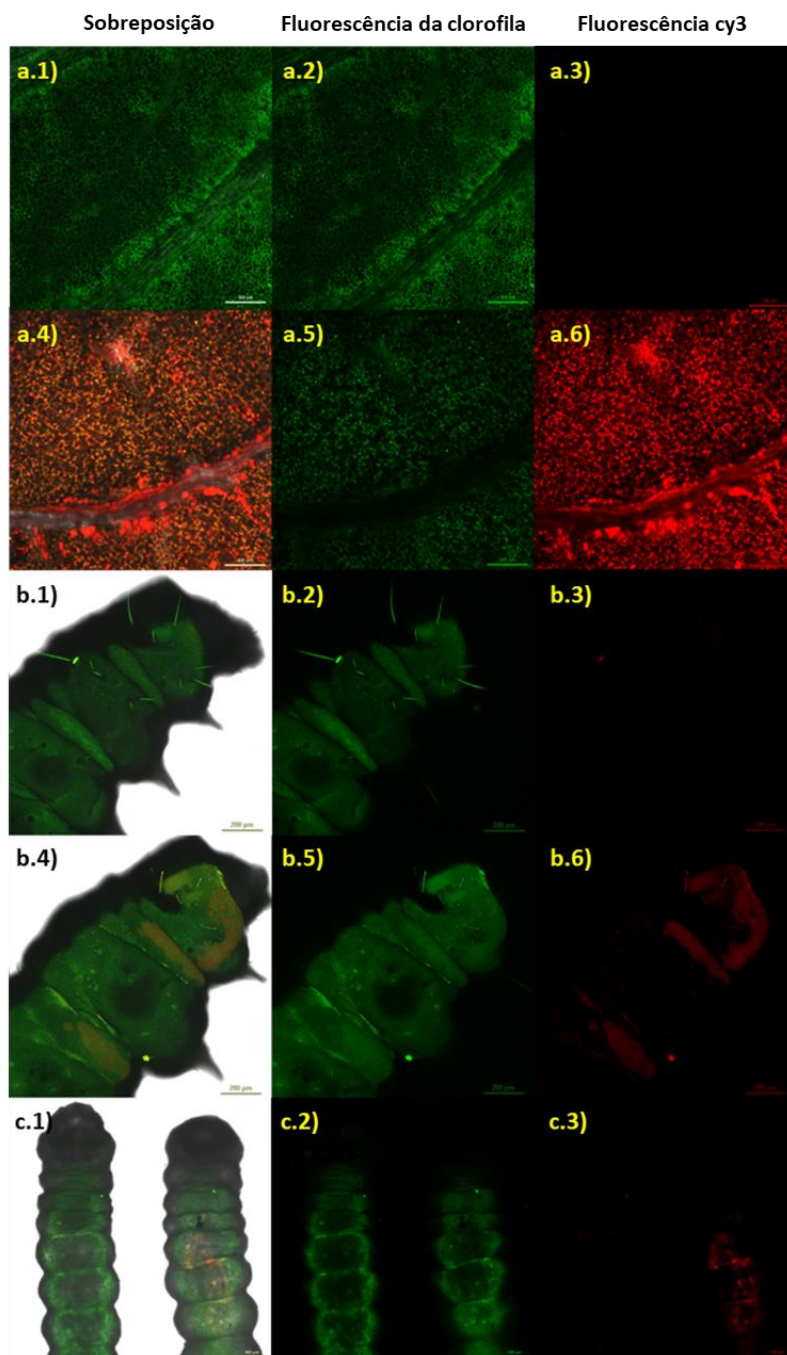


Figura 15. Pulverização de dsRNA-Cy3 em tomateiro MT e alimentação de larvas de *T. absoluta* por 24 h por microscopia confocal. Tratamento com 2,5 µg de dsRNA sintético não-marcado no (a.1-3) interior da folha e (b.1-3) larvas em 3-4° instar; tratamento com 2,5 µg de dsRNA-Cy3 no (a.4-6) interior da folha e (b.4-6) larvas em 3-4° instar; (c.1-3) larvas em 1-2° instar alimentadas com dsRNA sintético (esquerda) ou dsRNA-Cy3 (direita). Aumento de 100x, escala 200 µm.

3.3.2.2 Absorção radicular

As evidências indicam que a pulverização foliar pode ser uma opção viável para aplicação de dsRNA sintético para o controle de pragas (RODRIGUES et al., 2021 a, 2021 b; PALLIS et al., 2022). Entretanto, o dsRNA aplicado superficialmente sobre as

plantas pode sofrer degradação por radiação UV ou pela ação de microrganismos, possuir baixa adesão sobre as folhas devido à hidrofobicidade da cutícula foliar, ceras ou presença de tricomas, além de ser removido por ação da chuva, o que reduziria a eficácia dos biopesticidas à base de dsRNA sintético. (HOANG et al., 2022; KUNTE et al., 2020). Além disso, a pulverização foliar poderia não ser eficiente para controlar insetos que se alimentam de raízes ou caules, uma vez que o dsRNA sintético aplicado na folha poderia não estar disponível para ingestão pelas pragas nas outras partes da planta (HOANG et al., 2022).

Uma alternativa à aplicação foliar é a aplicação radicular, na qual o dsRNA é absorvido pelas raízes das plantas (BRAGG; RIESKE, 2022a, 2022 b). As primeiras evidências de absorção e translocação de dsRNA via radicular foram observadas em plantas de *A. thaliana* e arroz (*Oryza sativa*) por meio da imersão das raízes em solução de dsRNA sintético (LI et al., 2015). A entrega via radicular de dsRNA homólogo a genes de *A. thaliana* ou arroz promoveu o silenciamento de genes expressos nas plantas, o que sugere que o dsRNA foi capaz de penetrar as raízes (LI et al., 2015). A utilização de dsRNA marcado com sonda fluorescente revelou a capacidade de absorção do dsRNA pelas raízes de arroz (LI et al., 2015). Paralelamente, a absorção radicular de dsRNA sintético homólogo a um gene essencial de *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) em arroz ou de dsRNA sintético homólogo a um gene essencial de *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Pyralidae) em milho provocou a mortalidade dos insetos (LI et al., 2015). Quando utilizado dsRNA marcado com fluorescência nas plantas também foi possível rastrear o dsRNA no interior dos insetos, indicando que a entrega de dsRNA via radicular seria uma opção possível para o controle de pragas (LI et al., 2015). Recentemente, estudos confirmaram a capacidade de absorção radicular e translocação de dsRNA sintético em plantas lenhosas (BRAGG; RIESKE, 2022 a, 2022 b). No entanto, os mecanismos exatos associados à penetração do dsRNA em raízes ainda não foram elucidados.

A entrega de dsRNA sintético via radicular poderia ser uma opção mais adequada para cultivo em sistemas hidropônicos, visto que a aplicação diretamente no solo tem se mostrado inviável devido à baixa persistência do dsRNA, que pode ser facilmente degradado por microrganismos presentes no solo (DUBELMAN et al., 2014). Entretanto, adaptações poderiam ser feitas, como a associação a nanocarreadores que poderiam proteger o dsRNA da

degradação microbiana, bem como promover a penetração nas raízes (SCHWAB et al., 2016; WHITFIELD et al., 2018).

Como alternativa a aplicação foliar, a absorção radicular de solução de dsRNA sintético por plantas de tomateiro foi capaz de ocasionar a morte de 80% das larvas de *T. absoluta* (MAJIDIANI et al., 2019). Por sua vez, a habilidade de translocação de dsRNA sintético em plantas de tomateiro MT foi confirmada via extração do RNA total das folhas e amplificação por PCR convencional (SOUZA¹, 2022). No entanto, não há informações claras sobre o tempo necessário para translocação do dsRNA para as folhas e quais as formas de distribuição na planta de tomateiro. Nesse contexto, conduzimos um ensaio onde as raízes de plantas de tomateiro de duas semanas foram imersas em solução de dsRNA-Cy3 por 2 ou 4 d para investigar a absorção radicular e translocação do dsRNA sintético por meio de imagens de microscopia confocal de escaneamento a laser.

Após 2 d de exposição ao dsRNA-Cy3, as imagens de microscopia confocal indicaram uma efetiva absorção radicular do dsRNA (Figura 16 b.1-3). A maior intensidade de fluorescência ao redor das células sugere que o transporte inicial nas células das raízes possa ocorrer via apoplasto (Figura 16 b.4-6). Além disso, foi detectada a fluorescência de dsRNA-Cy3 no caule na região do feixe vascular, indicando que a planta teria capacidade de translocar o dsRNA pelo xilema (Figura 17 b.1-3). Ambas as plantas tratadas ou não tratadas com dsRNA-Cy3 apresentam fluorescência nas camadas mais externas do caule, possivelmente em razão da autofluorescência da antocianina. Por outro lado, não foi observada fluorescência do dsRNA-Cy3 nas folhas (Figura 18 b.1-3).

As imagens das plantas tratadas com dsRNA-Cy3 por 4 d indicaram uma possível distribuição de dsRNA-Cy3 no interior das células das raízes (Figura 19 b.4-6). O processamento do dsRNA em siRNA permitiria o transporte entre células via simplasto (DEVERS et al., 2020), contudo não há informações disponíveis sobre a estabilidade do dsRNA-Cy3 após o processamento em siRNA pela enzima Dicer. Por fim, foi possível detectar a fluorescência do dsRNA-Cy3 nos elementos xilemáticos do caule (Figura 20 b.1-3), bem como nas folhas, embora que, aparentemente, não estivessem uniformemente distribuídas no mesófilo (Figura 21 b.1-3). A distribuição desuniforme, isto é, em formato de pontos, pode indicar o

¹ Souza, L. Comunicação pessoal, 2022.

acúmulo do dsRNA (ou siRNA) levando ao seu acúmulo em estruturas celulares específicas.

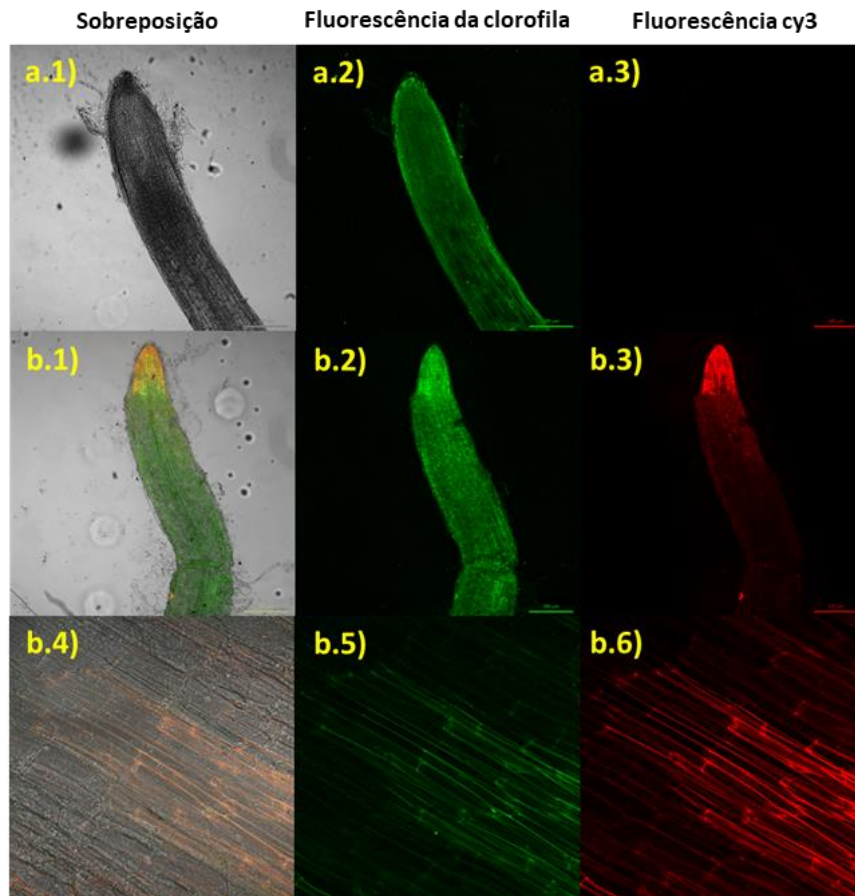


Figura 16. Microscopia confocal de raízes de tomateiro MT tratadas com dsRNA via absorção radicular por 2 d. (a.1-3) tratamento com dsRNA ou (b.1-6) dsRNA-Cy3. (a/b.1-3) aumento de 100x, escala 200 μm , (a.4-6) aumento de 400 x, escala 50 μm

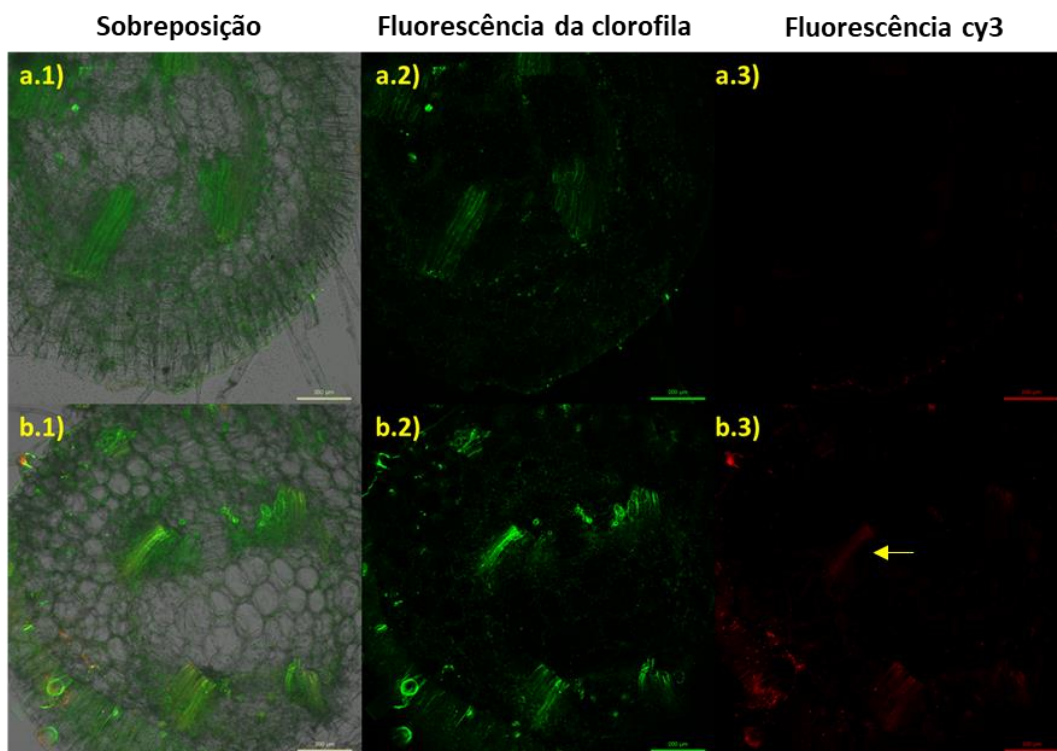


Figura 17. Microscopia confocal de secções do caule de plantas de tomateiro MT expostas ao (a.1-3) dsRNA ou (b.1-3) dsRNA-cy4 via absorção radicular por 2 d. Seta amarela aponta fluorescência de Cy3 no feixe vascular do tomateiro MT. Aumento de 100x, escala 200 μ m

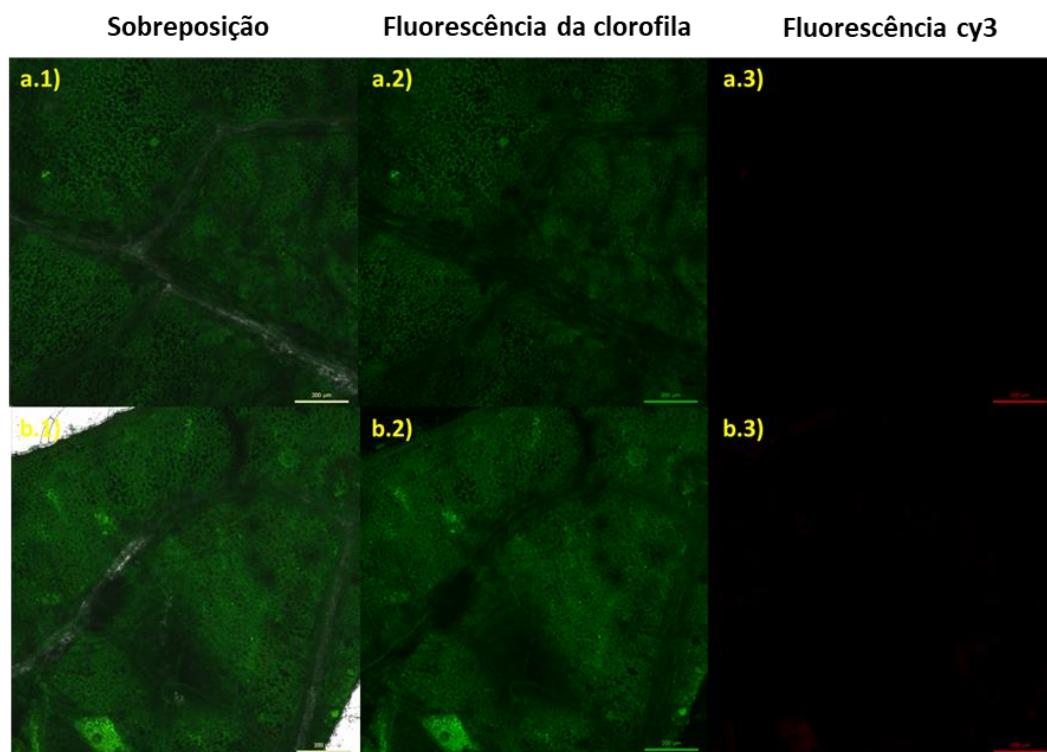


Figura 18. Folhas de tomateiro MT exposto ao dsRNA sintético via absorção radicular por 2 d por microscopia confocal. Tratamento com (a.1-3) dsRNA ou (b.1-3) dsRNA-Cy3. Aumento de 100x, escala 200 μ m

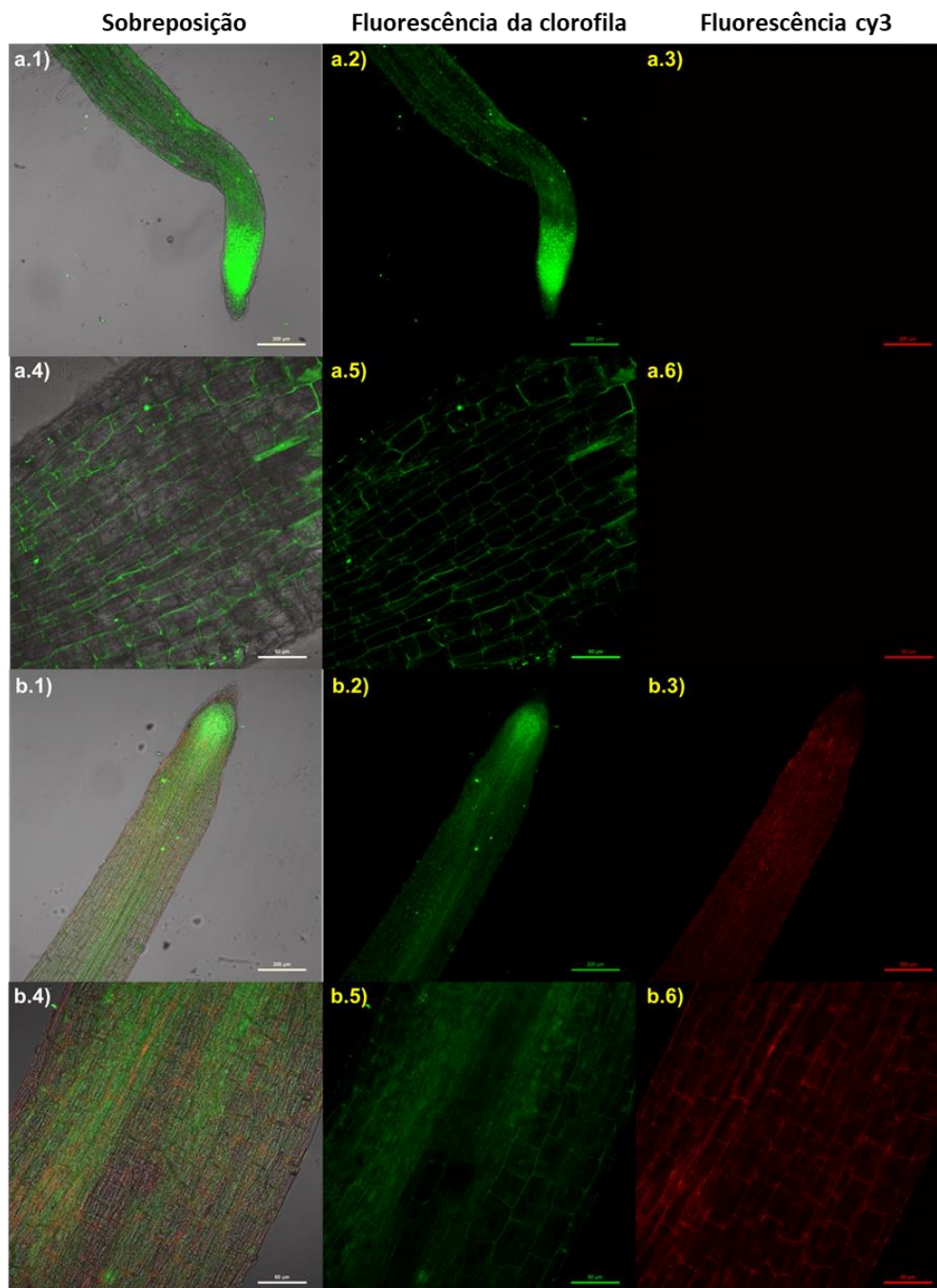


Figura 19. Exposição de raízes de tomateiro MT em solução de dsRNA sintético por 4 d. Tratamento com (a.1-6) dsRNA ou (b.1-6) dsRNA-Cy3. (a/b.1-3) aumento de 100x, escala 200 µm (a/b.4-6) aumento de 400x, escala 50 µm

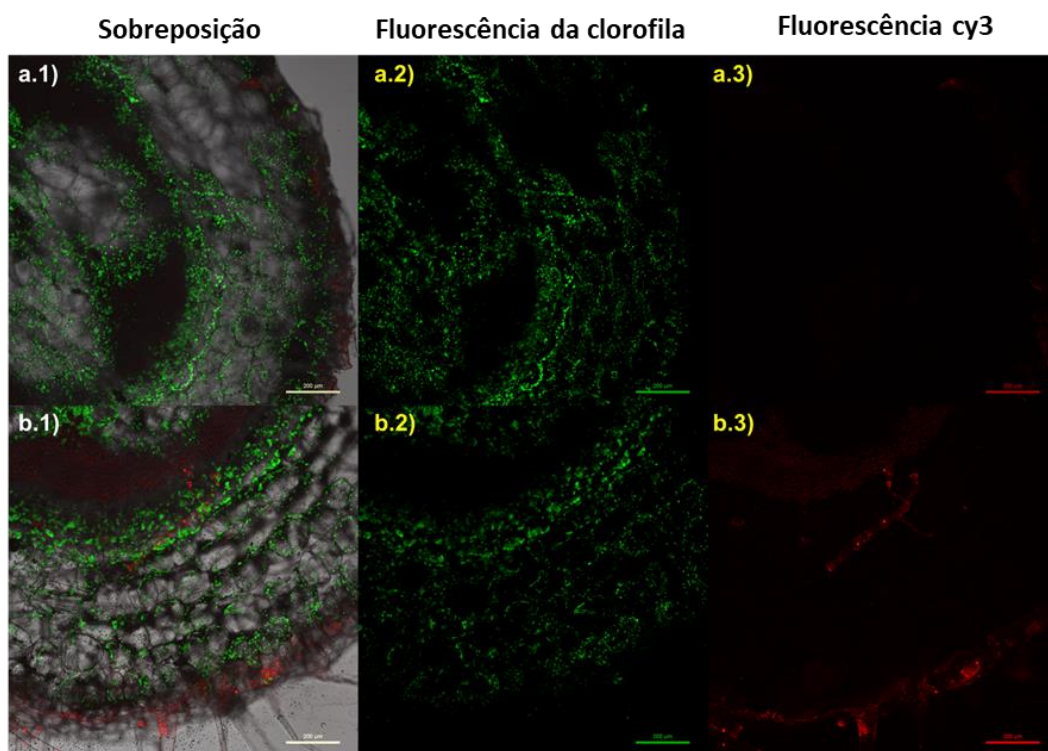


Figura 20. Secção transversal de caules de plantas de tomateiro MT tratadas com dsRNA sintético via radicular por 4 d. Exposição ao (a.1-3) dsRNA sintético ou (b.1-3) dsRNA-Cy3. Aumento de 100x, escala 200 µm

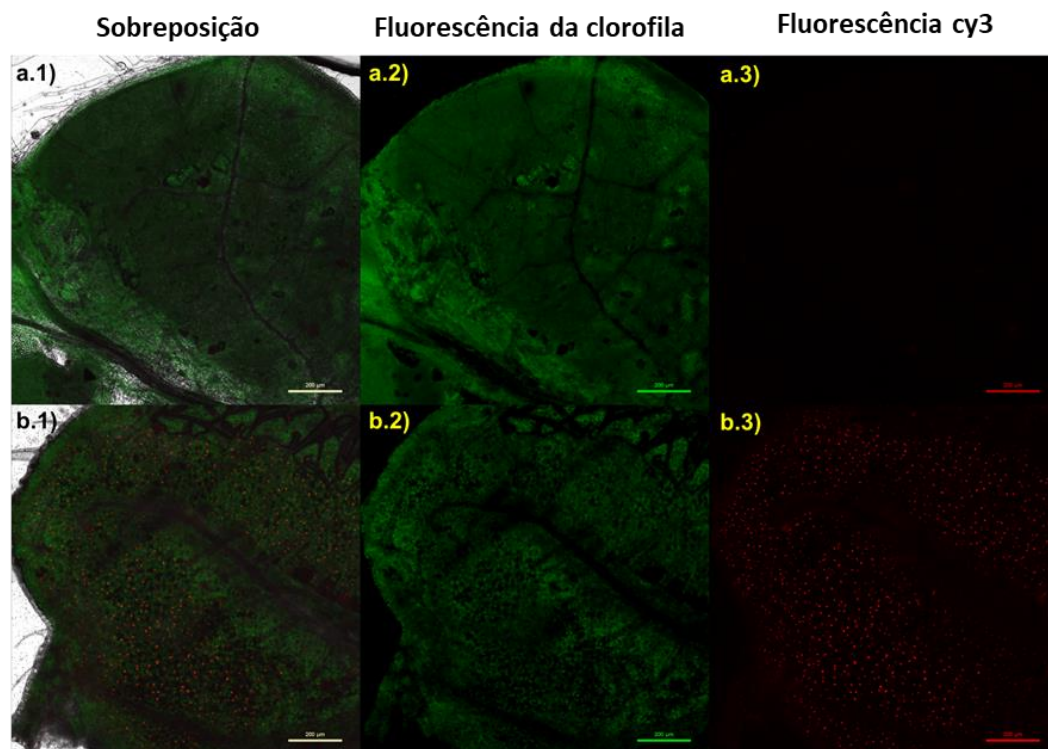


Figura 21. Suposta translocação de dsRNA em folhas de plantas de tomateiro MT via absorção radicular. Tratamento com (a.1-3) dsRNA sintético ou (b.1-3) dsRNA-Cy3. Aumento de 100x, escala 200 µm.

3.4 Conclusão

Os resultados indicaram que tanto a imersão de folhas quanto a pulverização de plantas com dsRNA sintético resultaram em aumento da mortalidade larval e redução do dano foliar em tomateiro. Entretanto, a pulverização em plantas, por ser um método de aplicação foliar mais próximo da realidade no campo, pode ser considerada uma forma mais adequada para estudos de eficiência agrônômica de biopesticidas à base em dsRNA sintético para o controle da traça-do-tomateiro.

O dsRNA homólogo ao gene-alvo *AK* apresentou o melhor desempenho, contudo evidências indicam a ausência de efeito sinérgico na mortalidade das larvas ao se aplicar dsRNA sintético homólogos ao *AK* e *ATPase* ao mesmo tempo. Além disso, foi observado o efeito de dose-dependente na mortalidade larval e dano foliar em tomateiro da aplicação de *dsAK*, embora não tenha sido evidenciado para *dsATPase*. Fora isso, a pulverização do dsRNA sintético para o gene-controle *GFP* resultou em mortalidade significativamente maior do que o grupo-controle (água), indicando a necessidade de mais investigações sobre os efeitos secundários do RNAi.

A pulverização foliar de dsRNA sintético homólogos aos genes *AK* ou *ATPase* em tomateiro MT foi capaz de induzir ao silenciamento gênico em larvas de *T. absoluta* após 4 d de alimentação, mas foi observada a recuperação da expressão gênica aos níveis normais após 8 d, o que confirma a necessidade da entrega constante de dsRNA sintético às larvas para manter o efeito do silenciamento gênico.

As imagens de microscopia confocal de escaneamento a laser confirmaram a habilidade de penetração foliar em tomateiro MT e ingestão larval de dsRNA sintético, atestando a viabilidade da pulverização foliar de dsRNA sintético para controle de uma praga agrícola minadora de folhas.

Por fim, as imagens de microscopia confocal também demonstraram que o tomateiro MT é capaz de absorver o dsRNA sintético pelas raízes, possivelmente via apoplasto, além de translocar para as folhas, o que poderia ser uma alternativa para entrega de dsRNA sintético a *T. absoluta*.

Referências

ABRIEUX, A.; CHIU, J. Oral delivery of dsRNA by microbes: Beyond pest control. **Communicative & Integrative Biology**, v. 9, n.6, p. e1236163, 2016.

BAUM, J. et al. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 1322–1326, 2007.

BENNETT, M. et al. Barriers to Efficient Foliar Uptake of dsRNA and Molecular Barriers to dsRNA Activity in Plant Cells. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, art. 816, 2020.

BENTO, F. M. et al. Gene silencing by RNAi via oral delivery of dsRNA by bacteria in the South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*. **Pest Management Science**, v. 76, n. 1, p. 287–295, 2020.

BRAGG, Z.; RIESKE, L. K. Feasibility of systemically applied dsRNAs for pest-specific RNAi-Induced gene silencing in White Oak. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, art. 830226, 2022a.

BRAGG, Z.; RIESKE, L. K. Spatial distribution and retention in loblolly pine seedlings of exogenous dsRNAs applied through roots. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 16, art. 9167, 2022b.

CAGLIARI, D. et al. Management of pest insects and plant diseases by non-transformative RNAi. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, art. 1319, 2019.

CAMARGO, R. A. et al. RNA interference as a gene silencing tool to control *Tuta absoluta* in tomato (*Solanum lycopersicum*). **PeerJ**, v. 4, p. 2673, 2016.

CAMPOS, M. L. et al. Small and remarkable: the Micro-Tom model system as a tool to discover novel hormonal functions and interactions **Plant Signaling & Behavior**, v. 5, n. 3, p. 267-270, 2010.

CHEN, J. et al. Off-target effects of RNAi correlate with the mismatch rate between dsRNA and non-target mRNA. **RNA Biology**, v. 18, n. 11, p. 1747-1759, 2021.

CHEN, Y. et al. Spray drift and off-target loss reductions with a precision air-assisted sprayer Trans. **ASABE**, v. 56, n. 6, p. 1273-1281, 2013.

CHRISTIAENS, O. et al. Increased RNAi efficacy in *Spodoptera exigua* via the formulation of dsRNA with guanylated polymers. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 316, 2018.

CLEMENS, J.C. et al. Use of double-stranded RNA *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v. 97, p. 6499–6503, 2000.

COOPER, A. M. et al. Molecular mechanisms influencing efficiency of RNA interference in insects. **Pest Management Science**, v. 75, n. 1, p. 18-28, 2019.

DALAKOURAS, A. et al. Induction of Silencing in Plants by High-Pressure Spraying of In vitro-Synthesized Small RNAs. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, art. 1327, 2016.

DEVERS E. A. et al. Movement and differential consumption of short interfering RNA duplexes underlie mobile RNA interference. **Nature Plants**, v. 6, n. 7, p. 789-799, 2020.

DI LELIO, I. et al. Transgenic plants expressing immunosuppressive dsRNA improve entomopathogen efficacy against *Spodoptera littoralis* larvae. **Journal of Pest Science**, n. 95, p. 1413-1428, 2022.

DUBELMAN, S. et al. Environmental fate of double-stranded RNA in agricultural soils. **PLOS One**, v. 9, n. 3, p. e93155, 2014.

GURUSAMY, D. et al. Transport of orally delivered dsRNA in southern green stink bug, *Nezara viridula*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 104, p. 4, 2020.

HASHIRO, S.; YASUEDA, H. RNA Interference-based pesticides and antiviral agents: microbial overproduction systems for double-stranded RNA for applications in agriculture and aquaculture. **Applied Sciences**, v. 12, n. 6, art. 2954, 2022.

HOANG, B. T. L. Et al. RNAi as a foliar spray: efficiency and challenges to field applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 12, art. 6639, 2022.

JAIN, R. G. et al. Foliar application of clay-delivered RNA interference for whitefly control. **Nature Plants**, v. 8, p. 535-548, 2022.

JOGA, M. R. et al. RNAi efficiency, systemic properties, and novel delivery methods for pest insect control: What we know so far. **Frontiers in Physiology**, v. 7, art. 553, 2016.

KAPLANOGLU, E. et al. Plastid transformation of Micro-Tom tomato with a hemipteran double-stranded RNA results in RNA Interference in multiple insect species. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 7, art. 3918, 2022.

KHAJURIA, C. et al. Development and characterization of the first dsRNA-resistant insect population from western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte. **Plos One**, v. 13, n. 5, p. e0197059, 2018

KHAN, F. et al. Greenhouse test of spraying dsRNA to control the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, infesting hot peppers. **BMC Biotechnol.**, v. 23, p. 10, 2023.

KISELEV, K.V. et al. External dsRNA downregulates anthocyanin biosynthesis-related genes and affects anthocyanin accumulation in *Arabidopsis thaliana*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, art. 6749, 2021.

KOCH, A. et al. An RNAi-Based Control of *Fusarium graminearum* infections through spraying of long dsRNAs involves a plant passage and is controlled by the fungal silencing machinery. **PloS Pathogens**, v. 12, n. 10, e1005901, 2016.

KÖHLER, H. R.; TRIEBSKORN, R. Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond? **Science**, v. 341, n. 6147, p. 759-65, 2013.

KUNTE, N., et al. Prospects, challenges and current status of RNAi through insect feeding. **Pest Management Science**, v. 76, p. 26-41, 2020.

LI, H. et al. New insights into an RNAi approach for plant defence against piercing-sucking and stem-borer insect pests. **Plant Cell and Environment**, v. 38, n. 11, p. 2277-2785, 2015.

LIU, F. et al. Silencing the *HaAK* gene by transgenic plant-mediated RNAi impairs larval growth of *Helicoverpa armigera*. **International Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 1, p. 67-74, 2015.

LU, Y. et al. The dsRNA delivery, targeting and application in pest control. **Agronomy**, v. 13, n. 3, p. 714, 2023.

MAJIDIANI, S. et al. RNAi in *Tuta absoluta* management: effects of injection and root delivery of dsRNAs. **Journal of Pest Science**, v. 92, n. 4, p. 1409-1419, 2019.

MAO, Y. B. et al. Silencing a cotton bollworm *P450 monooxygenase* gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 1307-1313, 2007.

MENG, J. et al. Suppressing tawny crazy ant (*Nylanderia fulva*) by RNAi technology. **Insect Science**, v. 27, n. 1, p. 113-121, 2020.

MISHRA, S. et al. Selection for high levels of resistance to double-stranded RNA (dsRNA) in Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) using non-transgenic foliar delivery. **Scientific Reports**, v. 11, art. 6523, 2021.

MOGILI, U.; DEEPAK, B. Review on application of drone systems in precision agriculture. **Procedia Computer Science**, v. 133, p. 502–509, 2018.

MOHAN, C. et al. hRNAi-mediated knock-down of *Sphenophorus levis V-ATPase E* in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp interspecific hybrid) affects the insect growth and survival. **Plant Cell Reports**, v. 40, p. 507-516, 2021.

MONDAL, M. et al. Environmental RNAi pathways in the two-spotted spider mite. **BMC Genomics**, v. 22, n. 1, p. 1-11, 2021.

NELSON, N. et al. The cellular biology of proton-motive force generation by V-ATPases. **Journal of Experimental Biology**, v. 203, p. 89-95, 2000.

NEWSHOLME, E. A. et al. The role of creatine kinase and *arginine kinase* in muscle. **Biochemical Journal**, v. 172, p. 533–537, 1978.

OERTLI, J.; HARR, J.; GUGGENHEIM, R. The pH value as an indicator for the leaf surface microenvironment. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 84, p. 729–737, 1977.

OIVANEN, M. et al. Kinetics and mechanisms for the cleavage and isomerization of the phosphodiester bonds of RNA by Brønsted acids and bases. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 961–990, 1998.

PAMPOLINI, F. et al. Confocal microscopy provides visual evidence and confirms the feasibility of dsRNA delivery to emerald ash borer through plant tissues. **Journal of Pest Science**, v. 93, p. 1143–1153, 2020.

RAMKUMAR, G. et al. RNA Interference Suppression of *v-ATPase B* and *juvenile hormone binding protein* genes through topically applied dsRNA on tomato leaves: developing biopesticides to control the South American Pinworm, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Frontiers in Physiology**, v. 12, art. 742871, 2021.

REED, D. W.; TUKEY, H. B. Effect of pH on foliar absorption of phosphorus compounds by chrysanthemum. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 103, n. 3, p. 337-340, 1978.

ROBERTS, A. G.; OPARKA, K. J. Plasmodesmata and the control of symplastic transport. **Plant Cell and Environment**, v. 26, p. 103–124, 2003.

RODRIGUES, T. 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. 1-15, 2021b.

RODRIGUES, T. B.; PETRICK, J. S. Safety considerations for humans and other vertebrates regarding agricultural uses of externally applied RNA molecules. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, art. 407, 2020.

RODRIGUES, T. et al. Development of dsRNA as a sustainable bioinsecticides: from laboratory to field. In: RAUZAN, B. M.; LORSBACH, B. A (eds.). **Crop Protection Products for Sustainable Agriculture**. 1. ed. Washington, DC: ACS, 2021a. chap. 5, p 65-82.

RUNDEL, P. W. Water Uptake by Organs Other Than Roots. **Plant Physiological Ecology**, v. 12, p. 111–128, 1982.

SAN MIGUEL, K.; SCOTT, J. G. The next generation of insecticides: dsRNA is stable as a foliar-applied insecticide. **Pest Management Science**, v. 72, p. 801-9, 2016.

SARMAH, N. et al. dsRNA-mediated pest management of *Tuta absoluta* is compatible with its biological control agent *Nesidiocoris tenuis*. **Insects**, v. 12, n. 4, p. 274, 2021.

SCHWAB, F. Barriers, pathways and processes for uptake, translocation and accumulation of nanomaterials in plants - Critical review. **Nanotoxicology**, v. 10, n. 3, p. 257-278, 2016.

SOUZA, L. **Silenciamento gênico por RNA interferente (RNAi) em traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick)**: abordagens de entrega do dsRNA. 2022. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2022.

SPADOTTO, C. A.; SCORZA JUNIOR, R. P.; DORES, E. D. C.; GEBLER, L.; MORAES, D. D. C. **Fundamentos e aplicações da modelagem ambiental de agrotóxicos**. Campinas: Embrapa Monitoramento por Satélite, 2010. 46 p.

TANING, C. N. T. *et al.* Does RNAi-based technology fit within EU sustainability goals? **Trends in Biotechnology**, v. 39, n. 7, p. 644-647, 2021.

TOMOYASU, Y.; DENELL, R. E. Larval RNAi in *Tribolium* (Coleoptera) for analyzing adult development. **Development Genes and Evolution**, v. 214, n. 11, p. 575-578, 2004.

WANG, X. *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, p. 1003-1015, 2023.

WHITFIELD, R. *et al.* Efficient binding, protection, and self-release of dsRNA in soil by linear and star cationic polymers. **ACS Macro Letters**, v. 7, n. 8, p. 909-915, 2018.

WICKHAM, J. C. *et al.* Factors which influence the knockdown effect of insecticide products. **Pesticide Science**, v. 5, n. 5, p. 657-664, 1974.

XIE, Z. *et al.* An important role of an inducible RNA-dependent RNA polymerase in plant antiviral defense. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v. 98, n. 11, p. 6516-6521, 2001.

ZHANG, M. *et al.* Identifying potential RNAi targets in grain aphid (*Sitobion avenae* F.) based on transcriptome profiling of its alimentary canal after feeding on wheat plants. **BMC Genomics**, v. 14, p. 560, 2013.

ZOTTI, M. *et al.* RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes. **Pest Management Science**, v. 74, p. 6, p. 1239–1250, 2018.

4. dsRNA SINTÉTICO ASSOCIADO A NANOCARREADORES DE ZEÍNA PARA CONTROLE DE *Tuta absoluta*

Resumo

A tecnologia de RNA de interferência (RNAi) usando dsRNA sintético pode ser uma alternativa eficaz e não-transformativa para controlar pragas agrícolas, especialmente diante das crescentes preocupações com a resistência dos insetos a inseticidas e tecnologias transgênicas baseadas na toxina Cry. No entanto, existem desafios como a rápida degradação, baixa absorção celular e alto custo de síntese de dsRNA que dificultam o desenvolvimento da tecnologia como um biodefensivo agrícola. Estudos indicam que o uso de nanocarreadores para o silenciamento gênico via RNAi poderia superar ou contornar essas limitações, sendo viáveis para controle de lepidópteros por via oral. Os nanocarreadores de zeína (nZs) são nanomateriais renováveis, de baixo custo e toxicidade e com capacidade de proteger e entregar fármacos, genes ou biopesticidas a diversos organismos. Há poucos estudos sobre o uso desses nanocarreadores para o controle de pragas, e, portanto, foi investigado o potencial de entrega de dsRNA usando nZ como estratégia para controlar a traça-do-tomateiro (*Tuta absoluta*) em plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) 'Micro-Tom'. A associação entre nZ e dsRNA homólogo aos genes-alvo *arginina kinase* (AK) ou *ATPase vacuolar* (ATPase) ou o gene-controle *Green Fluorescent Protein* (GFP) atingiu alta eficiência de encapsulamento para as três sequências, formando coloides estáveis de tamanho médio entre 142 e 185 nm, com índice de polidispersão (PDI) de até 2,1, e potencial Zeta entre 14,6 e 16,8 mV. Em ensaio com larvas, a pulverização de nZ-dsRNA em plantas de tomateiro não apresentou eficácia de controle da traça-do-tomateiro quando comparado ao dsRNA não-carreado, embora possa ter apresentado um potencial efeito para controle de *T. absoluta* na fase de ovo. Foi demonstrada a habilidade de nZ-dsRNA penetrar nas folhas de MT e serem ingeridos por larvas. Também foi demonstrada a capacidade da raiz de MT absorver nZ-dsRNA e translocar para folhas. No entanto, um ensaio de toxicidade sugeriu um possível efeito negativo da absorção radicular de nZ em MT.

Palavras-chave: dsRNA nanocarreado. Formulação. Nanobiopesticida. Nanomaterial polimérico. Nanotoxicologia.

Abstract

The RNA interference (RNAi) technology using synthetic dsRNA can be an effective and non-transformative alternative to control agricultural pests, especially in the face of growing concerns about insect resistance to insecticides and transgenic technologies based on Cry toxin. However, there are challenges such as rapid degradation, low cellular absorption, and high synthesis cost of dsRNA that hinder the development of the technology as an agricultural biodefense. Studies indicate that the use of nanocarriers for gene silencing via RNAi could overcome or circumvent these limitations, being viable for controlling lepidopterans orally. Zein nanocarriers (nZs) are renewable, low-cost, low-toxicity nanomaterials with the ability to protect and deliver drugs, genes, or biopesticides to various organisms. There are few studies on the use of these nanocarriers for pest control, and therefore, the potential for dsRNA delivery using nZ was investigated as a strategy to control tomato leaf miner (*Tuta absoluta*) in tomato plants (*Solanum lycopersicum*) 'Micro-Tom'. The association between nZ and dsRNA homologous to the target genes *arginine kinase (AK)* or *vacuolar ATPase (ATPase)* or the control gene *Green Fluorescent Protein (GFP)* achieved high encapsulation efficiency, forming stable colloids with an average size between 142 and 185 nm, with a polydispersity index (PDI) of up to 2.1, and Zeta potential between 14.6 and 16.8 mV. In a larval bioassay, the spraying of nZ-dsRNA on tomato plants did not show efficacy in controlling tomato leafminer when compared to non-carried dsRNA, although it may have shown potential to control *T. absoluta* in the egg stage. The ability of nZ-dsRNA to penetrate MT leaves and be ingested by larvae was confirmed. The ability of MT roots to absorb nZ-dsRNA and translocate it to leaves was also demonstrated. However, a toxicity assay suggested a possible negative effect of root absorption of nZ in MT.

Keywords: Formulation. Nanobiopesticides. Nanocarried dsRNA. Nanotoxicology. Polymeric nanomaterial.

4.1 Introdução

O silenciamento gênico por RNA de interferência (RNAi) é um fenômeno altamente conservado em eucariotos e capaz de inibir a expressão de genes a partir da entrega de RNAs em dupla-fita (dsRNA) (FIRE et al., 1998; JOGA et al., 2016). A tecnologia de RNAi tem sido estudada para aplicação na agricultura, em destaque, para o controle de insetos-praga (KUNTE et al., 2020).

Plantas ou microrganismos transgênicos expressando dsRNA demonstraram índices satisfatórios para o controle de insetos (BENTO et al., 2020; MOHAN et al., 2021; Di LELIO et al., 2022). No entanto, os altos investimentos em pesquisa e desenvolvimento, o custoso processo de desregulamentação e a aceitação limitada por consumidores dificultam a difusão e comercialização de produtos oriundos da tecnologia de RNAi por OGM (KUNTE et al., 2020).

Paralelamente, abordagens não-transformativa têm sido avaliadas para controlar pragas por RNAi por meio do uso de moléculas de dsRNA sintetizado *in vitro* (JOGA et al., 2016). Embora o custo de síntese de dsRNA ainda seja elevado, diversas empresas têm investido em tecnologias para redução do custo final a partir de novos processos para produção industrial (GUAN et al., 2021).

A aplicação de dsRNA sintético pode apresentar eficácia no controle de insetos, principalmente, coleópteros; no entanto, a baixa persistência no ambiente devido a rápida degradação ambiental e a recalcitrância ao RNAi por lepidópteros e dípteros limitam o desenvolvimento de biopesticidas à base de dsRNA sintético (KUNTE et al., 2020).

Uma alternativa que tem sido explorada para superar algumas das limitações do uso de dsRNA sintético é a sua aplicação em associação com nanocarreadores (CHRISTIAENS et al., 2020). Essa abordagem poderia aumentar a estabilidade do dsRNA no ambiente, protegendo-o da degradação abiótica e por microrganismos, elevar a eficiência do controle de lepidópteros por RNAi, impedindo a hidrólise alcalina no intestino, além de facilitar a absorção celular, permitindo a redução das doses aplicadas (PUGSLEY et al., 2021; JAIN et al., 2022).

A zeína, uma proteína abundante do endosperma de milho, tem sido explorada como um nanocarreador para a entrega de fármacos e agroquímicos (PALIWAL; PALAKURTHI, 2014). Devido aos seus mais de 50% de resíduos hidrofóbicos, a zeína possui caráter anfipático e pode espontaneamente se

estruturar na forma de nano ou microestruturas sob condições específicas, como em meio aquoso (EL SHARKAWI et al., 2017).

Estudos farmacológicos em células humanas sugerem que as nanoformulações de fármacos com zeína puderam promover a absorção celular de fármacos (DONG et al., 2016; KAMMOUN et al., 2022), além de protegê-los da degradação enzimática precoce (NUNES et al., 2020). Estudos toxicológicos em células humanas e nematoides comprovaram a segurança da zeína por apresentar baixa citotoxicidade, alta biocompatibilidade e biodegradabilidade (MARTÍNEZ-LÓPEZ et al., 2021; GERMANO-COSTA et al., 2022). Deste modo, os nanocarreadores de zeína são apontados como potenciais nanoformulações para a entrega de medicamentos ou genes em humanos (CHEN et al., 2022; NUNES et al., 2020).

Na agricultura, os estudos de aplicação de nanocarreadores de zeína são recentes e pouco frequentes. No entanto, as combinações de nanopartículas de zeína com óleos essenciais de plantas (DE OLIVEIRA et al., 2020; MONTEIRO et al., 2021; PASCOLI et al., 2020; SARAIVA et al., 2021; STRAMARKOU et al., 2020), ou com fitoquímicos (DE OLIVEIRA et al., 2019), foram eficientes no controle de diversas espécies de insetos e ácaros, bem como patógenos de peixes (LUIS et al., 2020). Além disso, a associação com zeína reduziu a toxicidade de óleos essenciais para organismos não-alvo e plantas (DE OLIVEIRA et al., 2020; SARAIVA et al., 2021).

Embora a zeína tenha uma excelente afinidade como nanocarreador para entrega de DNA ou pequenos RNAs (sRNA) para terapias gênicas (CHEN et al., 2022; KARTHIKEYAN et al., 2015; REGIER et al., 2012), ainda não há estudos sobre sua associação com dsRNA sintético para controlar pragas agrícolas. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar o uso de nanocarreadores de zeína associados a dsRNA sintético para controlar a traça-do-tomateiro por RNAi.

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Obtenção de nanocarreadores de zeína (nZ)

Em parceria com o grupo de pesquisa do Prof. Dr. Leonardo Fraceto, do Laboratório de Nanotecnologia Ambiental, da UNESP, *Campus* Sorocaba, foram utilizados nanocarreadores à base de zeína para associação ao dsRNA sintético.

4.2.2 Associação do dsRNA sintético a nZ (nZ-dsRNA)

4.2.2.1 Síntese do nZ

Uma solução de 2% de zeína (p/v) foi preparada diluindo zeína *in natura* (Sigma Aldrich) em solução de 85% (v/v) de etanol *overnight*. Depois, a solução foi centrifugada a 1750 g por 30 min em temperatura ambiente e o sobrenadante foi coletado e aquecido em banho-maria a 75°C por 15 min. A solução final de 2% de zeína foi filtrada com um filtro de nylon de 0,45 µm e armazenada em temperatura ambiente.

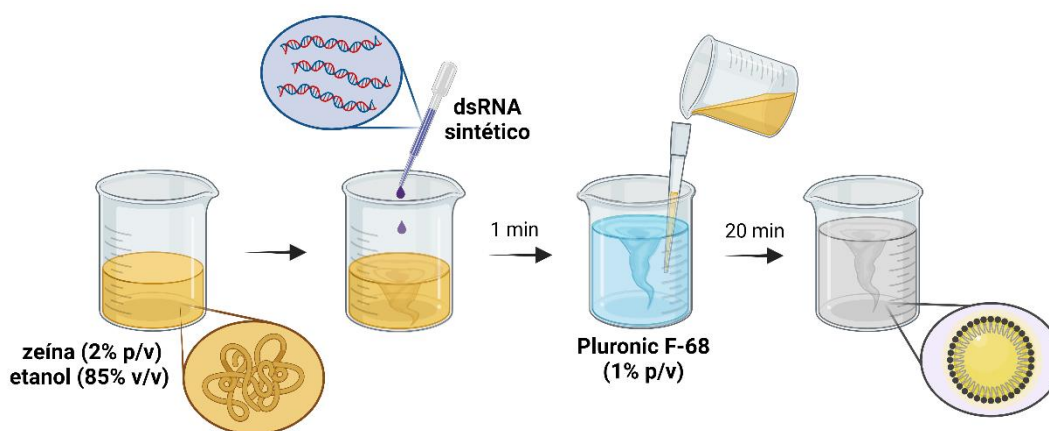


Figura 21. Encapsulamento do dsRNA sintético em nanocarreadores de zeína (nZ) (criado com Biorender.com)

A associação entre o dsRNA sintético e o nanocarreador de zeína (nZ) foi realizada diluindo as concentrações de dsRNA sintético (25, 50 ou 100 ng/µL) na solução de zeína. A solução de zeína e dsRNA foi então adicionada a uma solução de 2% de Pluronic™ F-68 (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) (v/v), agitada por 20 min, e reduzida a 2,5 mL sob vácuo utilizando um rota-evaporador (Tecnal, Piracicaba, São Paulo, Brasil) à 40 °C (Figura 21). A suspensão nZ-dsRNA foi imediatamente usada em ensaios de caracterização e atividade biológica. O mesmo processo foi repetido para associação com três moléculas diferentes de dsRNA sintético (dsAK, dsATPase e dsGFP).

4.2.2.2 Caracterização físico-química

Uma amostra de 50 µL de nZ-dsRNA foi diluída em 950 µL de água DEPC inativada e analisada no dispositivo ZetaSizer Nano ZS90 (Malvern Panalytica, Malvern, Reino Unido). A análise foi realizada a 25°C e foram medidos três parâmetros

físico-químicos do sistema coloidal do nZ-dsRNA: tamanho médio (nm), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (mV). As leituras foram realizadas a 0 h e 24 h em triplicatas técnicas.

4.2.2.3 Caracterização molecular

A caracterização molecular do nZ-dsRNA sintético foi realizada com o objetivo de avaliar a eficiência de encapsulamento das moléculas de dsRNA sintético em nZ e a integridade do dsRNA após o encapsulamento. A eficiência de encapsulamento foi avaliada pelo ensaio de imobilização por eletroforese em gel de agarose, que separa as moléculas de dsRNA sintético não-encapsuladas (que migram pelo gel) das moléculas encapsuladas (que ficam imóveis nos poços) (Figura 22).

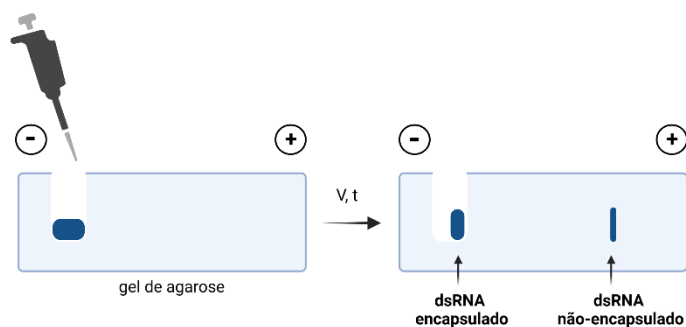


Figura 22. Ensaio de imobilização de dsRNA nanocarreado em gel de agarose (criado com Biorender.com)

Alíquotas das suspensões do nZ-dsRNA (2.500 ng de dsRNA) foram carregadas em um gel de 1,5% agarose em tampão 1x Tris-acetato-EDTA (TAE) e coradas com 1% (v/v) de brometo de etídio. Após a corrida eletroforética, o *software* ImageLab foi utilizado para estimar a quantidade de dsRNA não-encapsulado pela intensidade da fluorescência das bandas formadas. A quantidade de dsRNA não-encapsulado foi estimada por comparação com bandas de dsRNA sintético de quantidades conhecidas. O ensaio foi realizado com quatro réplicas.

A eficiência de encapsulamento do dsRNA sintético em nZ foi estimada pela seguinte fórmula:

$$\text{Eficiência de encapsulamento (\%)} = 100 - \frac{(\text{quantidade de dsRNA não-encapsulado} * 100)}{\text{quantidade de dsRNA total carregado no gel de agarose}}$$

Fórmula 1. Cálculo da eficiência de encapsulamento do dsRNA sintético em nanocarreadores de zeína (nZ) pelo método de imobilização por eletroforese em gel de agarose

Foram propostas duas formas de liberação dos dsRNA sintéticos das nZ: por precipitação alcalina e por degradação com proteinase K. Este experimento foi feito para verificar se os métodos propostos são efetivos para liberar o dsRNA sintético das nZ e se ele mantém sua integridade após o encapsulamento. A liberação do dsRNA sintético das nZ por precipitação alcalina foi realizada pelo ajuste do pH da suspensão para 12 pela adição de 0,2 N NaOH. Após, as suspensões ficaram em repouso por 45 min em temperatura ambiente. O método de liberação do dsRNA sintético das nZ por degradação com proteinase K foi realizado a partir da adição de 250, 500 e 1000 µg de proteinase K em suspensão do nZ-dsAK em microtubo, com volume final igual a 1 mL, a 60°C por 45 min.

O dsAK - concentração de 50 ng/µL de dsRNA sintético- foi utilizado como molécula-modelo para comparação entre as formas de liberação. A avaliação da efetividade e da integridade do dsRNA liberado foi feita por eletroforese em gel de 1,5% agarose com TAE 1x e 1% (v/v) de brometo de etídio e 2 V cm⁻¹.

4.2.3 Pulverização do nZ-dsRNA em tomateiro “Micro-Tom”

Os ensaios de fornecimento de nZ-dsRNA foram implementados pela pulverização foliar de plantas MT, visto que esse método apresentou melhor desempenho para a entrega dos dsRNA sintéticos anteriormente. O ensaio foi realizado pulverizando 2 mL por planta de nZ-dsRNA nas doses de 2, 5, 5, 10 ou 20 µg dsRNA em plantas "MT" de 40 d após germinação com um aerógrafo a uma distância de 25 cm. Nove larvas neonatas de *T. absoluta* foram inoculadas em cada planta (três neonatas por folha e três folhas por planta). Foram incluídos controles negativos com água e adjuvante ou apenas nZ, bem como controles positivos com os inseticidas comerciais Match® EC (MH) (Syngenta, Basileia, Suíça), do grupo químico das benzoiluréias (inibidores da biossíntese de quitina) ou Malation 1000 EC (ML) (FMC Corporation, Filadélfia, Pensilvânia, EUA), do grupo dos organofosforados (inibidores de acetilcolinesterase), nas doses recomendadas pelos fabricantes. Além disso, foram estabelecidos tratamentos com dsRNA sintético para comparar sua eficiência com ou sem a presença do nZ. Foram usadas oito réplicas por tratamento, totalizando 72 larvas por tratamento. As plantas foram mantidas em estantes com luz controlada em uma sala com temperatura, luminosidade e umidade do ar reguladas (25 ± 1°C, 14:8h e 60 ± 10%).

Dez dias após a aplicação, foram avaliados a mortalidade larval e o dano foliar em tomateiros MT, por meio da estimativa da área das lesões a partir de imagens fotográficas das folhas analisadas pelo *software* ImageJ. O peso das larvas sobreviventes também foi estimado pelo cálculo da diferença entre o peso de microtubos com cinco indivíduos e o peso de microtubos vazios.

4.2.4 Avaliação do potencial ovicida do nZ-dsRNA

O efeito ovicida do nZ-dsRNA foi avaliado pela exposição de ovos em plantas MT de 45 d pulverizadas com nZ-dsRNA (50 ng/ μ L de dsRNA) na dose de 20 μ g de dsRNA (dsAK ou dsGFP). Após secas, 10 ovos de *T. absoluta* foram colocados na superfície foliar de cada planta (cinco ovos por folha, um ovo por folíolo). Plantas foram também pulverizadas com nZ ou dsRNA sintético. A avaliação do efeito nos ovos foi feita verificando as larvas nas folhas no 6º e 7º dia após a inoculação, visto a dificuldade de analisar a sobrevivência do embrião dentro do ovo e que as larvas de *T. absoluta* eclodem no quinto dia após a postura.

4.2.5 Detecção de nZ-dsRNA por microscopia confocal

A técnica de detecção utilizada foi microscopia confocal de escaneamento a laser C2 (Nikon, Tóquio, Japão). A sonda fluorescente usada foi marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC). A zeína *in natura* marcada com FITC (nZ-FITC) foi cedida pelo Prof. Dr. Leonardo Fraceto (UNESP-Sorocaba, SP). A solução de 2% nZ-FITC foi preparada a partir da diluição do nZ-FITC e nZ (na proporção 1:19) em 85% (v/v) etanol com agitação *overnight*. A solução foi então centrifugada a 1750 g por 30 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e submetido a banho-maria a 75°C por 15 min. Por fim, a solução de 2% nZ-FITC teve o pH ajustado para 4,0 com adição de 0,2 N HCl e filtrada com filtro de seringa de nylon de 0,45 μ m. Para encapsulamento do dsRNA sintético em nZ-FITC, foi utilizada a molécula de dsAK na concentração de 50 ng/ μ L de dsRNA seguindo o mesmo procedimento que “4.2.2 Síntese do nZ e associação ao dsRNA sintético (nZ-dsRNA)”.

4.2.5.1 Pulverização em tomateiro “Micro-Tom”

Plantas de tomateiro MT de 40 d foram pulverizadas com suspensão do nZ-FITC-dsRNA contendo 20 μ g de dsRNA por planta. Um grupo controle de plantas

tratadas apenas com nZ-dsAK não-marcado também foi estabelecido. As plantas foram infestadas com ovos e larvas de *T. absoluta* em 1-2° ou 3-4° instar e mantidas em condições controladas (14:8h luz artificial, $25 \pm 1^\circ\text{C}$ temperatura e $60 \pm 10\%$ umidade relativa). Cerca de 24 h após a aplicação, folhas sem sinais de dano de *T. absoluta* tiveram pedaços de aproximadamente 1 cm^2 seccionados com auxílio de um bisturi, que foram utilizados para montagem de lâminas para visualização em microscópio confocal. Os ovos foram coletados e também visualizados por microscopia confocal. Enquanto isso, uma parte das larvas foi coletada e sacrificada por congelamento para visualização em microscópio confocal. O restante das larvas foi transferido para microtubos de 1,5 mL para coleta das fezes. Após 2h, as fezes depositadas nas paredes dos microtubos foram coletadas e utilizadas para montagem de placas que foram também analisadas por microscopia confocal. Ovos, larvas e fezes tratadas com nZ-dsAK não-marcado formaram o grupo controle.

4.2.5.2 Absorção radicular e translocação em tomateiro “Micro-Tom”

As raízes de plantas de tomateiro MT de duas semanas após germinação em substrato foram lavadas e cada planta foi colocada em um tubo plástico de 50 mL com 15 mL de suspensão do nZ-FITC-dsRNA (dose de $20\ \mu\text{g}$ de dsRNA). Os tubos tiveram as tampas furadas para permitir a passagem de ar e foram mantidos em estante de luz com condições controladas. Nos dias 2, 4 e 8, as plantas foram seccionadas com auxílio de um bisturi e tiveram amostras das raízes, caules, pecíolos e folhas coletadas e visualizadas em microscópio confocal (λ igual 495/521 nm). Amostras de plantas tratadas com nZ-dsRNA não-marcado foram usadas como grupo-controle. Adicionalmente, larvas de *T. absoluta* foram inoculadas em plantas tratadas com nZ-FITC-dsRNA por oito dias e, após 48 h, foram coletadas e examinadas por microscopia confocal. Larvas alimentadas com plantas tratadas com nZ-dsRNA não marcado foram usadas como grupo-controle.

4.2.6 Efeitos do nZ em tomateiro Micro-Tom

Plantas de tomateiro MT com duas semanas de idade germinadas em uma mistura de turfa vegetal e vermiculita (1:1) (substrato) foram lavadas em água-corrente para remoção de substrato das raízes e foram feitas medições do comprimento das raízes ou das partes aéreas e largura dos caules das plantas. Em seguida, as

plantas foram colocadas em tubos de plástico contendo nZ ou caseína nas doses de 2 ou 4 µg. Como grupo-controle, plantas foram mantidas em tubos com apenas água DEPC inativada. Seis horas após, alíquotas de 200 µL das suspensões do nZ ou caseína ou da água foram coletadas de três tubos com plantas aleatórios, a densidade óptica das amostras foi mensurada no Nanodrop no comprimento de onda de 600 nm, visando avaliar a crescimento de microrganismos.

Após 12 d, as plantas foram removidas dos tubos e novamente medidas. As medidas do comprimento das raízes, partes aéreas e largura dos caules foram repetidas após o tratamento com nZ ou caseína. O percentual de aumento das raízes, partes aéreas e larguras dos caules foi calculado com base nas diferenças nas medidas antes e após o tratamento com nZ ou caseína. Cada tratamento foi realizado com 10 réplicas. Foram também coletadas alíquotas de 200 µL das suspensões do nZ ou caseína ou da água dos tubos (os mesmos que anteriormente). As amostras coletadas foram lidas no Nanodrop no comprimento de onda de 600 nm e a diferença entre as amostras de 12 d e as de 6 h (branco) foi utilizada para estimar a quantificação de células por meio da densidade óptica.

4.2.7 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram conduzidas nos *softwares* R ou GraphPad Prism. As análises estatísticas da mortalidade de larvas de *T. absoluta* foram realizadas por ANOVA e testes de Dunnet, a fim de comparar os tratamentos e o grupo-controle (água), bem como para comparar os efeitos entre as doses de dsRNA sintético ou de nZ-dsRNA e os efeitos entre dsRNA sintético e nZ-dsRNA.

No experimento de redução do peso larval ou estimativa do dano foliar causado pelo ataque de larvas de *T. absoluta* foi utilizada a análise estatística Kruskal-Wallis e testes de Dunn para comparar os tratamentos e o grupo-controle (água), bem como para comparar os efeitos entre dsRNA sintético e nZ-dsRNA.

As análises estatísticas do experimento de eclosão de larvas de *T. absoluta* foram conduzidas por ANOVA e por teste de comparação por Dunnet para comparar o tratamento nZ-dsRNA e os demais grupos.

Por fim, os experimentos de efeitos da exposição do nZ via radicular ou absorvância das amostras foram analisados por ANOVA e por teste de comparações múltiplas por Tukey.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Caracterização físico-química e molecular

As proteínas de sementes desempenham um papel fundamental na nutrição humana, especialmente como fonte de aminoácidos essenciais (MCKEVITH, 2004). Uma classe de proteínas de reserva tipicamente encontrada em grãos de cereais são as prolaminas, que são pouco solúveis em água e melhor solubilizadas em etanol devido à sua composição de aminoácidos, sendo ricas em prolina e glutamina (SHEWRY et al., 1995). A zeína é um exemplo clássico de prolaminas e é uma classe de proteínas exclusivas do milho, que representam uma fração significativa do total de proteínas presentes no endosperma do grão (SHUKLA; CHERYAN, 2001). As zeínas são compostas por quatro proteínas (α -, β -, γ -, Δ -), sendo que a α -zeína corresponde a 70-85% do total de zeína (WILSON, 1991; PADUA; GARDIOLA, 2015) (Figura 1, anexos). A α -zeína é formada por duas subunidades de 19 e 22 kDa, ricas em aminoácidos apolares, como leucina, alanina e prolina, mas também possui aminoácidos polares, como glutamina, serina e asparagina (WILSON, 1991). Assim, a zeína apresenta uma característica anfipática, com uma cadeia central de aminoácidos hidrofóbicos e cadeias laterais hidrofílicas (WILSON, 1991; PADUA; GARDIOLA, 2015) (Figura 2, anexos).

Estudos indicam que a zeína tem propriedades semelhantes às dos plásticos convencionais, como resistência à água e durabilidade (SHUKLA; CHERYAN, 2001; HAMDANI et al., 2020). Por ser um material renovável e biodegradável, a zeína é considerada uma alternativa de baixo custo e sustentável para produção de embalagens alimentícias, tintas ou adesivos (ANDERSON; LAMSAL, 2011).

Devido à sua insolubilidade em água, a zeína tem a habilidade de formar espontaneamente estruturas em escala nanométrica a partir de sua diluição em solvente orgânico, seguida da exposição em meio aquoso, método conhecido como precipitação por antissolvente (PADUA; GARDIOLA, 2015). Este é um dos métodos mais barato e simples para síntese de nanocarreadores de zeína (nZ) e que também garante uniformidade e mais baixo tamanho médio dos coloides (DE OLIVEIRA et al., 2019; LI et al., 2022; PASCOLI et al., 2020).

Os nZs vêm sendo estudadas para formulação de moléculas, como medicamentos, cosméticos e pesticidas, visando a proteção das moléculas contra degradação, o aumento da absorção tecidual e celular ou ação prolongada

em razão das propriedades de liberação controlada do nZ (NUNES et al., 2020; PASCOLI et al., 2020). Além disso, os nZs possuem baixa toxicidade, alta biodegradabilidade e biocompatibilidade, sendo considerados materiais seguros pela agência americana de vigilância sanitária *Food and Drug Administration* (FDA) (CHEN et al., 2022; MARTÍNEZ-LÓPEZ et al., 2021; GERMANO-COSTA et al., 2022).

Alguns estudos indicaram que nZ têm alta afinidade com ácidos nucleicos, incluindo DNA em dupla-fita (dsDNA), DNA plasmidial (pDNA) ou siRNA (REGIER et al., 2012; CHEN et al., 2022; KARTHIKEYAN et al., 2015), o que sugere uma perspectiva positiva para associação com dsRNA. No entanto, não há informações sobre a ligação e estabilidade entre nZ e dsRNA, o que torna essa uma oportunidade para estudar o potencial de um nanomaterial sustentável para formulação de dsRNA sintético para o controle de uma praga agrícola por RNAi.

Neste contexto, foram conduzidos ensaios para avaliar a ligação e a estabilidade do nZ-dsRNA por meio da determinação do tamanho médio, do índice de polidispersão (PDI), do potencial Zeta e da eficiência de encapsulamento (EE%), bem como a integridade do dsRNA encapsulado em nZ por meio da degradação do nZ-dsRNA por uma protease ou por precipitação alcalina. Foram utilizadas concentrações crescentes de dsRNA sintético (25, 50 e 100 ng/ μ L) para encapsulamento em nZ e três moléculas de dsRNA (dsAK, dsATPase ou dsGFP).

A partir da leitura de amostras do nZ-dsRNA no tempo 0 h por meio da técnica de espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic light scattering*, DLS) foi observado que o aumento da concentração de dsRNA sintético resultou em alterações significativas no tamanho médio do nZ-dsRNA (Figura 23). A concentração de 25 ng/ μ L de dsRNA sintético produziu nanoestruturas de 142-172 nm, enquanto a concentração de 50 ng/ μ L de dsRNA sintético formou nanoestruturas de 168-185 nm. Por outro lado, a concentração de 100 ng/ μ L de dsRNA sintético (dsAK ou dsATPase) promoveu a formação dos maiores colóides, até mesmo extrapolando o limite máximo da escala nanométrica (<500 nm) (Figura 23 a). O aumento do tamanho médio do nZ-dsRNA conforme o aumento da concentração do dsRNA sintético utilizado para encapsulamento pode estar relacionado ao agregamento dos colóides entre si (LI et al., 2022).

O índice de polidispersão (PDI) das amostras do nZ-dsRNA também foi avaliado. O PDI avalia a distribuição do tamanho das partículas em uma amostra e é utilizado para avaliar a homogeneidade dos coloides no sistema (DANA EI et al., 2018). O PDI varia de 0 a 1, sendo que valores próximos de 0 indicam uma distribuição mais homogênea das partículas na amostra (DANA EI et al., 2018). Valores ideais de PDI ficam abaixo de 0,2 (DANA EI et al., 2018). Foi observado que as amostras do nZ-ds*ATPase* ou nZ-ds*GFP* apresentaram PDI abaixo de 0,2 para todas as concentrações de dsRNA sintético testadas (Figura 23b). Isso indica que as nanoestruturas nessas amostras apresentam uma distribuição mais uniforme. No entanto, no caso do nZ-ds*AK*, foi observado um aumento do PDI à medida que maiores concentrações de dsRNA sintético foram adicionadas na formulação, o que indica maior heterogeneidade na distribuição de tamanho dos coloides.

O terceiro parâmetro avaliado foi o potencial Zeta, que mede o potencial eletrocinético na zona de cisalhamento (JOUDEH; LINKE, 2022). Essa medição é utilizada para estimar a carga elétrica na interface entre o meio e a primeira camada de solvatação do coloide (JOUDEH; LINKE, 2022). Ao compararmos o potencial Zeta do nZ (sem adição de dsRNA) e nZ-dsRNA, notamos um aumento da eletronegatividade à medida que a concentração de dsRNA sintético aumenta (Tabela 4; Figura 23c). O aumento da eletronegatividade do nZ-dsRNA era esperado devido à carga negativa do dsRNA, como já relatado na associação de dsRNA com outros tipos de nanocarreadores poliméricos (CHRISTIENS et al., 2018; DHADAPANI et al., 2020; LU et al., 2022). Isto é uma evidência que o dsRNA sintético pode se ligar ao nZ por meio de interações elétricas (LI et al., 2022).

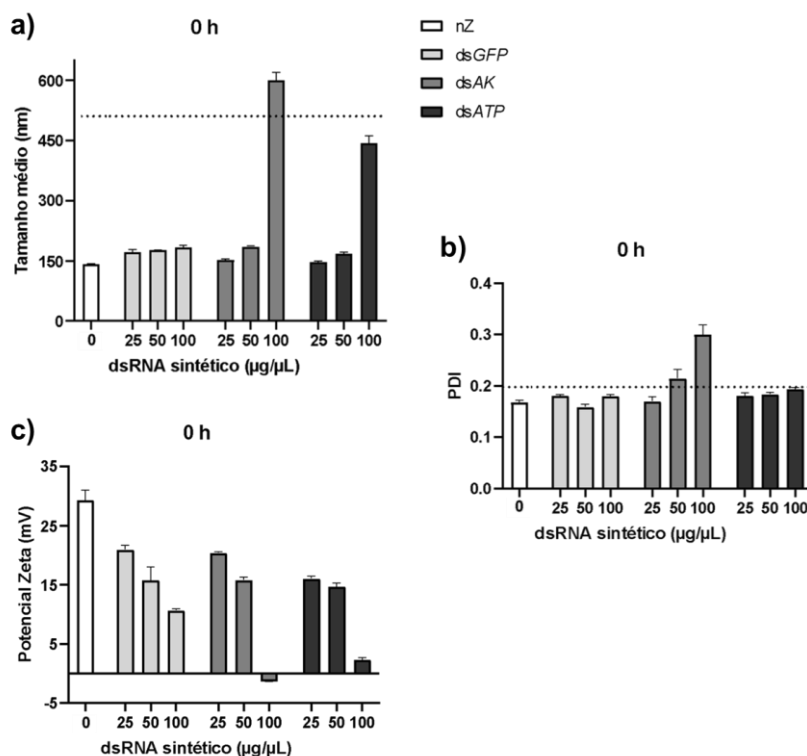


Figura 23. Caracterização físico-química do nZ-dsRNA em 0 h: **(a)** tamanho médio (nm), **(b)** Índice de Polidispersão (PDI) e **(c)** potencial Zeta (mV) do nZ-dsRNA.

Também foi observado que a estabilidade das amostras do nZ-dsAK (100 ng/µL de dsRNA sintético) diminuiu ao longo do tempo, com a formação de agregados macroscópicos após cerca de 4 h, enquanto as amostras do nZ-dsAK (50 ng/µL de dsRNA sintético) permaneceram estáveis (Figura 24).

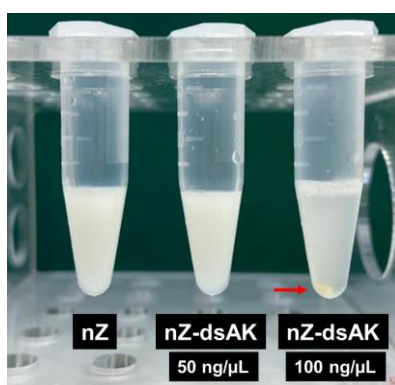


Figura 24. Formação de agregados a partir do aumento da concentração de dsRNA sintético para formulação do nZ-dsAK. Seta vermelha aponta um agregado macroscópico após cerca de 4 horas indicando baixa estabilidade e não-uniformidade do nZ-dsAK na concentração de 100 ng/µL.

As leituras realizadas 24 h após a síntese indicam que nZ-dsRNA nas concentrações de 25 ou 50 ng/µL de dsRNA são estáveis, uma vez que não foram observadas alterações expressivas nos parâmetros físico-químicos avaliados

(Tabela 4). No entanto, na concentração de 100 ng/ μ L de dsRNA, houve uma forte tendência de precipitação do nZ-dsRNA para dsAK ou dsATPase, o que pode explicar a queda no tamanho médio das partículas. Nesse caso, o nZ-dsRNA precipitado e aderido ao fundo dos tubos impediria a leitura adequada. Além disso, a precipitação do nZ-dsRNA nas amostras com maior concentração de dsRNA também pode afetar a medição do potencial Zeta, já que a quantidade de dsRNA presente no sobrenadante estaria reduzida, resultando em um menor valor de eletronegatividade (Tabela 4).

Tabela 4. Caracterização físico-química (tamanho médio; Índice de Polidispersão (PDI); Potencial Zeta) do nZ-dsRNA (sem dsRNA, ou com dsGFP, dsAK ou dsATPase) nos intervalos de 0 e 24 h

nZ-dsRNA	dsRNA (ng/ μ L)	0 h			24 h			
		Tamanho médio (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Tamanho médio (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Formação de agregados?
nZ	∅	141,2 \pm 1,0	0,17 \pm 0,01	29,3 \pm 1,7	146,9 \pm 1,8	0,16 \pm 0,01	32,2 \pm 0,1	Não
dsGFP	25	172,0 \pm 3,8	0,18 \pm 0,01	20,9 \pm 0,7	180,4 \pm 0,8	0,15 \pm 0,02	22,6 \pm 0,4	Não
	50	176,7 \pm 0,2	0,16 \pm 0,01	15,7 \pm 4,4	182,4 \pm 2,0	0,15 \pm 0,01	17,3 \pm 0,4	Não
	100	183,0 \pm 3,1	0,18 \pm 0,01	10,6 \pm 0,3	185,0 \pm 3,8	0,12 \pm 0,03	9,4 \pm 0,5	Não
dsAK	25	152,3 \pm 1,2	0,17 \pm 0,01	20,4 \pm 0,2	155,9 \pm 1,6	0,15 \pm 0,01	22,5 \pm 0,2	Não
	50	185,3 \pm 1,3	0,21 \pm 0,02	16,8 \pm 0,2	188,9 \pm 1,1	0,16 \pm 0,01	15,0 \pm 0,5	Não
	100	600,4 \pm 11,0	0,3 \pm 0,02	-1,3 \pm 0,1	172,1 \pm 46,0	0,67 \pm 0,12	0,8 \pm 0,1	Sim
dsATPase	25	146,57 \pm 1,5	0,18 \pm 0,01	24,5 \pm 0,3	146,89 \pm 0,2	0,19 \pm 0,01	23,6 \pm 0,4	Não
	50	168,23 \pm 1,9	0,18 \pm 0,01	14,6 \pm 0,6	215,1 \pm 2,5	0,17 \pm 0,02	13,1 \pm 0,8	Não
	100	443,1 \pm 10,7	0,19 \pm 0,01	2,3 \pm 0,4	176,8 \pm 1,15	0,38 \pm 0,02	10,1 \pm 0,5	Sim

Diversos estudos investigaram a associação de nanocarreadores com dsRNA, destacando a influência da matriz química e da funcionalização dos nanomateriais na ligação entre nanocarreadores e os ácidos nucleicos (DAS et al., 2015; GONZÁLEZ-GRANDÍO et al., 2021; MENDES et al., 2022). Frequentemente, nanomateriais passam por um processo de funcionalização, isto é, adição de grupos (âncoras) catiônicas na superfície do nanocarreador que permite as interações eletrostáticas com dsRNA (YIU et al., 2013). Contudo, foi demonstrado que muitos

dos compostos utilizados como âncoras podem apresentar toxidez, como a polietilenoimina (PEI) (GONZÁLEZ-GRANDÍO et al., 2021).

Um nanomaterial polimérico muito utilizado para associação com dsRNA são os nanocarreadores de quitosana, um polissacarídeo produzido a partir da desacetilação da quitina e que pode se associar diretamente (sem uso de âncoras) ao dsRNA (PUSGLEY et al., 2021). As moléculas de quitosana apresentam cadeias laterais catiônicas que interagem eletrostaticamente com os agrupamentos fosfato dos nucleotídeos, atingindo excelente eficiência de encapsulamento do dsRNA (PUSGLEY et al., 2021; WANG et al., 2023).

Em nosso estudo, não foi possível investigar a ligação entre nZ e o dsRNA em detalhes, o que limita as suposições sobre o mecanismo de ligação entre os componentes. Contudo, é provável que o dsRNA se ligue ao nZ por meio de interações elétricas, como forças de atração e repulsão entre as moléculas (LI et al., 2022). Essas interações poderiam ocorrer entre aminoácidos positivamente carregados presentes na zeína e o dsRNA (PADUA; GARDIOLA, 2015). Além disso, poderiam haver interações dipolo-dipolo entre o exterior do dsRNA e as cadeias laterais hidrofílicas do nZ (REGIER et al., 2012). Também poderia ocorrer a formação de pontes de hidrogênio entre os átomos de oxigênio dos grupos fosfato do dsRNA e átomos de hidrogênio de hidroxilas das cadeias laterais do nZ (LIU et al., 2022; MELZAK et al., 1996).

A eficiência de encapsulamento (EE%) é uma medida indireta que avalia a quantidade de dsRNA associado à zeína (nZ) em relação à quantidade total de dsRNA utilizado no processo de encapsulamento. Essa medida é calculada pela diferença entre a quantidade inicial de dsRNA utilizada e a quantidade de dsRNA que permaneceu livre no meio, após o processo de encapsulamento. O termo "encapsulamento" é utilizado para descrever a associação do dsRNA à zeína (nZ), e não necessariamente significa que o dsRNA está contido ou em uma estrutura fechada (nanocápsula), uma vez que não foi possível avaliar a morfologia do nZ-dsRNA em nosso estudo.

O ensaio de imobilização por eletroforese em gel de agarose foi escolhido para avaliar a EE%, pois permite separar o dsRNA encapsulado do não-encapsulado. O gel de agarose é uma matriz porosa que possibilita que somente o dsRNA não-encapsulado migre em direção ao polo positivo do campo elétrico, enquanto o dsRNA encapsulado permanece imóvel no poço (JAIN et al., 2022).

Dessa forma, a quantidade de dsRNA encapsulado pode ser quantificada por meio da diferença entre a quantidade total de dsRNA utilizada e a quantidade de dsRNA não-encapsulado, utilizando-se uma curva padrão formada por bandas de dsRNA com quantidades conhecidas.

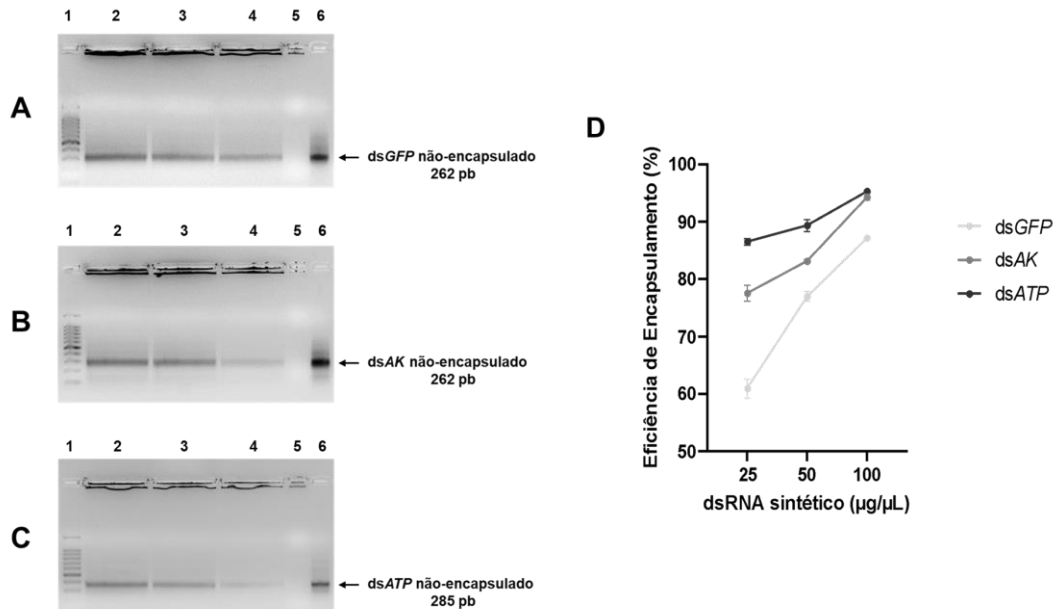


Figura 25. Ensaio de imobilização por eletroforese em gel de 1,5% agarose e TAE 1x para (a) dsGFP (b) dsAK e (c) dsATPase (1- padrão molecular 100 pb, formulação do nZ-dsRNA a partir de 2- 25, 3- 50, 4- 100 ng/µL de dsRNA sintético, 5- nZ, 6- dsRNA sintético) e (d) eficiência de encapsulamento (EE (%)) de dsRNA em nZ

A eficiência de encapsulamento (EE%) aumentou conforme o aumento da concentração de dsRNA sintético na formulação com nZ (Figura 25). Os valores máximos de EE% foram de 88,1%, 94,3% e 96,7% para dsGFP, dsAK e dsATPase, respectivamente, na maior concentração de dsRNA sintético testada (100 ng/µL). Uma possível explicação para a diferença nos valores de EE% entre as sequências de dsRNA pode estar relacionada ao conteúdo G-C. As sequências de dsAK e dsATPase, que possuem conteúdos G-C similares (~50%), apresentaram, na maior concentração testada, valores de EE% próximos. Por outro lado, dsGFP, que possui um conteúdo G-C menor (~30%), exibiu uma menor eficiência de encapsulamento em comparação às outras sequências.

Portanto, aparentemente a associação entre nZ e dsRNA foi influenciada pela concentração inicial e a sequência de dsRNA. Em relação à concentração, é mais comum que o dsRNA seja mais encapsulado em nanocarreadores quando adicionadas menores concentrações de dsRNA (ou maiores concentrações do

nanocarreador) (JAIN et al., 2022; WANG et al., 2023). Isso ocorre porque haveria uma maior proporção de nanocarreadores em relação ao dsRNA, o que aumenta a probabilidade de interação entre as moléculas (CHRISTIENS et al., 2020).

Por outro lado, estudos sobre o encapsulamento de diferentes compostos em nanocarreadores, incluindo nZ, indicam que o aumento da concentração inicial da molécula de interesse pode aumentar a interação com o nanocarreador (HOU et al., 2015; LI et al., 2022; WANG et al., 2013). Em particular, foi observado que concentrações mais altas de um fármaco permitiram uma maior associação aos nanocarreadores à base de quitosana e um mineral, mas somente até um certo ponto, quando ocorreu a saturação dos coloides (HOU et al., 2015). De maneira semelhante, os maiores índices de encapsulamento de um flavorizante em nZ foram obtidos a partir das maiores concentrações do flavorizante (WANG et al., 2013). Um estudo sobre o encapsulamento da rutina (vitamina P) em nZ também obteve resultados semelhantes, sugerindo que o aumento do encapsulamento da rutina seja pela interação entre os nZs (LI et al., 2022). Com base nessas evidências, uma hipótese seria que a interação entre os coloides do nZ poderia promover a formação de uma "rede" de dsRNA sintético, permitindo que mais moléculas de dsRNA sintético ficassem "presas" entre os coloides (Figura 26).

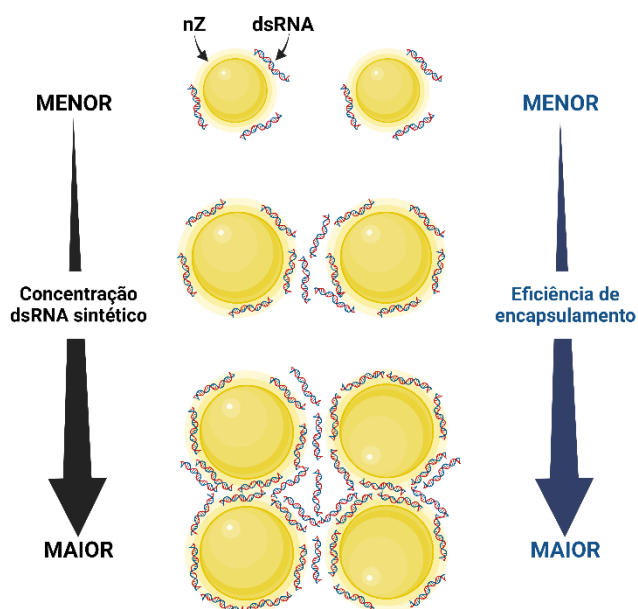


Figura 26. Modelo hipotético da formação do nZ-dsRNA (criado com Biorender.com)

Além da afinidade, é importante verificar se a integridade do dsRNA submetido ao encapsulamento em nZ permaneceu inalterada (GALLARATE et al., 2011; ZELIKIN

et al., 2007). Foram testados dois métodos *in vitro* para liberar o dsRNA do nZ-dsRNA a fim de verificar a integridade de dsRNA após encapsulamento: por precipitação alcalina (Figura 27 b) ou digestão por proteinase K (Figura 27 c). Ambas as formas foram capazes de induzir a liberação do dsRNA do nZ; contudo, a precipitação alcalina (pH igual a 12) promoveu a degradação de parte do dsRNA como esperado, de modo que impediu a avaliação integridade do ácido nucleico, uma vez que o dsRNA tende a sofrer hidrólise em pH alcalino (Figura 27 a). Por outro lado, a digestão do nZ-dsRNA por proteinase K (dose de 1.000 µg) foi capaz de liberar o dsRNA do nZ de modo que não influenciasse na integridade do dsRNA sintético (Figura 27 a). A proteinase K é uma protease de amplo espectro e é utilizada para extração de ácidos nucleicos com alto grau de pureza (ZYBAILOV et al., 2007). Deste modo, era sabido que, em condições normais, a proteinase K não deveria afetar a integridade de dsRNA. Assim, foi possível verificar que o dsRNA sintético aparentemente não sofreu degradação visível durante o processo de encapsulamento, o que é imprescindível para o desenvolvimento de um sistema eficiente de entrega de dsRNA sintético.

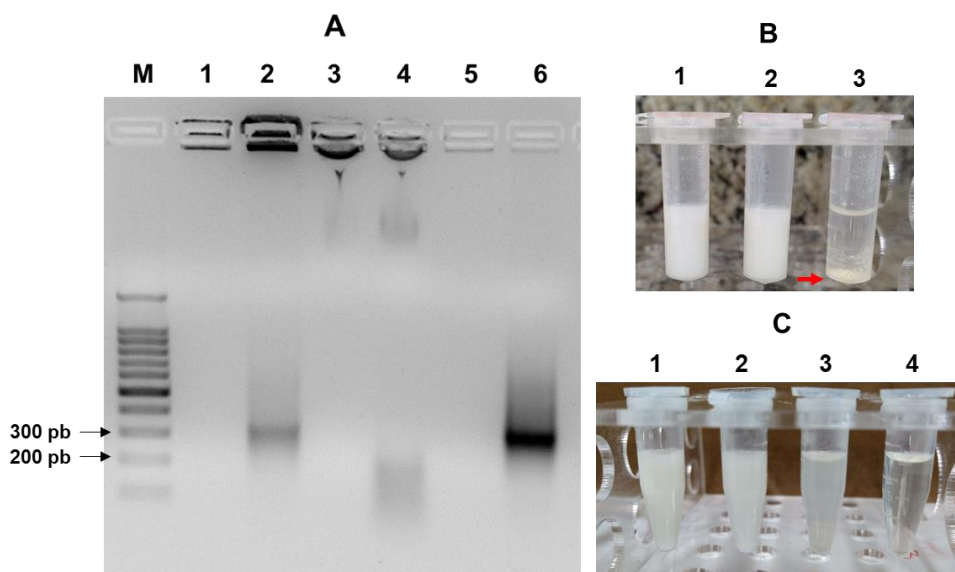


Figura 27. Integridade do dsRNA após formulação em nZ. **(A)** Imagem de gel de 1,5% agarose em 1X TAE : canaleta M- padrão 100 pb; 1 – nZ; 2 – nZ-dsRNA; 3 – nZ em pH 12; 4 – nZ-dsRNA em pH 12; 5 – nZ e proteinase K; 6 – nZ-dsRNA e proteinase K); **(B)** efeito de nZ-dsRNA sob vários pH (1 – pH 5; 2 – pH 6; 3 – pH 12); seta vermelha aponta formação de precipitado quando pH da suspensão foi ajustado para 12,0; **(C)** digestão de nZ-dsRNA por proteinase K (1 – 0; 2 – 250 µg; 3 – 500 µg ou 4 – 1000 µg de proteinase K)

4.3.3 Controle de *T. absoluta* por nZ-dsRNA

4.3.3.1 Efeitos em larvas

O controle da traça-do-tomateiro é um desafio para agricultura mundial, uma vez que a praga tem se espalhado pelo planeta e tem potencial de destruir significativamente as plantações de tomate (DESNEUX et al., 2021). Nesse sentido, a utilização de nanopesticidas tem sido explorada como uma alternativa para aumentar a eficácia de moléculas pesticidas no controle da praga na fase larval (CHERIF et al., 2021; SALAZAR et al., 2022; WANG et al., 2023).

A formulação de um inseticida comercial com nanopolímeros de poli(D,L-lactídeo) apresentou uma concentração letal média (CL₅₀) menor e uma taxa de mortalidade mais alta das larvas de *T. absoluta* em ensaios em laboratório que a versão não-formulada, mas não houve diferença estatisticamente significativa em ensaios em campo (CHERIF et al., 2021).

Além de inseticidas sintéticos, nanocarreadores têm sido utilizados com sucesso para formulação de biopesticidas contra *T. absoluta* (SALAZAR et al., 2022). A ingestão de folhas tratadas com óleos essenciais de *Citrus* spp. nanocarreados por polietilenoglicol (PEG) causou maior mortalidade em larvas que os tratamentos não-formulados (CAMPOLO et al., 2017). Além disso, os óleos essenciais de *Laureliopsis philippiana* formulados em nanoemulsões promoveram um aumento significativo do controle do inseto, com uma taxa de mortalidade de até 75%, em comparação com apenas 27% na versão não-carreada (SALAZAR et al., 2022).

Recentemente, tem sido utilizado o dsRNA associado a nanocarreadores para silenciar genes-alvo em larvas da traça-do-tomateiro (WANG et al., 2023). Dentre os nanocarreadores utilizados, destaca-se a quitosana e o *Star polycation* (SPc) (WANG et al., 2023). Este último é um polímero ramificado, composto por diversas cadeias catiônicas que irradiam de um núcleo central (YAN et al., 2022). Tanto o dsRNA nanocarreado por quitosana quanto o dsRNA nanocarreado pelo SPc induziram o silenciamento do gene-alvo nas larvas, bem como reduziram a sobrevivência de pupas e adultos (WANG et al., 2023).

Uma vez que os dados da caracterização do nZ-dsRNA confirmaram a ligação e estabilidade do dsRNA sintético e nZ, bem como a integridade do dsRNA após o encapsulamento, foi realizada uma avaliação da eficácia do nZ-dsRNA no controle de larvas da traça-do-tomateiro, comparando-o com o dsRNA não-carreado. Para o ensaio de eficácia, escolheu-se a concentração de 50 ng/μL de dsRNA sintético para

formulação com nZ, devido à sua estabilidade e eficiência de encapsulamento mais elevada em comparação às outras concentrações de dsRNA sintético estáveis testadas (Tabela 4). A aplicação foliar do nZ-dsRNA em tomateiro MT foi realizada por meio de pulverização com equipamento de alta pressão. Após 10 dias, tanto as larvas quanto as plantas foram avaliadas.

A entrega do nZ-dsRNA por pulverização às larvas da traça-do-tomateiro provocou mortalidade larval de *T. absoluta* em maior proporção apenas na maior dose de nZ-dsAK (cerca de 30% de mortalidade) (Figura 28 a). Por outro lado, o dsAK não-carreado (sem nZ) causou mortalidade significativamente maior que o grupo controle (água) para as quatro doses testadas de dsRNA sintético, com efeito dose-dependente, atingindo até 73% na maior dose de dsRNA sintético (20 µg/planta) (Figura 28 a, 28 b). Enquanto nenhum tratamento de pulverização com nZ-dsATPase causou mortalidade das larvas estatisticamente maior que o grupo-controle, o dsATPase apresentou mortalidade larval superior ao grupo-controle apenas na maior e na menor dose, aparentemente sem efeito dose-dependente (Figura 28a, 28c). Não foi constatado efeito dose-dependente em nenhum tratamento com nZ-dsRNA (Figura 28e-28g). É possível observar diferenças estatísticas entre todas as doses iguais de dsAK e nZ-dsAK, enquanto que para dsATPase e nZ-dsATPase essa diferença estatística só é notada na menor dose (Figura 28h, 28i).

Com relação ao gene-controle, foi observado que o dsGFP apresentou uma mortalidade larval significativamente maior em comparação ao grupo-controle, enquanto que o nZ-dsGFP não foi capaz de causar o mesmo efeito (Figura 28a). Ambos os tratamentos não apresentaram um efeito dose-dependente, porém, ao compararmos a mortalidade das larvas entre as mesmas doses dos tratamentos, foi observado que as doses intermediárias de dsGFP causaram taxas de mortalidade estatisticamente maiores do que as de nZ-dsGFP (Figura 28d, 28g, 28j). É importante destacar que a alta mortalidade larval resultante da exposição ao dsRNA sintético não-homólogo a genes de insetos pode estar relacionada a fenômenos hipotéticos de sobreposição das vias de regulação gênica mediadas por RNAs ou de saturação da maquinaria central de RNAi (COOPER et al., 2019). Esses fenômenos podem levar a uma regulação descontrolada da expressão gênica, afetando os componentes de diferentes sistemas biológicos, como o imunológico e o hormonal, além de influenciar negativamente o controle da expressão de elementos genéticos móveis presentes no genoma do inseto (KUNTE et al., 2020).

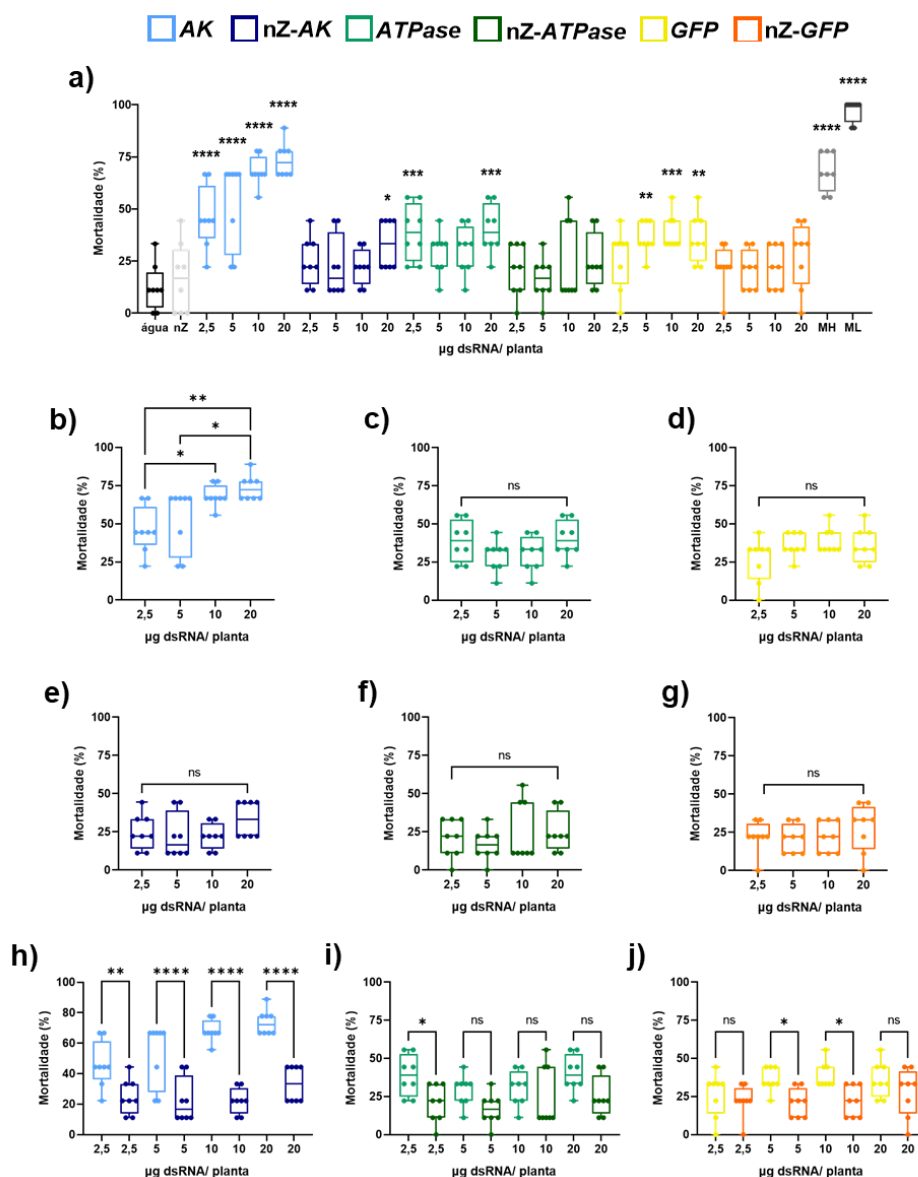


Figura 28. Mortalidade de larvas de *T. absoluta* após 10 d de alimentação com plantas de tomateiro MT pulverizado com dsRNA sintético ou nZ-dsRNA. MH: Match EC, ML: Malation 1000 (a) comparação estatística entre tratamentos nZ, AK, ATPase, GFP, nZ-AK, nZ-ATPase, nZ-GFP, MH ou ML e grupo-controle (água); comparação entre doses de (b) dsAK, (c) dsATPase, (d) dsGFP; (e) nZ-AK, (f) nZ-ATPase (g) nZ-GFP; e comparação dos efeitos entre (h) dsAK e nZ-AK, (i) dsATPase e nZ-ATPase e (g) dsGFP e nZ-GFP ($n = 8$; análise estatística por ANOVA e testes de Dunnet; * $< p = 0,05$; ** $< p = 0,01$; *** $< p = 0,005$; **** $< p = 0,001$; ns = não significativo)

Para avaliar possíveis alterações fenotípicas nas larvas de *T. absoluta* causadas pela alimentação com plantas MT pulverizadas com dsRNA sintético ou nZ-dsRNA, foi examinado o peso médio das larvas sobreviventes. A alimentação com dsAK e o inseticida comercial MH foram capazes de reduzir o peso médio das larvas em comparação com o grupo controle (água) (Figura 29a). Por outro lado, o dsATPase

não apresentou efeito sobre o peso fresco das larvas, enquanto a dose de 5 μg de ds*GFP* induziu um efeito redutor no peso larval (Figura 29a). Quanto aos tratamentos com nZ-dsRNA, os resultados foram inconclusivos, uma vez que a menor dose do nZ-dsAK (2,5 μg de dsRNA) e as duas menores doses do nZ-ds*ATPase* (2,5 ou 5 μg de dsRNA) reduziram significativamente o peso médio das larvas, enquanto nenhum tratamento com nZ-ds*GFP* causou um efeito semelhante (Figura 29a).

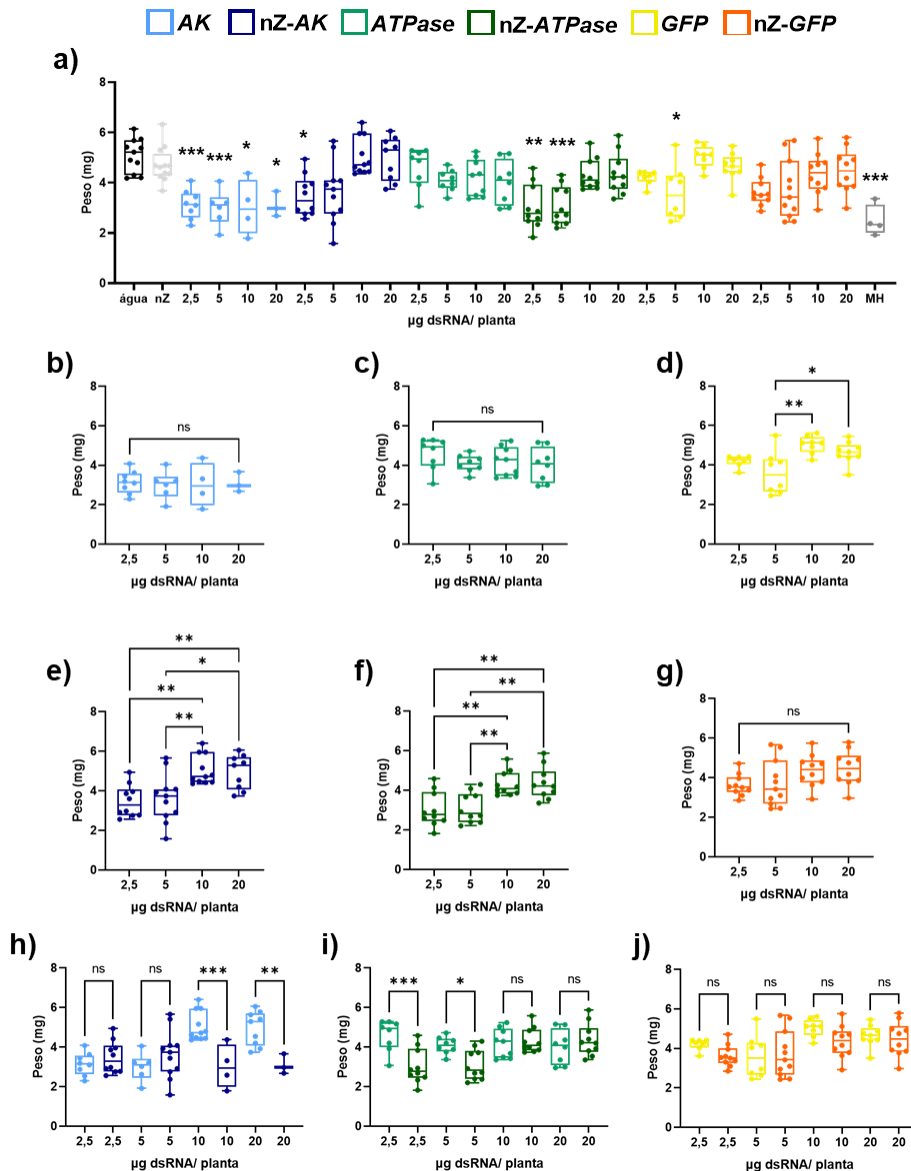


Figura 29. Média do peso de larvas de *T. absoluta* sobreviventes após ingestão de plantas de tomateiro MT tratado com dsRNA sintético ou nZ-dsRNA. (a) comparação estatística entre tratamentos nZ, AK, ATP, GFP, nZ-AK, nZ-ATP, nZ-GFP ou MH e grupo-controle (água); comparação entre doses de (b) dsAK, (c) dsATP, (d) dsGFP; (e) nZ-AK, (f) nZ-ATPase (g) nZ-GFP; e comparação dos efeitos entre (h) dsAK e nZ-AK, (i) dsATPase e nZ-ATPase e (g) dsGFP e nZ-GFP ($n = 3-11$; análise estatística por Kruskal-Wallis e teste de Dunn; * $< p = 0,5$; ** $< p = 0,1$; *** $< p = 0,05$; ns = não significativo)

As imagens fotográficas das larvas após 10 dias de alimentação com plantas de tomateiro pulverizadas com dsRNA sintético ou nZ-dsRNA, reforçam os dados obtidos a partir do peso (Figura 30). As larvas expostas ao dsAK apresentaram-se raquíticas, com alguns indivíduos exibindo coloração esbranquiçada, possivelmente devido à incapacidade de se alimentarem das folhas. Já para os tratamentos com dsATPase, não foram observados sinais de raquitismo semelhantes ao tratamento com dsAK. Além disso, não foram identificadas alterações fenotípicas nas larvas submetidas ao nZ-dsRNA (dsAK ou dsATPase).



Figura 30. Larvas de *T. absoluta* de 10 d alimentadas com plantas de tomateiro MT pulverizadas com dsRNA sintético ou nZ-dsRNA nas doses de 20 ou 10 µg de dsRNA homólogos aos genes *AK*, *ATPase* ou *GFP*, além do grupo-controle (água), nZ ou Match EC (MH). Aumento de 10 x, escala 20 mm.

Após avaliarmos o dano foliar causado pelas larvas de *T. absoluta* em tomateiro MT pulverizado com dsRNA ou nZ-dsRNA por 10 dias, observamos que os tratamentos com nZ-dsAK ou nZ-dsATPase não resultaram em redução do dano foliar (Figura 31a). Por outro lado, verificamos que a utilização de dsRNA sintético dsAK

nas doses de 10 ou 20 μg ou ds*ATPase* na dose de 20 μg , assim como o inseticida comercial MH, causou redução estatisticamente significativa do dano foliar, em comparação com o grupo-controle (água) (Figura 31a). A média do dano foliar nos tratamentos com ds*AK* ou ds*ATPase* foi de cerca de 0,3 cm^2 e 0,9 cm^2 , respectivamente, enquanto que no grupo-controle foi de 1,25 cm^2 , ou seja, houve redução de cerca de 30 a 75% no dano foliar.

Ao compararmos os tratamentos dsRNA e nZ-dsRNA, notamos que ambas as doses de ds*AK* ou apenas a maior dose de ds*ATPase* foram mais eficazes na redução do dano foliar do que os tratamentos nanocarreado nZ-ds*AK* ou nZ-ds*ATPase* (Figura 31b, 31c). Adicionalmente, a aplicação de ds*GFP* ou nZ-ds*GFP* nas plantas não causou redução no dano foliar médio, em comparação com o grupo-controle, e os tratamentos ds*GFP* e nZ-ds*GFP* não diferiram entre si (Figura 31d, 31g).

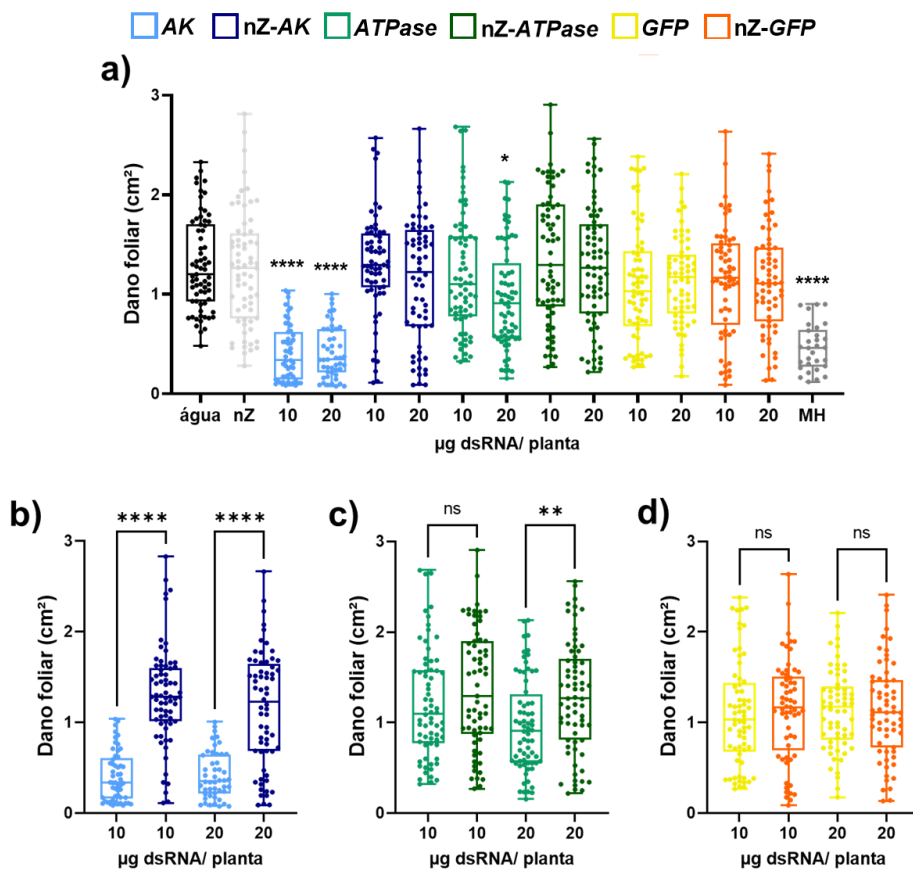


Figura 31. Dano foliar causado pelo ataque de larvas de *T. absoluta* em tomateiros MT pulverizados com dsRNA sintético ou nZ-dsRNA (a) comparação estatística entre tratamentos nZ, AK, ATP, GFP, nZ-AK, nZ-ATP, nZ-GFP ou MH e grupo-controle (água); comparação entre tratamentos e grupo-controle (água) e comparação entre (b) ds*AK* e nZ-*AK*, (c) ds*ATPase* e nZ-*ATPase* e (d) ds*GFP* e nZ-*GFP* ($n = 40-62$); análise estatística por Kruskal-Wallis e testes de Dunn; * $< p = 0,5$; ** $< p = 0,1$; *** $< p = 0,05$; **** $< p = 0,01$; ns = não significativo)

As imagens das folhas do tomateiro MT confirmam a eficácia do tratamento com dsAK na dose de 20 µg na redução do dano foliar causado por *T. absoluta* e a ineficiência do nZ-dsRNA (Figura 32a). Além disso, foi observado um número considerável de pequenas larvas mortas dentro dos danos nas folhas dos tratamentos com 20 µg de dsAK (Figura 32b).

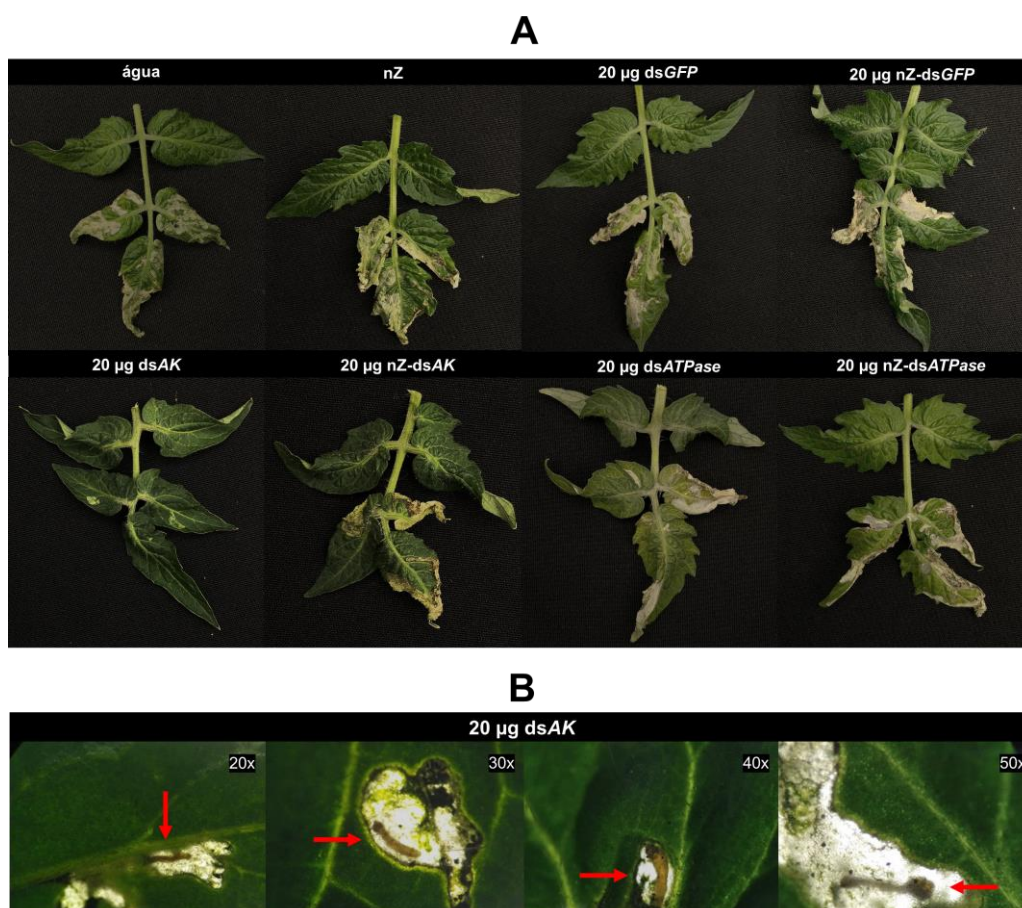


Figura 32. (A) Dano foliar causado por larvas de *T. absoluta* em tomateiro MT pulverizado com dsRNA sintético ou nZ-dsRNA após 10 dias; **(B)** setas vermelhas indicam larvas de *T. absoluta* mortas em folhas de tomateiro MT pulverizados com 20 µg de dsRNA sintético homólogo ao gene *AK*, aumento de 20 até 50 x

Com base na análise dos dados de mortalidade e peso larval, bem como no dano foliar no tomateiro, fica evidente que o uso de nZ-dsRNA não foi eficaz no controle das larvas de *T. absoluta*, enquanto que o uso de dsRNA sintético (não-carreado), especialmente dsAK, foi eficaz e equivalente a um inseticida comercial.

Para o controle de insetos por dsRNA sintético associado a nanocarreadores, os relatos de ausência ou piora do efeito no controle de insetos pelo uso de dsRNA nanocarreado são mais escassos. Um estudo explorou o uso de dsRNA sintético

associado a três nanocarreadores em controlar *A. aegypti* (DAS et al., 2015). Enquanto que a entrega de dsRNA associado a pontos quânticos de carbono (CQD) ou nanocarreadores de quitosana provocou a redução dos transcritos do gene-alvo e a mortalidade de larvas, a entrega de dsRNA associado a nanopartículas de óxido de sílica não causou redução significativa do nível de mRNA do gene-alvo nem provocou a mortalidade de larvas (DAS et al., 2015).

Mais recentemente, foi investigado o controle de *B. tabaci* pela aplicação foliar de dsRNA sintético associado ao BioClay[®], um nanocarreador de dupla-camada de argila (JAIN et al., 2022). Dos quatro genes-alvos testados, três foram capazes de reduzir significativamente o nível de transcritos de seus respectivos genes-alvo tanto na forma carregada quanto na forma não-carregada (JAIN et al., 2022). Contudo, foi constatado que o dsRNA homólogo ao gene *zinc finger protein (zfp)*, envolvido nos processos de digestão em insetos, só ocasionou silenciamento do gene-alvo na forma não-carregada (JAIN et al., 2022). Enquanto o BioClay[®] demonstrou eficácia variável no controle de *B. tabaci*, supostamente dependente do gene-alvo escolhido para silenciamento, a desestabilização do dsRNA durante o processo de encapsulamento em nanocarreadores de zeína pode ter sido a causa da ineficácia do nZ-dsRNA no controle da traça-do-tomateiro.

A precipitação por antissolvente é um método comum para a preparação de nZ e já foi utilizada com sucesso para encapsulamento de óleos essenciais com potencial inseticida (DE OLIVEIRA et al., 2020; MONTEIRO et al., 2021; PASCOLI et al., 2020). Esse método é baseado na diferença de solubilidade da zeína em solução orgânica e aquosa, o que leva à formação de nanocarreadores (LI et al., 2022). A natureza anfipática da zeína permite que ela seja dissolvida em um solvente orgânico, como o etanol, e quando exposta a uma solução aquosa, se autoestruturam em colóides nanométricos (LIU et al., 2023).

Para encapsulamento do dsRNA sintético pelo método de precipitação por antissolvente, a zeína foi diluída em etanol e, em seguida, o dsRNA sintético foi adicionado à solução de zeína. Depois disso, a solução zeína-dsRNA foi exposta a uma solução aquosa de Pluronic[™] F-68 para precipitação e formação de nZ-dsRNA. Por meio do método de precipitação por antissolvente obtivemos alta eficiência de encapsulamento do dsRNA sintético em nZ, além de que, quando nZ-dsRNA foi digerido por uma protease, dsRNA se manteve aparentemente íntegro pós-encapsulamento (Figura 27). Contudo, a adição do dsRNA na solução de zeína diluída

em etanol pode ter afetado propriedades físico-químicas do dsRNA, como a solubilidade, a carga elétrica, bem como as interações hidrofóbicas e hidrofílicas responsáveis pela estabilidade da estrutura secundária do RNA (NAKANO; SUGIMOTO, 2016). Quando essas propriedades foram alteradas, pode ter ocorrido a desestabilização ou desnaturação do dsRNA, resultando na perda de sua função biológica e, conseqüentemente, incapacidade de nZ-dsRNA de causar silenciamento gênico em larvas de *T. absoluta*.

Embora existam outros métodos para síntese de nZ, como dispersão líquido-líquido ou diálise, esses métodos também envolvem a diluição da zeína em solvente orgânico (LIU et al., 2023). Há, ainda, um método de preparação de nZ pela exposição da zeína em solução alcalina, denominado “método impulsionado por pH” (*pH-driven method*), contudo também não seria adequado porque o pH alto promoveria a degradação do dsRNA (LIU et al., 2023).

Uma outra hipótese que poderia explicar a piora do controle da traça-do-tomateiro pela entrega de dsRNA sintético associado a nZ é a capacidade limitada de penetração foliar e ingestão pelas larvas do nZ-dsRNA. Os hábitos alimentares dos insetos-praga são diversos e a aplicação foliar do dsRNA nanocarreado nem sempre poderia ser adequada (CAGLIARI et al., 2018). Para os insetos mastigadores de folhas, que se alimentam das folhas por completo, a aplicação foliar de um dsRNA nanocarreado não seria um fator limitante (CAGLIARI et al., 2018; HOANG et al., 2022). Por outro lado, para os insetos que consomem apenas os tecidos internos da folha, como as larvas da traça-do-tomateiro, o dsRNA nanocarreado deve ser capaz de penetrar a folha, caso o contrário, o dsRNA não seria ingerido (KUNTE et al., 2020; MAJIDIANI et al., 2019). Deste modo, a eficácia de controle das larvas de *T. absoluta* pela aplicação foliar de dsRNA nanocarreado é fortemente dependente da habilidade do coloide em penetrar a folha e estar disponível no mesófilo para ingestão pelas larvas.

Previamente demonstramos que o dsRNA sintético marcado com sonda fluorescente Cy3 (dsRNA-Cy3) foi capaz de penetrar a folha do tomateiro MT e ser ingerido pelas larvas de *T. absoluta* (Capítulo 2, pag. 83, Figura 15). Contudo, as propriedades físico-químicas do sistema coloidal formado por nZ e dsRNA, como carga elétrica positiva (14-16 mV) e tamanho médio de 168-185 nm, poderiam influenciar a penetração foliar, de modo que o dsRNA estaria limitado a superfície foliar e indisponível para ingestão pelas larvas.

Uma outra possível explicação para a redução no efeito do controle de *T. absoluta* pela aplicação do nZ-dsRNA estaria relacionada a habilidade de nZ em modular a expressão de genes de defesa no tomateiro MT (NARASIMHAMURTHY et al., 2022), o que poderia ter levado à degradação mais rápida do nZ-dsRNA pela planta, reduzindo a oferta de dsRNA disponível para o inseto. No entanto, atualmente, há poucas informações disponíveis sobre os efeitos do nZ na expressão gênica de plantas. Evidências indicaram que alguns nanomateriais podem modular a defesa das plantas, especialmente contra patógenos (PINSINO et al., 2020). Nanopartículas de óxido de titânio, nanopartículas de prata e nanotubos de carbono (CNTs) afetaram negativamente a expressão de genes de defesa contra patógenos em *A. thaliana*, a ponto de promover a infecção bacteriana nas plantas (GARCÍA-SANCHES et al., 2015). Por outro lado, nanocarreadores de quitosana ou nanopartículas de cobre induziram positivamente a síntese de enzimas e metabólitos secundários envolvidos na resistência de plantas contra fitopatógenos (CHANDRA et al., 2015; MOHAMED, 2019; SIDDAIAH et al., 2018). Além disso, nanopartículas de ouro foram capazes de induzir a expressão de microRNAs envolvidos na regulação do crescimento de *A. thaliana* (KUMAR et al., 2013).

A partir disso, a exposição do nZ às plantas de tomateiro poderia ter promovido a síntese de enzimas capazes de degradar o nZ-dsRNA mais rapidamente, quando comparado ao dsRNA não-carreado. No entanto, não está claro se o nZ é capaz de alterar a expressão gênica de plantas, sendo necessários mais estudos para investigar essa possibilidade.

A ineficiência do nZ-dsRNA em controlar a traça-do-tomateiro também pode ser atribuída às propriedades físico-químicas do nZ, que afetaram a liberação do dsRNA do nZ após a ingestão pelo inseto, bem como sua estabilidade no intestino das larvas. Nanocarreadores podem apresentar propriedades de liberação estímulo-responsivas, ou seja, liberar a molécula carregada sob determinadas condições (CAMARA et al., 2019). Os principais fatores que determinam quais propriedades de liberação um nanocarreador terá são a composição, proporção e tipos de interação entre a matriz, molécula carregada e aditivos (LEE; YEO, 2016). Comumente, nanocarreadores são projetados para serem responsivos à degradação enzimática, às mudanças de pH, temperatura ou salinidade, às interações com campos elétricos ou à oxidação (CAMARA et al., 2019).

Embora as propriedades de liberação do nZ sejam pouco avaliadas, estudos anteriores demonstraram que enzimas do suco intestinal ou tripsina de *Spodoptera frugiperda* foi capaz de promover a liberação *in vitro* de óleos essenciais encapsulados em nZ (MONTEIRO et al., 2021). Uma ausência pressuposta ou baixa expressão de homólogos de tripsina pelas células do intestino de *T. absoluta* poderiam justificar a ineficácia da liberação do dsRNA do nZ. Contudo, a tripsina é uma das principais e altamente conservadas proteases do suco intestinal dos insetos (HEMMATI; MEHRABADI, et al., 2020), sendo já investigado o papel da tripsina na degradação de proteínas em *T. absoluta* (HAMZA et al., 2018; LAZAREVIĆ; JANKOVIĆ-TOMANIĆ, et al., 2015). Portanto, seria improvável que a ineficiência na liberação do dsRNA do nZ seja devido à ineficiência de homólogos à tripsina nas larvas da traça-do-tomateiro.

Outro fator importante a ser considerado na liberação de moléculas nanocarreadas é o pH (CAMARA et al., 2019). Zhong et al. (2022) relataram que um vermífugo encapsulado em nZ e sílica teve a liberação estimulada em pH alcalino (pH = 9,0). Esse fenômeno pode ser explicado pela tendência do nZ em se tornar eletricamente negativo em pH alcalino (SPASOJEVIĆ et al., 2020), resultando na repulsão entre o nZ e o vermífugo de carga negativa, promovendo a liberação (ZHONG et al., 2022). Com base nisso, nossos resultados apresentariam uma contradição, já que o nZ-dsRNA, quando ingerido pelas larvas, seria exposto ao suco intestinal alcalino, o que promoveria a liberação do dsRNA do nZ por repulsão elétrica (ZHONG et al., 2022). Por outro lado, a estabilidade do nZ é fortemente influenciada pelo pH, sendo que em pH acima de 6,0 o nZ tendem a precipitar (ABDELSALAM et al., 2021; LI et al., 2021). Isso ocorre porque o ponto isoelétrico da zeína é 6,2 e, em pH alcalino, é alterado a carga elétrica dos aminoácidos, bem como são promovidas reações de desaminação de glutaminas e asparaginas da α -zeína (ABDELSALAM et al., 2021).

O pH do intestino médio das larvas de lepidópteras varia entre 9 e 11 (KUNTE et al., 2020), o que poderia promover a precipitação e formação de agregados do nZ-dsRNA no intestino das larvas de *T. absoluta* (LI et al., 2022). Esses agregados, devido ao seu tamanho maior, poderiam dificultar a sua digestão pelas enzimas presentes no intestino, bem como a passagem pela membrana peritrófica e absorção pelas células, impedindo a indução do fenômeno de silenciamento gênico. Em nosso estudo, observamos que o nZ-dsRNA precipitou quando exposto ao pH 12 (Figura 27). No entanto, não foi possível avaliar a liberação do dsRNA em

pH alcalino, uma vez que a molécula foi degradada quando relevada por eletroforese em gel de agarose (Fig. 27).

Além disso, é possível que as alterações na expressão dos genes-alvo em larvas de *T. absoluta* após a ingestão de nanoestruturas estejam relacionadas à piora dos efeitos do dsRNA nanocarreado por nZ em comparação com o dsRNA sintético não-carreado. Estudos anteriores mostraram que a exposição a nanopartículas pode levar a alterações na expressão gênica em artrópodes (ARTAL et al., 2020; YAN et al., 2022). Análise do transcriptoma de um artrópode marinho exposto a nanopartículas de prata revelou alterações na expressão de genes envolvidos em diversos processos biológicos, em especial, a atividades catalíticas ou de peptidases (ARTAL et al., 2020). Enquanto isso, a análise do transcriptoma de larvas de *D. melanogaster* expostas a *Star polycation* (SPc) permitiu identificar mais de 500 genes diferencialmente expressos, sendo 170 genes com regulação positiva e muito dos quais relacionados ao metabolismo celular (YAN et al., 2022).

Um estudo recente realizado em células SF9 *in vitro* mostrou que a entrega de SPc-dsRNA promoveu a expressão diferencial de 249 genes, sendo 150 regulados positivamente, incluindo genes envolvidos no metabolismo celular (MA et al., 2022). Nesta perspectiva, poderíamos supor que a piora do efeito do controle de *T. absoluta* pela aplicação do nZ-dsRNA pode estar relacionada à regulação positiva da expressão dos genes-alvo *AK* ou *ATPase* nas larvas causada pela exposição ao nZ. O aumento da expressão desses genes-alvo poderia dificultar a redução do nível de transcritos pelo fenômeno de silenciamento gênico por RNAi, impedindo a ocorrência de efeitos adversos nas larvas. Em contrapartida, em um estudo com *B. mori*, foi demonstrado que a exposição de larvas a nanopartículas de óxido de zinco reduziu a expressão de *AK* (BELAL; GAD, 2023). No entanto, é importante ressaltar que os efeitos causados por nanoestruturas na expressão gênica podem variar entre espécies e dependem de vários fatores, como o tipo de nanoestrutura e a dose aplicada (BENELLI et al., 2018).

4.3.3.2 Potencial ovicida

O controle de insetos na fase de ovo tem histórico de ser negligenciado por ser considerada a fase do desenvolvimento dos insetos mais difícil de ser controlada por moléculas pesticidas (CAMPBELL et al., 2016). A dificuldade do controle de insetos na fase de ovo é devido ao fato dos embriões serem protegidos por um envelope

denominado cório, cuja função é impedir a penetração de patógenos, atenuar a desidratação e reduzir o dano mecânico (AL-DOSARY et al., 2010). Assim, o cório é a principal barreira que dificulta as moléculas pesticidas de atingirem o embrião (CAMPBELL et al., 2016). Apesar da dificuldade, diversos estudos demonstraram que alguns pesticidas sintéticos ou óleos essenciais de plantas são capazes de provocar a mortalidade dos embriões quando aplicado nos ovos (ALVES et al., 2019; MEHROTRA; SMALLMAN, 1957; TUNÇ et al., 2000).

Para o controle da traça-do-tomateiro na fase de ovo, um estudo recente demonstrou que os óleos essenciais de nim e os de folhas de mogno africano (*Khaya senegalensis*) foram eficazes na inibição da eclosão de 100% dos embriões (SAWADOGO et al., 2022). No entanto, um estudo com óleos essenciais de três espécies de *Citrus* nanocarreados por PEG mostrou que a aplicação de óleos de *C. reticulada* e *C. limon* causaram baixa mortalidade contra os embriões, mesmo quando nanocarreados (COMPOLO et al., 2017). Já o óleo de *C. sinensis* nanocarreado causou a morte de 46% dos embriões, quase duas vezes maior que a forma não-carreada (COMPOLO et al., 2017). Além disso, ainda que existam opções comerciais indicados para o controle de larvas de *T. absoluta*, possivelmente não sejam adequados para controlar ovos da praga, uma vez que apenas um de 13 inseticidas testados foi capaz de causar mortalidade nos embriões (HAFSI et al., 2012).

A eficácia do uso de dsRNA sintético para controle de pragas na fase de ovo é controversa. Alguns estudos apontam a habilidade de dsRNA sintético em penetrar ovos de insetos (PAMPOLINI et al., 2020) e de inibir da eclosão de larvas (MARTIN; SCOTT, 2016), enquanto que outros não encontraram um efeito letal nos embriões (PALLIS et al., 2022) ou só foi observado algum efeito quando o dsRNA foi associado a um nanocarreador (JAIN et al., 2022).

A ineficiência de dsRNA sintético para controle de ovos pode estar relacionada ao gene-alvo escolhido para silenciamento e pela proteção do embrião pelo cório (NITNAVARE et al., 2021). Genes com altos níveis de expressão durante o desenvolvimento embrionário poderiam não ser alvos adequados para silenciamento gênico, dado a dificuldade em reduzir o acúmulo de mRNA nas células a ponto de influenciar negativamente o embrião (WANG et al., 2018; NITNAVARE et al., 2021). Embora seja suposto que o dsRNA sintético ou dsRNA nanocarreado possa penetrar o cório e atingir o embrião (PAMPOLINI et al., 2020; JAIN et al., 2022), a estrutura e

composição química do cório é altamente variável entre os insetos, o que explicaria os distintos efeitos observados da exposição de ovos de diferentes espécies ao dsRNA sintético (AL-DOSARY et al., 2010; NITNAVARE et al., 2021).

Neste contexto, foi avaliado os efeitos da exposição de ovos de *T. absoluta* ao nZ-dsRNA para controle na fase embrionária. A exposição de ovos às plantas tratadas com nZ-dsRNA (gene-alvo *AK*) na dose de 20 µg de dsRNA fez com que apenas 55% das larvas eclodissem no sexto dia, enquanto os demais tratamentos atingiram taxas de eclosão próximas de 70% (Figura 33a). Contudo, no sétimo dia, todos os tratamentos, incluindo nZ-dsAK, apresentaram taxas acumuladas de eclosão próximas de 75% (Figura 33b, 33c). Isto sugere que o tratamento com nZ-dsAK foi capaz de prolongar o desenvolvimento embrionário de *T. absoluta*.

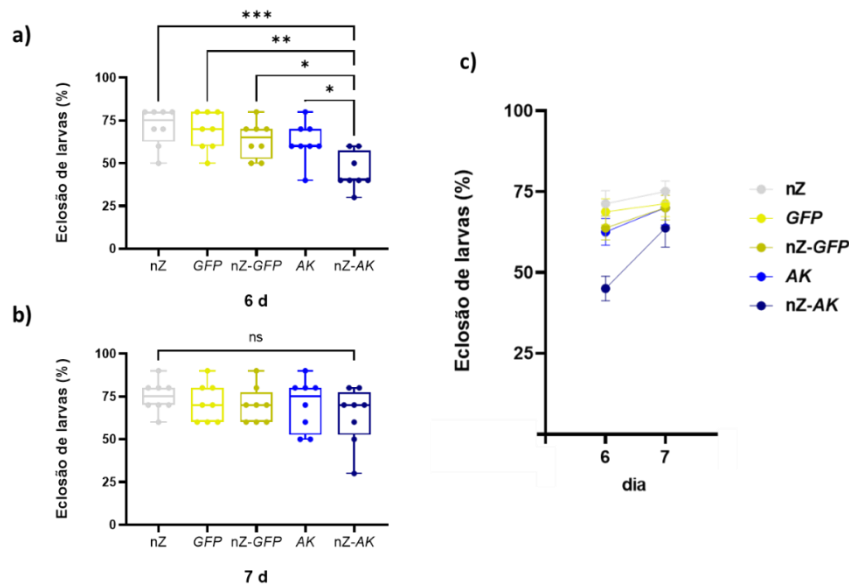


Figura 33. Eclosão de larvas de *Tuta absoluta* de ovos inoculados em plantas MT pulverizadas com nZ-dsRNA ou dsRNA após (a) 6 d, (b) 7 d e (c) 6 e 7 d ($n = 8$; análise estatística por ANOVA e teste de comparação por Dunnet entre o tratamento nZ-dsRNA e os demais grupos; * $< p = 0,5$; ** $< p = 0,1$; *** $< p = 0,05$; ns = não significativo)

Imagens de microscopia confocal revelaram a presença da fluorescência de FITC em nZ marcada em estruturas do embrião a partir da exposição dos ovos às plantas tratadas com 20 µg do nZ-FITC-dsRNA, confirmando a capacidade de penetração do nZ-dsRNA no ovo (Figura 34).

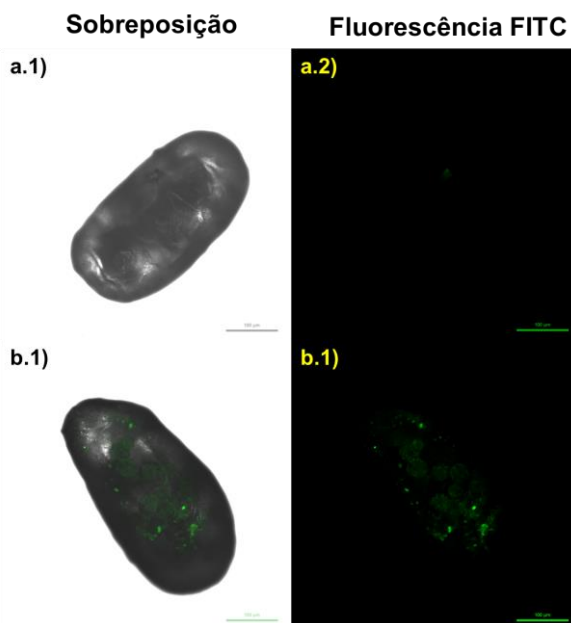


Figura 34. Ovos de *T. absoluta* cerca de 24 h após inoculação em plantas MT tratadas com **(a)** nZ-dsRNA ou **(b)** nZ-FITC-dsRNA observadas sob microscopia confocal (10x). Aumento 100x, escala 100 μm

Embora a exposição ao nZ-dsRNA não tenha sido eficaz na inibição da eclosão das larvas da traça-do-tomateiro, o suposto prolongamento do período de desenvolvimento embrionário poderia aumentar o tempo de exposição dos ovos aos parasitoides de ovos, como os do gênero *Trichogramma* spp., empregados comercialmente no controle biológico de pragas (PARRA, 2010). *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) é um parasitoide que deposita seus ovos dentro dos ovos da traça-do-tomateiro (RUBIO et al., 2022). Quando as larvas de *T. pretiosum* eclodem, elas passam a se alimentar do embrião, matando-o (RUBIO et al., 2022). Quanto mais tempo a traça-do-tomateiro permanece na fase de ovo, maior seria a oportunidade para o *T. pretiosum* parasitar o ovo, e, deste modo, o nZ-dsRNA poderia aumentar a eficiência do controle biológico de *T. absoluta* por parasitoides. Todavia, são necessários mais estudos para avaliar a eficácia do uso conjunto de biopesticidas à base de dsRNA sintético e combinação com parasitoides de ovos para controle de *T. absoluta*, assim como investigar modo de penetração de dsRNA carregado ou não-carregado nos ovos de insetos e os possíveis efeitos nos embriões.

4.3.4 Microscopia confocal de escaneamento a laser

4.3.4.1 Pulverização foliar

Diversos estudos investigaram a habilidade de penetração de plantas por ácidos nucleicos associados a nanocarreadores, bem como elucidar os mecanismos envolvidos neste processo (JAIN et al., 2022; THAGUN et al., 2022; WANG et al., 2023). Thagun et al. (2022) observaram que a pulverização de dsDNA encapsulado com diversos peptídeos penetrantes de células (*cell-penetrating peptides* – CPP) promoveu a penetração foliar em plantas de *A. thaliana*, soja ou tomateiro. As evidências indicam que os CPPs-DNA penetraram principalmente pelos estômatos da folha, com acúmulo nas câmaras subestomáticas e posterior difusão até o mesófilo foliar (THAGUN et al., 2022). No entanto, não se pode descartar a contribuição da cutícula na penetração foliar dos CPPs-DNA (THAGUN et al., 2022). Quando associados com siRNA, CPPs-siRNA foram capazes de silenciar um transgene em *A. thaliana*, indicando também sua habilidade de absorção celular (THAGUN et al., 2022). Em paralelo, nanopartículas de ouro funcionalizadas com polietilenoimina (PEI) ou nanoestruturas de DNA foram eficientes no silenciamento de transgene em *Nicotiana benthamiana* pela entrega de siRNA homólogo ao transgene (ZHANG et al., 2020; ZHANG et al., 2021).

Jain et al. (2022) constataram que a adição de surfactantes favorece a penetração foliar do dsRNA sintético ou do dsRNA-BioClay[®] em plantas de algodão, em comparação com a aplicação sem surfactante. Também demonstraram que a associação ao nanocarreador não impediu que o dsRNA alcançasse o mesófilo foliar e o feixe vascular (JAIN et al., 2022). Ademais, também foi comprovada a capacidade de penetração foliar do dsRNA associado ao *Star polycation* (SPc) em tomateiro, embora a eficiência de penetração foliar do dsRNA carregado por quitosana não tenha sido estatisticamente superior à do dsRNA não-carregado (WANG et al., 2023).

Apesar da pulverização foliar ser eficiente para entrega de ácidos nucleicos nanocarreados, essa forma de aplicação foliar pode apresentar limitações importantes. Estudos demonstraram que perdas de até 90% por deriva são comuns durante a pulverização foliar (SPADOTTO et al., 2010). A utilização de adjuvantes pode ser necessária para melhorar a eficiência da penetração (JAIN et al., 2022). DNA ou RNA nanocarreado pode ser acumulado e degradado nos tricomas (THAGUN et al., 2022). Outro fator que pode limitar a penetração de

moléculas nanocarreadas em uma planta, é a baixa densidade foliar de estômatos, uma vez que são consideradas a principal via de entrada de moléculas nanocarreadas nas folhas (THAGUN et al., 2022).

As larvas de *T. absoluta* são minadoras de folhas, alimentando-se quase que exclusivamente do mesófilo (MICHEREFF FILHO et al., 2013). A ineficácia do nZ-dsRNA em controlar a traça-do-tomateiro poderia estar relacionada a incapacidade do nZ-dsRNA em penetrar as folhas do tomateiro e atingir o mesófilo. Deste modo, as larvas não teriam ingerido o dsRNA nos experimentos descritos neste trabalho, impedindo o silenciamento gênico por RNAi. Neste contexto, foi investigada a habilidade de penetração foliar do nZ-dsRNA por meio da pulverização foliar em tomateiro MT a partir de imagens de microscopia confocal de escaneamento a laser e marcação do nZ com sonda fluorescente FITC (nZ-FITC-dsRNA).

Cerca de 24 h após a pulverização, foi possível observar a fluorescência de FITC na superfície foliar, em destaque, nos tricomas (Figura 35b.1-2). Ao ajustar o foco para as estruturas internas da folha, verificou-se a fluorescência FITC no mesófilo (Figura 35b.3-4), indicando que nZ-FITC-dsRNA foi capaz de penetrar a folha do tomateiro quando aplicado superficialmente sobre a planta.

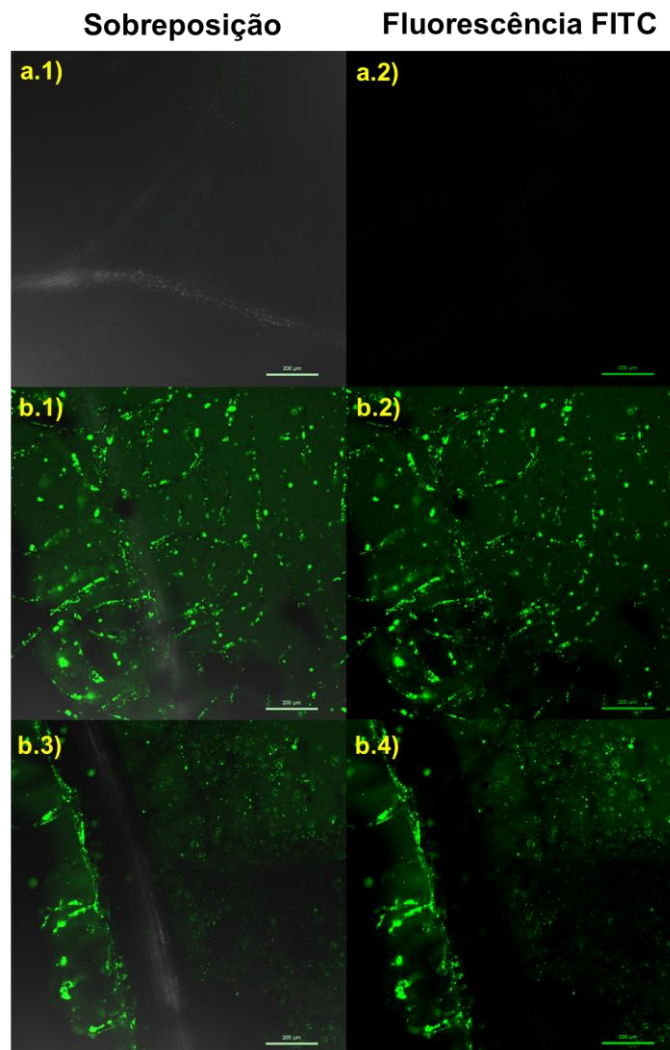


Figura 35. Microscopia confocal de folha de tomateiro “MT” cerca de 24 h após pulverização foliar de **(a)** nZ-dsRNA ou **(b)** nZ-FITC-dsRNA; **(b1-b2)** estruturas da superfície foliar e **(b3-b4)** estruturas internas da folha. Aumento 100x, escala 200 µm

Além da capacidade de nZ-dsRNA penetrar na folha, foi avaliada a ingestão em larvas de *T. absoluta*. Quando as plantas pulverizadas com nZ-FITC-dsRNA foram oferecidas às larvas da traça-do-tomateiro em 1-2^o ou 3-4^o instar foi possível observar a fluorescência de FITC em seus intestinos, confirmando a capacidade de larvas da traça-do-tomateiro em diferentes instares de ingerir o nZ-dsRNA aplicado superficialmente no tomateiro MT (Figura 36b.1-2, Figura 37b, 37c.1-4).

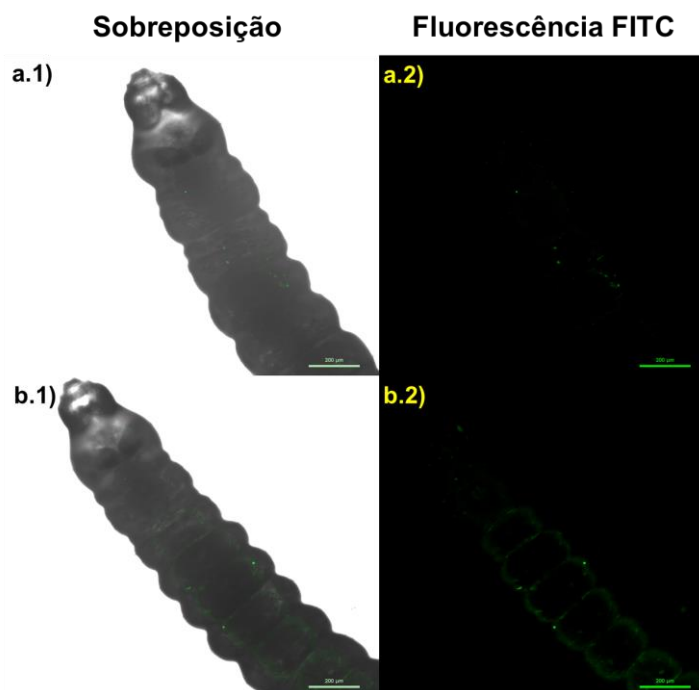


Figura 36. Larvas de *T. absoluta* em 1-2° instar após 24h de alimentação em plantas de tomateiro MT tratadas com (a) nZ-dsRNA ou (b) nZ-FITC-dsRNA por microscopia confocal. Aumento 100x, escala 200 µm

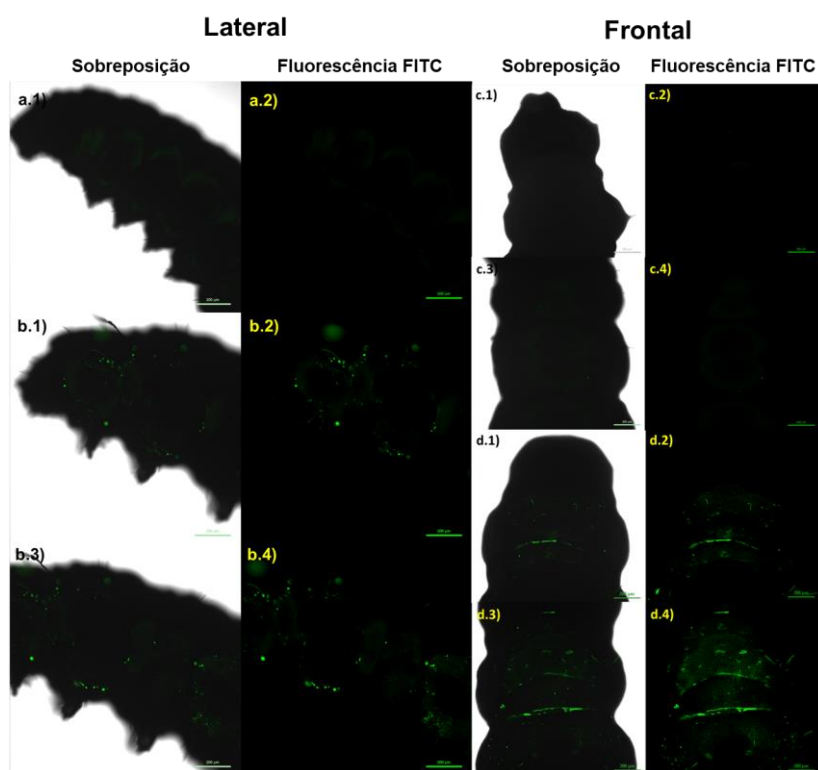


Figura 37. Observação lateral ou frontal de larvas de *T. absoluta* em 3-4° instar após 24h de alimentação em plantas MT tratadas com (a1-2; c1-4) nZ-dsRNA ou (b1-4; d1-4) nZ-FITC-dsRNA por microscopia confocal. Aumento 100x, escala 200 µm

Deste modo, a análise conjunta das imagens de microscopia confocal das folhas e das larvas permitem descartar que a ineficácia do nZ-dsRNA no controle de *T. absoluta* teria sido pela incapacidade do nZ-dsRNA em penetrar na folha de tomateiro MT e em ser ingerido pelas larvas.

Por fim, foi possível detectar a fluorescência de FITC em fezes de larvas alimentadas com nZ-FITC-dsRNA, indicando a excreção do nZ-dsRNA pelas larvas (Figura 38). Esse resultado pode sugerir que o nZ não seja degradado nem metabolizado pelas células intestinais do inseto, o que pode impedir a liberação do dsRNA sintético e, conseqüentemente, o silenciamento gênico. Todavia, um estudo realizado por Monteiro et al. (2021) também detectou a presença do nZ-FITC em associação com compostos botânicos com propriedades inseticidas nas fezes de *S. frugiperda*. No entanto, quando o composto botânico foi encapsulado em nZ, observou-se um aumento da mortalidade larval, ao contrário do que foi observado em nosso estudo.

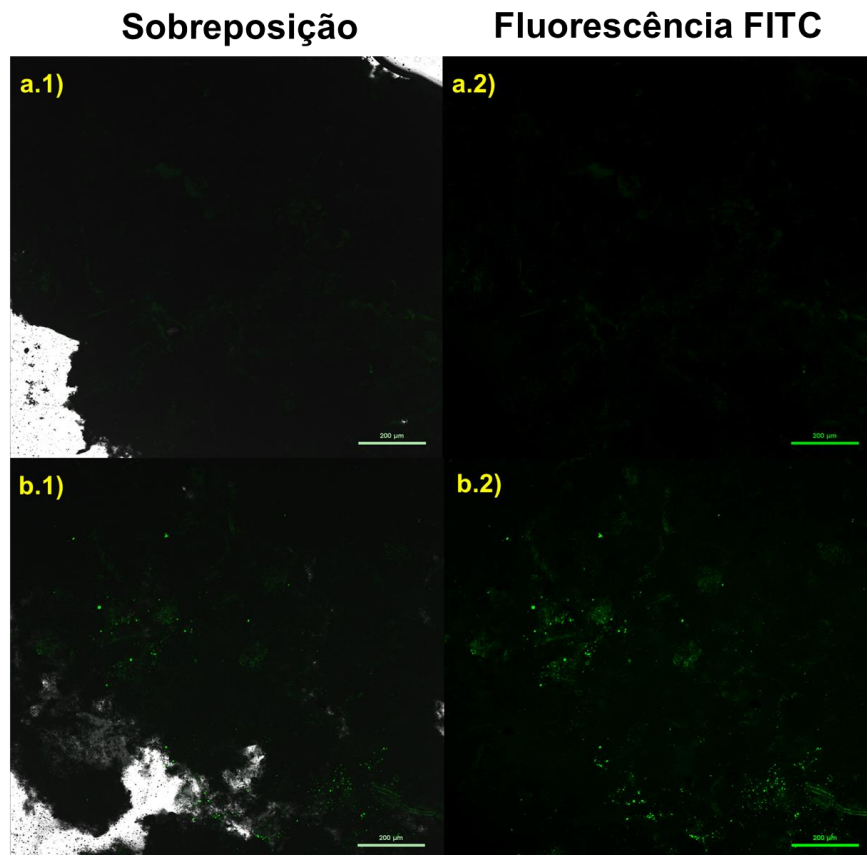


Figura 38. Microscopia confocal de fezes de larvas de *T. absoluta* em 3-4º instar após 24h de alimentação em plantas MT tratadas com (a1-2) nZ-dsRNA ou (b1-2) nZ-FITC-dsRNA. Aumento 100x, escala 200 µm

4.3.4.2 Absorção radicular

A capacidade de absorção radicular e translocação de nanoestruturas em plantas têm sido alvo de estudos nas últimas décadas (SCHWAB et al., 2016). A interação de nanoestruturas carbônicas ou inorgânicas com plantas tem sido mais investigada em razão de seus efeitos mais conhecidos, tais como o estímulo ao crescimento radicular, ganho de biomassa ou atenuação do estresse abiótico ou biótico (ADREES et al., 2022; DA CRUZ et al., 2019). No entanto, a exposição de plantas a estes tipos de nanomateriais está relacionada à inibição da atividade de enzimas desintoxicantes, à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio e à liberação de íons metálicos, indicando reações a toxicidade às plantas (ZHANG et al., 2018). Por outro lado, a interação das plantas com nanoestruturas orgânicas, em destaque, as poliméricas, como os nZ, que supostamente apresentam menor toxicidade, é pouco estudada (PRASAD et al., 2017).

Como alternativa à pulverização foliar, foi avaliada a capacidade de absorção radicular e translocação do nZ-dsRNA em tomateiro MT e ingestão das plantas por larvas de *T. absoluta*. A marcação do nZ com FITC permitiu a observação dos tecidos de tomateiro MT e larvas de *T. absoluta* expostos ao nZ-FITC-dsRNA por microscopia confocal de escaneamento a laser. Plantas e larvas tratadas com nZ-dsRNA não-marcado foram utilizadas como controle.

Após 2 dias de exposição via radicular do nZ-FITC-dsRNA, foi observada a fluorescência de FITC nos tecidos internos das raízes e do caule de tomateiro MT (Figura 39b.1-4), indicando que nZ-dsRNA possui a habilidade de penetrar as raízes do tomateiro MT. No entanto, não foi detectada a fluorescência no pecíolo ou nas folhas (Figura 39b.5-8). Também não foi observada a fluorescência de FITC nas amostras do grupo controle (Figura 39a.1-8).

Após 4 dias, foi possível observar a fluorescência de FITC em todos os tecidos de tomateiro, incluindo o pecíolo e as folhas (Figura 40b.1-8). Observou-se também a fluorescência de FITC na superfície da parede externa das raízes, possivelmente devido a adesão do nZ-dsRNA aos exsudados e mucilagem das raízes. Além disso, é possível ver com maior nitidez as estruturas dos vasos xilemáticos no caule e no pecíolo, de modo que poderia ser suposto o acúmulo do nZ-dsRNA nos vasos condutores do xilema (Figura 40b.3-4).

A exposição por 8 dias do nZ-FITC-dsRNA nos permitiu detectar a fluorescência de FITC em todas as amostras de tomateiro MT (Figura 42b.1-6), enquanto que não foi possível observar sinais de fluorescência no grupo-controle (Figura 41a.1-4, Figura 42a.1-6). As amostras vegetais após tratamento por 8 dias permitiram a observação das estruturas radiculares com maior nitidez (Figura 41b.1-2), possivelmente em razão do acúmulo do nZ-FITC-dsRNA pelo tecido após prolongada exposição. Além do mais, é possível observar que a fluorescência de FITC concentra-se ao redor das células vegetais (Figura 41b.3-4). Esta evidência nos permitiria supor que o transporte celular do nZ-dsRNA é via apoplasto, com baixo nível de internalização celular.

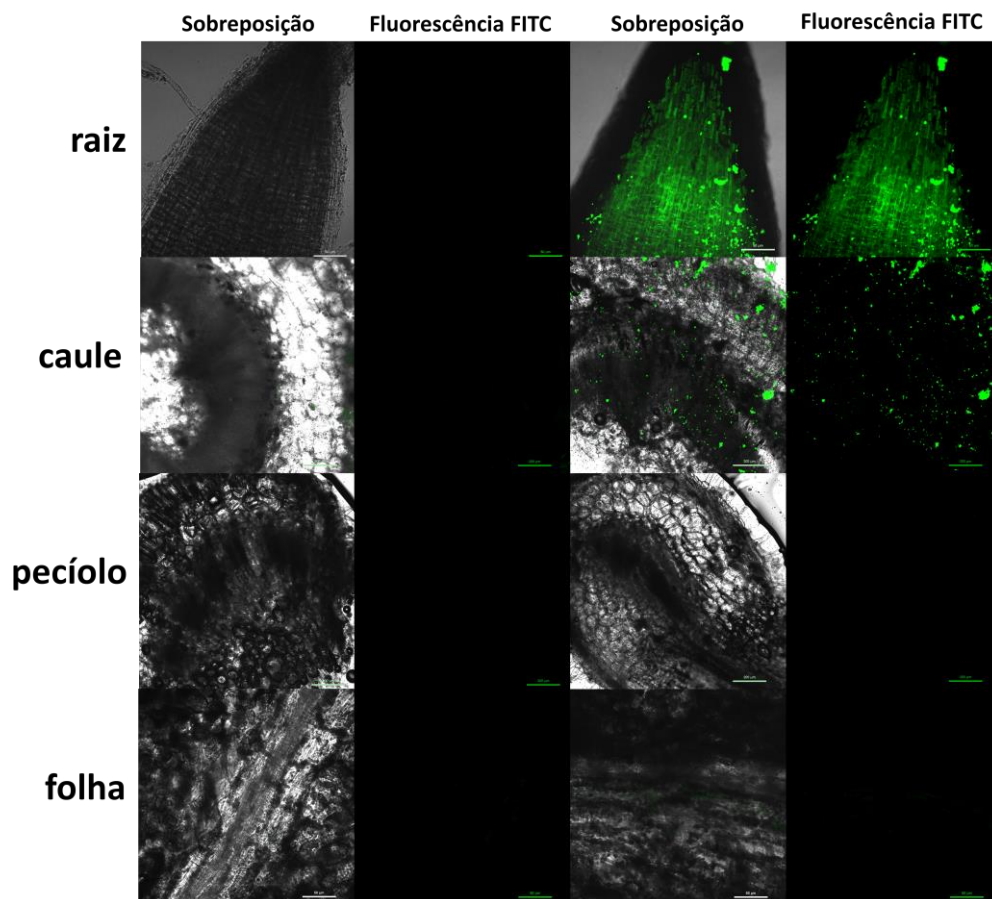


Figura 39. Microscopia confocal de (1-2) raízes, (3-4) caules, (5-6) pecíolos ou (7-8) folhas de tomateiro MT de 2 semanas tratadas por 2 d com (a) nZ-dsRNA ou (b) nZ-FITC-dsRNA via absorção radicular. (1 e 2) aumento de 400x, escala 50 μ m ou (3-8) aumento de 100x, escala 100 μ m

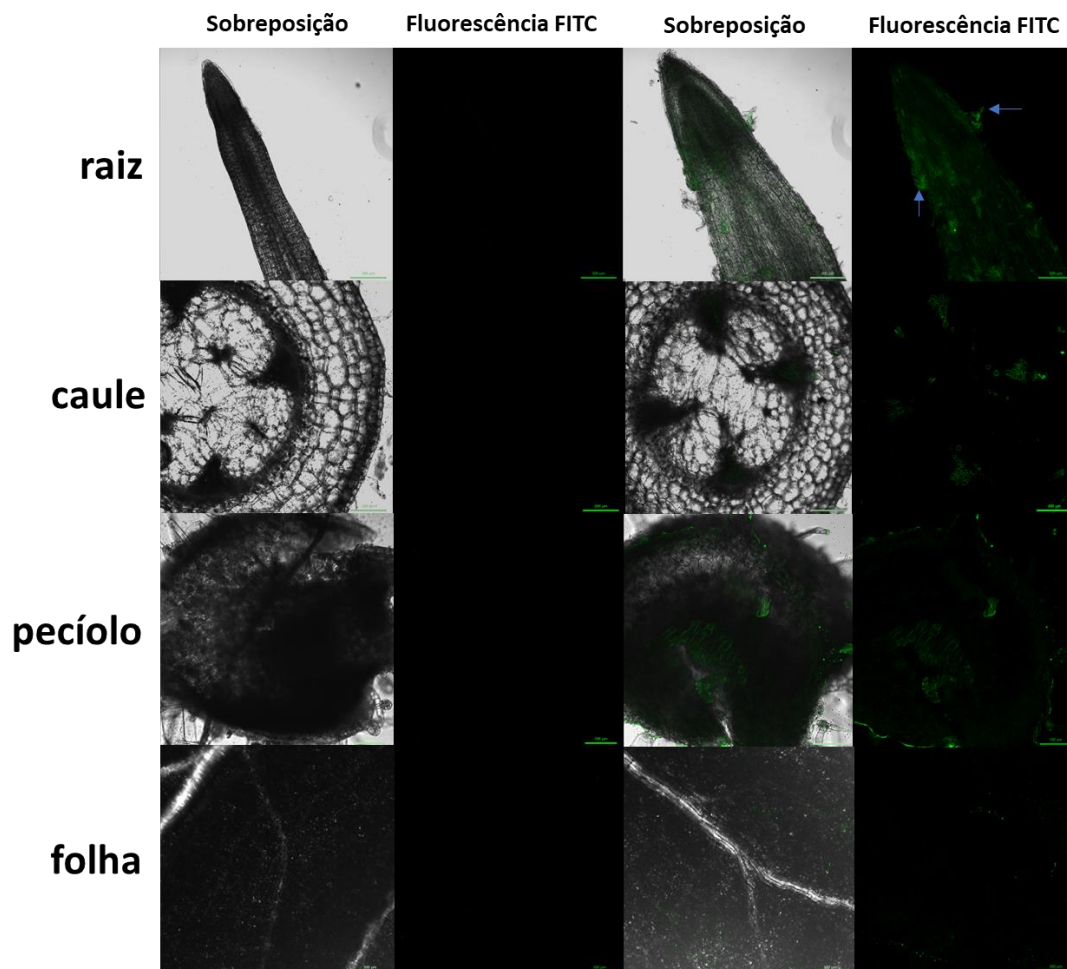


Figura 40. Microscopia confocal de (1-2) raízes, (3-4) caules, (5-6) pecíolos ou (7-8) folhas de plantas de tomateiro MT de 2 semanas após 4 d de tratamento com (a) nZ-dsRNA ou (b) nZ-FITC-dsRNA via absorção radicular. Setas azuis apontam possível acúmulo do nZ-dsRNA em mucilagem ou exsudados das raízes. Aumento de 100x, escala 100 μ m

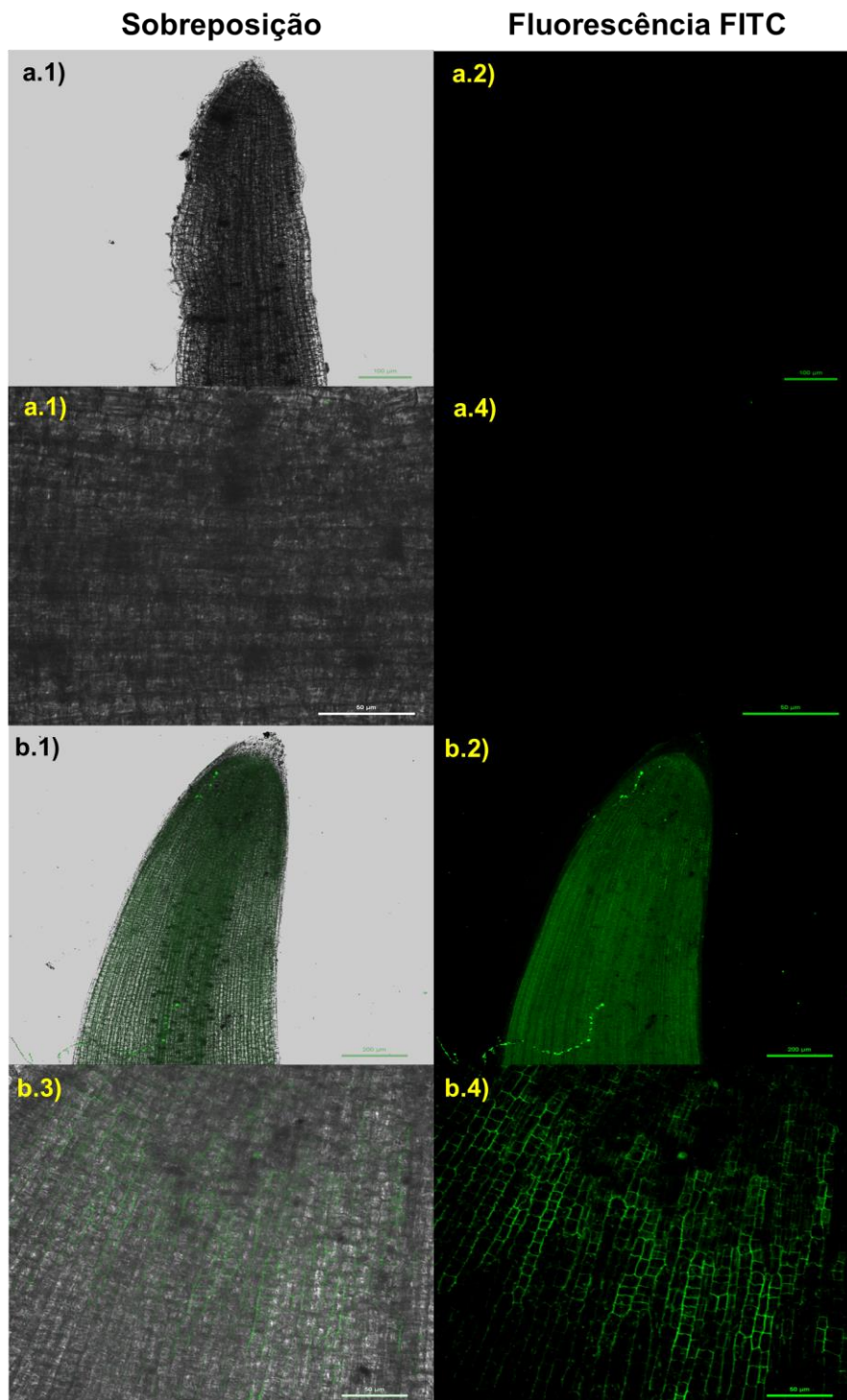


Figura 41. Microscopia confocal da raiz de tomateiro MT de 2 semanas tratado com nZ-FITC-dsRNA via absorção radicular por 8 d. Planta de tomateiro MT (a) controle ou (b) tratado com nZ-FITC-dsRNA; (1-2) aumento 100x, escala 200 µm e (3-4) aumento 400x, escala 50 µm

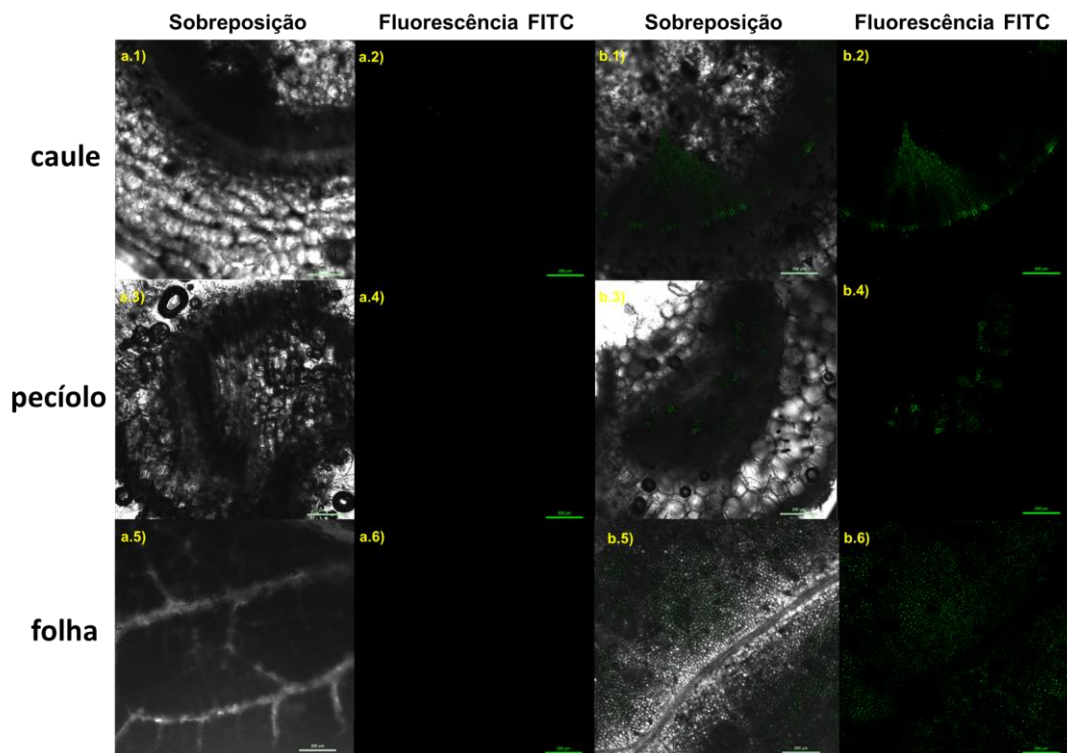


Figura 42. Microscopia confocal da suposta translocação do nZ-FITC-dsRNA em planta de tomateiro MT após 8 d via absorção radicular. Observação de (1-2) caule, (3-4) pecíolo ou (5-6) folha de tomateiro MT tratado com (a) nZ-dsRNA ou (b) nZ-FITC-dsRNA. Aumento 100x, escala 200 μ m

Já havia sido verificada a capacidade de absorção radicular e translocação do nZ em plantas de cana-de-açúcar (PRASAD et al., 2017) e soja (RISTROPH et al., 2017). Nos ensaios com cana, apenas duas horas foram suficientes para que as plantas absorvessem e translocassem o nZ-FITC para as folhas, com aumento progressivo da fluorescência em função do tempo de exposição (PRASAD et al., 2017). Nos ensaios com soja, foi possível detectar a fluorescência de FITC nas estruturas internas das raízes após 1 h, com aumento significativo até 24 h e atingindo o equilíbrio a partir de 48 h, enquanto que foi possível detectar nZ nas folhas logo na primeira avaliação, no segundo dia (RISTROPH et al., 2017). Nossos resultados indicam que a detecção da fluorescência de FITC nas folhas no quarto dia, com aumento da fluorescência no oitavo dia, seria uma evidência da capacidade do tomateiro MT em translocar nZ-FITC-dsRNA para as folhas. A mais rápida absorção e translocação do nZ em soja ou cana pode estar relacionada, principalmente, às concentrações do nZ-FITC testadas. Nos ensaios de cana e soja, foram utilizadas soluções do nZ-FITC 3.000 e 6.000 vezes mais concentradas que à testada por nosso grupo. Além disso, outros fatores podem influenciar na habilidade de absorção radicular e translocação de nanoestruturas em plantas, com as propriedades do

nanomaterial e pelas diferenças morfofisiológicas entre as espécies vegetais (RISTROPH et al., 2017).

O tamanho médio das nanoestruturas é uma das propriedades mais influentes na penetração em raízes (LIN et al., 2009; ZHU et al., 2012). Nanoestruturas de menor tamanho poderiam entrar pelos poros das raízes, cujo o diâmetro médio é de 5 a 20 nm (NAIR et al., 2010). Em contrapartida, nanoestruturas maiores poderiam penetrar as raízes pela via de entrada *crack* (*crack-entry pathway*) (LI et al., 2020), também utilizada por bactérias simbiontes para infectar às raízes de leguminosas (SHARMA et al., 2020). Outras vias possíveis de penetração de nanoestruturas em raízes são o tecido meristemático apical na ponta das raízes, onde a porosidade é alta devido à divisão celular (ZHU et al., 2012), e por lesões ou ranhuras no tecido radicular (SCHWAB et al., 2016). Em razão do tamanho médio próximo de 200 nm, nZ-dsRNA mais provavelmente teria penetrado nas raízes pela via *crack-entry*, contudo, mais estudos devem ser conduzidos para entender a via de penetração do nZ-dsRNA em tomateiro MT.

A carga elétrica da superfície das nanoestruturas também exerceria influência na absorção radicular (ZHU et al., 2012; LI et al., 2016). Estudos indicam que nanocarreadores com carga positiva seriam mais facilmente absorvidos pelas raízes em razão da maior afinidade com a parede celular vegetal de carga negativa por causa da abundância de polissacarídeos aniônicos (MEYCHIK; YERMAKOV, 2001; ZHU et al., 2012).

Evidências indicam que o processo de transporte pela parede celular é também influenciado pelo tamanho e carga elétrica das nanoestruturas (SCHWAB et al., 2016). De modo geral, a absorção por endocitose dependente de clatrina ocorre com nanoestruturas com até 120 nm, o tamanho médio das vesículas endocíticas (SCHWAB et al., 2016). Por outro lado, nanoestruturas com tamanho médio entre 200 e 500 nm seriam transportados por endocitose independente de clatrina (SCHWAB et al., 2016). Enquanto isso, nanomateriais de carga positiva teriam maior afinidade com a membrana vesicular negativa e, deste modo, maior eficiência no transporte (ONELLI et al., 2008). Além disso, vias não-endocíticas poderiam estar associadas ao transporte de nanoestruturas solúveis em água e com até 1 nm, como mediada por aquaporinas (RICO et al., 2011). Com base no tamanho médio do nZ-dsRNA estimado em 180 nm, seria mais provável que a endocitose independente de clatrina esteja relacionada a absorção celular. Por outro lado, não se pode descartar que existam

transportadores transmembranas específicos nas células de tomateiro MT que poderiam estar associados com a absorção celular do nZ e mais estudos devem ser conduzidos para confirmação da presença destes transportadores nas raízes de tomatesiros.

Uma vez que as nanoestruturas ultrapassam a parede celular, elas podem se espalhar pelo apoplasto ou simplasto até alcançar os vasos condutores (ZHU et al., 2012). Diversos estudos demonstraram que o transporte de nanoestruturas entre células ocorre principalmente via apoplasto, uma vez que esta forma de passagem não requer internalização endocítica e é menos afetada pelo tamanho das nanoestruturas (AVELLAN et al., 2018; SCHWAB et al., 2016; ZHU et al., 2012). No entanto, a difusão de nanomateriais com carga positiva poderia ser dificultada devido ao acúmulo em razão da interação com a parede celular de carga negativa (LIN et al., 2009; AVELLAN et al., 2018).

Além disso, a movimentação de nanoestruturas via simplasto é limitada devido ao diâmetro dos plasmodesmos (15-40 nm ou 900 Da), o que tornaria difícil a passagem de nanoestruturas maiores (ZHAI et al., 2014). No entanto, sabe-se que em determinadas condições, como na presença de cálcio, em situações de estresse ou durante infecções virais, os plasmodesmos podem se expandir e permitir a passagem de moléculas de até 40 kDa (DIERZ; HERTHE, 2011; ROBERTS; OPARKA, 2003; SCHOLTHOF et al., 2005). Ainda não está claro se as nanoestruturas têm a capacidade de modular a expansão da abertura dos plasmodesmos, embora tenha sido observado que nanopartículas de óxido de titânio (>40nm) foram transportadas pelo simplasto em células das raízes de trigo (LARUE et al., 2012). O tamanho médio do nZ-dsAK muito maior que 40 nm e as imagens de microscopia confocal que revelaram maior intensidade de fluorescência no entorno das células (Figura 41b.4), sugerindo que a distribuição do nZ-dsRNA pelas células das raízes possa ocorrer via apoplasto.

Ao atingir os vasos xilemáticos, os fenômenos de transpiração e capilaridade estariam associados a movimentação das nanoestruturas até as folhas (HU; LI, 2022; SCHWAB et al., 2016). A distribuição das nanoestruturas pelos elementos dos vasos não seria limitada pelo tamanho pois o diâmetro desses vasos é maior do que o diâmetro de nanoestruturas (até 500 nm) (MORAES et al., 2022). Com isso, as nanoestruturas poderiam se mover pelos elementos dos vasos e serem distribuídas até as folhas (HU; LI, 2022). No entanto, nanomateriais de carga positiva poderiam

ficar aderidos às estruturas dos vasos xilemáticos, o que poderia dificultar ou impedir sua movimentação pela planta (ZHU et al., 2012). Ao considerarmos a carga elétrica do nZ-dsRNA igual a +16 mV poderíamos relacionar a ausência de fluorescência nas amostras de pecíolos e folhas no segundo dia, mas a presença de fluorescência no quarto e oitavo dia, devido à dificuldade de movimentação do nZ-dsRNA com carga positiva pela planta.

Além das propriedades dos nanomateriais, determinadas características morfológicas ou fisiológicas poderiam facilitar a absorção radicular e o movimento das nanoestruturas nas plantas (ZHU et al., 2012; WU; LI, 2022). Como exemplos, plantas com raízes mais longas e, por isso, com maior área radicular, teriam maior habilidade de captar nanoestruturas (ZHU et al., 2012). Além disso, a densidade de plasmodesmos nas células é variável entre as espécies vegetais (ROBARDS et al., 1975). Ademais, plantas dicotiledôneas, que apresentam taxa de transpiração mais elevada que monocotiledôneas, poderiam transportar nanoestruturas para as folhas com maior eficiência (WU; LI, 2022).

Por fim, ao oferecermos as plantas de tomateiro MT que absorveram o nZ-FITC-dsRNA pelas raízes por oito dias às larvas de *T. absoluta*, é possível detectar a fluorescência de FITC no intestino delas (Figura 43a-b). Isso confirma a habilidade de ingestão pelas larvas do nZ-dsRNA absorvido pelas raízes e translocado em plantas de tomateiro MT.

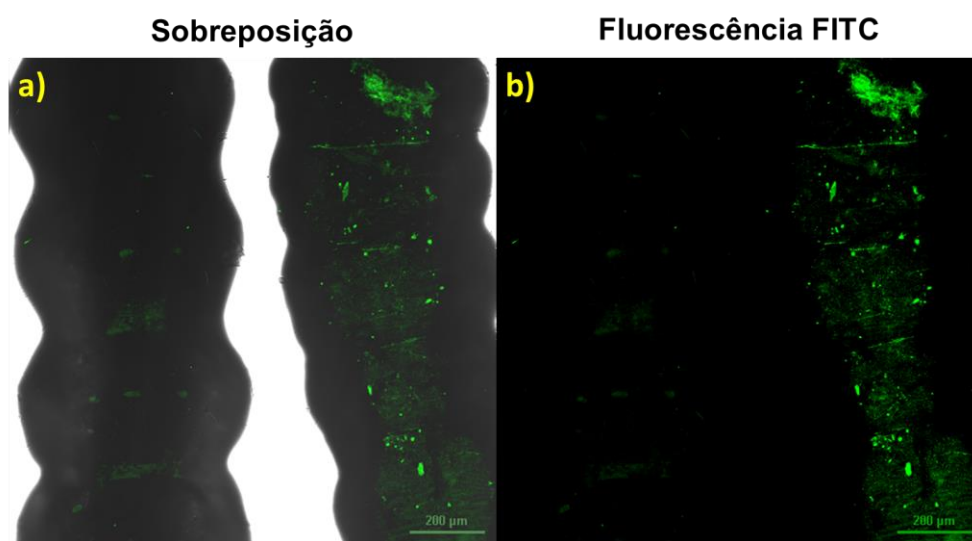


Figura 43. Microscopia confocal de larvas de *T. absoluta* alimentadas com plantas de tomateiro MT tratadas por 8 d com nZ-dsRNA (esquerda) ou nZ-FITC-dsRNA (direita) via absorção radicular. Imagem em (a) RGB (Red, Green, Blue) ou (b) filtro de FITC (λ igual à 495 nm/521 nm). Aumento 100x, escala 200 μ m

Sondas fluorescentes são amplamente utilizadas em estudos de absorção e distribuição de nanomateriais em plantas, bem como em estudos de ingestão por insetos (JAIN et al., 2022; ZHANG et al., 2022). Entretanto, a estabilidade da ligação entre o nanomaterial e a sonda é uma limitação que pode comprometer a precisão dos resultados obtidos (AVELLAN et al., 2018). Caso esta ligação não seja estável, a fluorescência detectada pode não corresponder à posição real da nanoestrutura no tecido vegetal ou animal (AVELLAN et al., 2018).

RISTROPH et al. (2017) estudaram a estabilidade da ligação entre FITC e nZ e concluíram que a ligação é estável por até 10 dias. Entretanto, outras técnicas, como a microscopia eletrônica de varredura ou difração de raios-X, podem ser empregadas em conjunto com a microscopia confocal de escaneamento à laser para minimizar essa limitação (AVELLAN et al., 2018; MALATESTA et al., 2021).

4.3.5 Toxicidade de zeína ao tomateiro MT

As potenciais aplicações de nanomateriais na agricultura, tais como a nutrição ou proteção de plantas, bem como a remediação e recuperação de solos, podem aumentar a exposição de nanoestruturas ao meio ambiente (ADREES et al., 2022; DUTTA et al., 2022; KORPAYEV et al., 2021). Por essa razão, a segurança dos nanomateriais às plantas tem sido alvo de investigação (BUNDSCHUH et al., 2018).

Embora a toxicidade de nanoestruturas metálicas ou carbônicas seja constantemente estudada, há poucas informações sobre os efeitos adversos da exposição de plantas a nanomateriais poliméricos, em especial ao nZ (ASLI; NEUMANN; 2009; BENELLI, 2018; DIETZ; HERTH, 2011). Alguns estudos demonstraram que nZ associados à óleos essenciais não apresentam toxicidade para sementes ou plantas de feijão, sugerindo que o uso do nZ pode ser seguro para o cultivo de plantas (DE OLIVEIRA et al., 2018; MONTEIRO et al., 2021; PASCOLI et al., 2020). Enquanto isso, a zeína utilizada para confecção de bioembalagens para o armazenamento de frutos de tomate pós-colheita não apenas manteve a qualidade, mas também impediu o amadurecimento precoce dos frutos, prolongando o tempo de prateleira (ZAPATA et al., 2008).

No entanto, não há informações acerca da segurança da exposição radicular de plantas ao nZ e sua toxicidade. Neste contexto, com objetivo de avaliar a toxicidade de nZ via absorção radicular em tomateiros MT, expusemos plantas de MT

de 2 semanas em suspensões do nZ (2 ou 4 μg) por 12 dias. Plantas também foram expostas a um outro tipo de proteína, a caseína.

Ao avaliar o crescimento das partes radiculares e aéreas, bem como o engrossamento do caule das plantas tratadas com nZ, observamos uma redução significativa no comprimento das raízes tratadas, com maiores prejuízos às plantas submetidas à maior dose do nZ (Figura 44a). No entanto, também constatamos diferenças estatísticas na variação do comprimento das plantas tratadas com caseína (Figura 44a). Ao compararmos o crescimento da parte aérea das plantas, notamos uma diferença significativa entre as plantas tratadas com a maior e a menor dose do nZ, embora os resultados tenham sido estatisticamente semelhantes aos tratamentos com água ou caseína (Figura 44b). Por outro lado, não foi observada diferença estatística na largura dos caules após 12 d de tratamento com nZ (Figura 44c). Por fim, constatamos que as plantas tratadas com a maior dose de nZ apresentaram folhas cloróticas e queda dos cotilédones, enquanto tanto a maior quanto a menor dose do nZ propiciaram o apodrecimento das raízes (Figura 45).

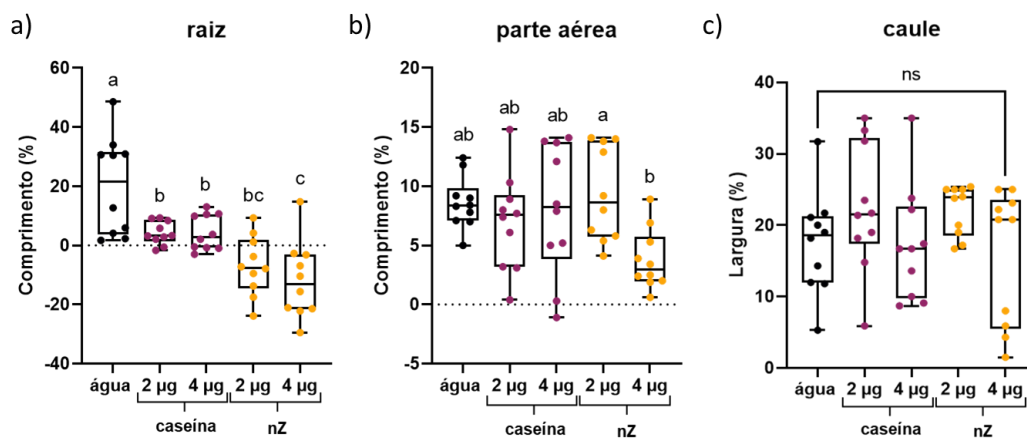


Figura 44. Efeitos da exposição do nZ via radicular na variação, em porcentagem, do comprimento **(a)** das raízes, **(b)** da parte aérea e **(c)** da largura do caule em plantas de tomateiro MT por 12 d. ($n = 10$; análise estatística por ANOVA e teste de comparações múltiplas por Tukey; letras iguais indicam que as médias não diferiram entre si; ns = não significativo)



Figura 45. Toxidez do nZ em tomateiro MT de 2 semanas após 12 d de exposição via radicular. Tratamento com **(A)** água, **(B)** 2 µg ou **(C)** 4 µg de caseína, **(D)** 2 µg ou **(E)** 4µ do nZ. Setas vermelhas apontam clorose nas folhas; setas azuis indicam apodrecimento do coleto.

Com base nos resultados da exposição de tomateiros a nZ, podemos sugerir que os nanocarreadores de zeína teriam um efeito tóxico direto sobre as plantas. A exposição de nanopartículas às plantas pelas raízes costuma estar associada à obstrução dos poros radiculares, a alterações no fluxo de nutrientes e água nas plantas, à formação excessiva de espécies reativas de oxigênio ou à modulação da expressão gênica (VERMA et al., 2021).

Por outro lado, as leituras indicaram maior absorvância em 600 nm nas amostras de nZ, enquanto as amostras de caseína não apresentaram diferença estatística em relação à água (Figura 46). O valor da absorvância em 600 nm é uma medida indireta da concentração bacteriana numa suspensão, portanto, os resultados sugerem que o tratamento com nZ poderia ter promovido maior crescimento de bactérias do que a caseína e a água. Assim, a toxicidade observada nas plantas pode ter sido causada por metabólitos secundários produzidos por microrganismos durante fermentação do nZ (VERBEKE et al., 2015; U et al., 2021).

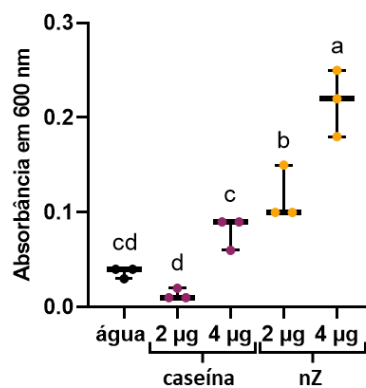


Figura 46. Absorbância em 600 nm de suspensões do nZ após 12 d de contato com as raízes de tomateiro MT; ($n = 3$; análise estatística por ANOVA e teste de comparações múltiplas por Tukey; letras iguais indicam que as médias não diferiram entre si)

No entanto, é importante destacar que mais estudos devem ser conduzidos para entender completamente a causa da toxidez em plantas expostas a nZ, bem como para identificar quaisquer efeitos indesejáveis que possam estar associados à aplicação do nZ em culturas agrícolas a fim de estabelecer limites seguros de exposição para evitar riscos potenciais.

4.4 Conclusão

Este estudo forneceu evidências de que o dsRNA sintético pode se ligar ao nanocarreador nZ com alta eficiência por meio de interações eletrostáticas, conforme observado pelo aumento na eletronegatividade do nZ-dsRNA. Foi observado um aumento no tamanho médio das nanoestruturas formadas com o aumento da concentração de dsRNA sintético utilizado para encapsulamento, o que pode estar relacionado ao agregamento dos coloides entre si. A exposição de nZ-dsRNA à proteinase K foi capaz de degradar o nZ e liberar o dsRNA, o que evidencia que o dsRNA permaneceu íntegro e o processo de encapsulamento pode não ter degradado o dsRNA sintético.

Apesar de o uso de nZ-dsRNA tenha sido ineficaz no controle de larvas de *T. absoluta* comparado ao dsRNA sintético, há potencial de uso vantajoso do nZ-dsRNA no controle da traça-do-tomateiro na fase de ovo. Embora não tenha inibido a eclosão de larvas, o dsRNA nanocarreado prolongou o desenvolvimento embrionário, o que poderia aumentar o tempo de exposição dos ovos a parasitoides de ovos como *T. pretiosum* e aumentar presumidamente a eficiência do controle biológico.

As imagens de microscopia confocal de escaneamento a laser confirmaram a capacidade de nZ-dsRNA em penetrar em folhas de tomateiro MT ou ovos de *T. absoluta*, além de confirmarem que larvas em diversos instares são capazes de ingerir e excretar o nZ-dsRNA pulverizado sobre as plantas. O nZ-dsRNA também foi absorvido pelas raízes do tomateiro MT e translocado através do xilema para as folhas. A presença de fluorescência de FITC ao redor das células vegetais sugere que o transporte celular do nZ-dsRNA ocorre principalmente pelo apoplasto.

A aplicação radicular do dsRNA nanocarreado pode ser uma alternativa para o controle de traça-do-tomateiro, embora a exposição radicular de tomateiros ao nZ tenha resultado em efeitos adversos, como redução do comprimento das raízes, apodrecimento das raízes e folhas cloróticas. As leituras também indicaram maior crescimento bacteriano nas amostras de nZ, o que pode ter contribuído para a toxicidade observada nas plantas. Portanto, é importante considerar a segurança do uso de nanocarreadores de zeína na agricultura antes de sua ampla aplicação.

Referências

ABDELSALAM, A. M. Et al. Surface-tailored zein nanoparticles: strategies and applications. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 9, p. 1354, 2021.

ADREES, M. et al. Foliar spray of silicon nanoparticles improved the growth and minimized cadmium (Cd) in wheat under combined Cd and water-limited stress. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 29, n. 51, p. 77321-77332, 2022.

AL-DOSARY, M. M.; AL-BEKAIRI, A. M., MOURSY, E. B. Morphology of the egg shell and the developing embryo of the Red Palm Weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Oliver). **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 17, n. 2, p. 177-183, 2010.

ALVES, R. R. et al. Ovicidal lectins from *Moringa oleifera* and *Myracrodruon urundeuva* cause alterations in chorionic surface and penetrate the embryos of *Aedes aegypti* eggs. **Pest Management Science**, v. 76, n. 2, p. 730-736, 2020.

ANDERSON, T. J.; LAMSAL, B. P. Zein Extraction from Corn, Corn Products, and Coproducts and Modifications for Various Applications: A Review. **Cereal Chemistry Journal**, v. 88, n. 2, p. 159–173, 2011.

ARTAL, M. C. et al. Transcriptome analysis in *Parhyale hawaiiensis* reveal sex-specific responses to AgNP and AgCl exposure. **Environmental Pollution**, v. 260, art. 113963, 2020.

AVELLAN, A. et al. Nanoparticle size and coating chemistry control foliar uptake pathways, translocation, and leaf-to-rhizosphere transport in wheat. **ACS Nano**, v. 13, n. 5, p. 5291–305, 2019.

AVELLAN, A. et al. Nanoparticle uptake in plants: gold nanomaterial localized in roots of *Arabidopsis thaliana* by X-Ray computed nanotomography and hyperspectral imaging. **Environmental Science and Technology**, v. 51, p. 8692-8691, 2018.

BELAL, R.; GAD, A. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative stress, genotoxicity, and apoptosis in the hemocytes of *Bombyx mori* larvae. **Scientific Reports**, v. 13, art. 3520, 2023.

BENELLI, G. Mode of action of nanoparticles against insects. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 25, n. 13, p. 12329-12341, 2018.

BUNDSCHUH, M. et al. Nanoparticles in the environment: where do we come from, where do we go to?. **Environmental Sciences Europe**, v. 30, art. 6, 2018.

CAMARA, M. C. et al. Development of stimuli-responsive nano-based pesticides: emerging opportunities for agriculture. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 17, art. 100, 2019.

CAMPBELL, B.; PEREIRA, R.; KOEHLER, K. Complications with controlling insect eggs. In: TRDAN, S. (ed.). **Insecticides resistance**. 1. ed. Rijeka, Croacia: InTech, 2016. chap 5.

CAMPOLO, O. et al. Citrus peel essential oil nanoformulations to control the tomato borer, *Tuta absoluta*: chemical properties and biological activity. **Scientific Reports**, v. 7, art. 13036, 2017.

CHANDRA, S. et al. Chitosan nanoparticles: A positive modulator of innate immune responses in plants. **Scientific Reports**, v. 5, art. 15195, 2015.

CHEN, Y. et al. Fabrication of zein-based hydrophilic nanoparticles for efficient gene delivery by layer-by-layer assembly. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 217, p. 381-397, 2022.

CHERIF, A. et al. Lethal effects of nano and commercial formulations of abamectin on *Tuta absoluta* (Meyrick) and its mirid predators *Macrolophus pygmaeus* and *Nesidiocoris tenuis*. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 42, n. 3, p. 2183-2193, 2022.

DA CRUZ, T. N. M. et al. A new glance on root-to-shoot in vivo zinc transport and time-dependent physiological effects of ZnSO₄ and ZnO nanoparticles on plants. **Scientific Reports**, v. 9, art. 10416, 2019.

DANAEI, M. et al. Impact of particle size and Polydispersity Index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, art. 57, 2018.

DE VRIES, A. et al. Natural amphiphilic proteins as tri-block Janus particles: self-sorting into thermo-responsive gels. **Europhysics Letters**, v. 107, art. 58003, 2014.

DESNEUX, N. et al. Integrated pest management of *Tuta absoluta*: practical implementations across different world regions. **Journal of Pest Science**, v. 95, n. 1, p. 17-39, 2021.

DIETZ, K.; HERTH, S. Plant nanotoxicology. **Trends in Plant Science**, v. 16 p. 582–589, 2011.

DONG, F. et al. Doxorubicin-loaded biodegradable self-assembly zein nanoparticle and its anti-cancer effect: Preparation, in vitro evaluation, and cellular uptake. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 140, p. 324-331, 2016.

GALLARATE, M. et al. Peptide-loaded solid lipid nanoparticles prepared through coacervation technique. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2011, p. 1-6, 2011.

GARCÍA-SÁNCHEZ, S. et al., Early response to nanoparticles in the Arabidopsis transcriptome compromises plant defence and root-hair development through salicylic acid signalling. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, art. 341, 2015.

GERMANO-COSTA, T. et al. Use of 2D and co-culture cell models to assess the toxicity of zein nanoparticles loading insect repellents icaridin and geraniol. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 216, art. 112564, 2022.

GERMANO-COSTA, T. et al. Use of 2D and co-culture cell models to assess the toxicity of zein nanoparticles loading insect repellents icaridin and geraniol. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 216, art. 112564, 2022.

GONZÁLEZ-GRANDÍO, E. Carbon nanotube biocompatibility in plants is determined by their surface chemistry. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 19, n. 1, p. 431-431, 2021.

GUAN, R. et al. Advances in the development of microbial double-stranded RNA production systems for application of RNA Interference in agricultural pest control. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, art. 753790, 2021.

HAFSI, A. et al. Response of the tomato miner *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) to thirteen insecticides in semi-natural conditions in Tunisia. **EPPO Bulletin**, v. 42, n. 2, p. 312–316, 2012.

HAMDANI, S. et al. Zein and PVOH-based bilayer approach for plastic-free, repulpable and biodegradable oil- and water-resistant paper as a replacement for single-use plastics. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 59, n. 40, p. 17856-17866, 2020.

HAMZA, R. et al. Expression of two barley proteinase inhibitors in tomato promotes endogenous defensive response and enhances resistance to *Tuta absoluta*. **BMC Plant Biology**, v. 18, art. 24, 2018.

HEMMATI, S.; MEHRABADI, M. Structural ensemble-based computational analysis of trypsin enzyme genes discovered highly conserved peptide motifs in insects. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 53, p. 7-8, p. 335-354, 2020.

HOU, D. Z. et al. Preparation and characterization of novel drug-inserted-montmorillonite chitosan carriers for ocular drug delivery. **Advances in Nanoparticles**, v. 4, p. 70-84, 2015.

JOUDEH, N.; LINKE, D. Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 20, n. 1, art. 262, 2022.

KAMMOUN, A. K. et al. Etodolac fortified sodium deoxycholate stabilized zein nanoplateforms for augmented repositioning profile in human hepatocellular carcinoma: assessment of bioaccessibility, anti-proliferation, pro-apoptosis and oxidant potentials in HepG2 Cells. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 8, art. 916, 2022.

KARTHIKEYAN, K. Fabrication of electrospun zein nanofibers for the sustained delivery of siRNA. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 26, n. 2, art. 101, 2015.

KUMAR, V. et al. Gold nanoparticle exposure induces growth and yield enhancement in *Arabidopsis thaliana*. **Science of the Total Environment**, v. 461, p. 462-468, 2013.

LAZAREVIĆ, J.; JANKOVIĆ-TOMANIĆ, M. Dietary and phylogenetic correlates of digestive trypsin activity in insect pests. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 157, n. 2, p. 123-151, 2015.

LEE, J. H.; YEO, Y. Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. **Chemical Engineering Science**, v. 125, p. 75-84, 2016.

LI, C. et al. Preparation and characterization of rutin-loaded zein-carboxymethyl starch nanoparticles. **Foods**, v. 11, n. 18, art. 2827, 2022.

LI, H. et al. Effects of surface ligands on the uptake and transport of gold nanoparticles in rice and tomato. **Journal of Hazardous Materials**, v. 314, p. 188-196, 2016.

LI, L. et al. Effective uptake of submicrometre plastics by crop plants via a crack-entry mode. **Nature Sustainability**, v. 3, p. 929–937, 2020.

LIU, G. et al. Zein-based nanoparticles: Preparation, characterization, and pharmaceutical application. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, p. 1120251, 2023.

LUIS, A. I. S. et al. Zein Nanoparticles impregnated with eugenol and garlic essential oils for treating fish pathogens. **ACS Omega**, v. 5, n. 25, p. 15557-66, 2020.

MA, Z. et al. Visualization of the process of a nanocarrier-mediated gene delivery: stabilization, endocytosis and endosomal escape of genes for intracellular spreading. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 20, n. 1, art. 124, 2022.

MALATESTA, M. Transmission Electron Microscopy as a Powerful Tool to Investigate the Interaction of Nanoparticles with Subcellular Structures. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, art.12789, 2021.

MARTÍNEZ-LÓPEZ, A. L. et al. Zein-based nanocarriers for the oral delivery of insulin. In vivo evaluation in *Caenorhabditis elegans*. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 11, n. 2, p. 647-658, 2021.

MCKEVITH, B. Nutritional aspects of cereals. **Nutrition Bulletin**, v. 29, n. 2, p. 111-142, 2004.

MEHROTRA, K.; SMALLMAN, B. Ovicidal action of organo-phosphorus insecticides. **Nature**, v. 180, p. 97–98, 1957.

MELZAK, K. et al. Driving forces for DNA adsorption to silica in perchlorate solutions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 181, n. 2, 10, p. 635-644, 1996.

MENDES, B. B. A. et al. Nano delivery of nucleic acids. **Nature Reviews Methods Primers**, v. 2, art. 24, 2022.

MEYCHIK, N.; YERMAKOV, I. Ion exchange properties of plant root cell walls. **Plant and Soil**, v. 234, p. 181–193, 2001.

MOHAMED, E. A. Copper and chitosan nanoparticles as potential elicitors of innate immune response in date palm: a comparative study. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 52, n. 17-18, p. 1276-1288, 2019.

MONTEIRO, R. et al. Zein based-nanoparticles loaded botanical pesticides in pest control: an enzyme stimuli-responsive approach aiming sustainable agriculture. **Journal of Hazardous Materials**, v. 417, p. 126004, 2021.

MORAES, D. H., et al. The effect of xylem vessel diameter on potential hydraulic conductivity in different rice stem longitudinal positions. **Flora**, v. 295, p. 152147, 2022.

NAIR, R. et al. Nanoparticulate material delivery to plants. **Plant Science**, v. 179, n. 3, p. 154-163, 2010.

NAKANO, S. I.; SUGIMOTO, N. The structural stability and catalytic activity of DNA and RNA oligonucleotides in the presence of organic solvents. **Biophysical Reviews**, v. 8, n. 1, p. 11-23, 2016.

NARASIMHAMURTHY, K. et al. Chitosan and chitosan-derived nanoparticles modulate enhanced immune response in tomato against bacterial wilt disease. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 220, p. 223-237, 2022.

NICHOLSON, A. W. Structure, reactivity, and biology of double-stranded RNA. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, v. 52, p. 1-65, 1996.

OLIVEIRA, J. L. de et al. Hydrogels containing botanical repellents encapsulated in zein nanoparticles for crop protection. **ACS Applied Nano Materials**, v. 3, n. 1, p. 207-217, 2019.

ONELLI, E. et al. Clathrin-dependent and independent endocytic pathways in tobacco protoplasts revealed by labelling with charged nanogold. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, p. 3051–3068, 2008.

PADUA, G. W.; GUARDIOLA, L. V. Microcapsules produced from zein. **Microencapsulation and Microspheres for Food Applications**, v. 2015, p. 3-20, 2015.

PAMPOLINI, F. et al. Confocal microscopy provides visual evidence and confirms the feasibility of dsRNA delivery to emerald ash borer through plant tissues. **Journal of Pest Science**, v. 93, p. 1143–1153, 2020.

PARRA, J. R. Egg parasitoids commercialization in the New World. In: CONSOLI, F.; PARRA, J. R.; ZUCCHI, R. (eds.). **Egg parasitoids in agroecosystems with emphasis on *Trichogramma***. 1. ed. Heidelberg: Springer, 2010. chap. 14, p. 173-188.

PINSINO, A. et al. Probing the immune responses to nanoparticles across environmental species: a perspective of the EU Horizon 2020 project PANDORA. **Environmental Science: Nano**, v. 7, n. 11, p. 3216-3232, 2020

REGIER, M. C. et al. Fabrication and characterization of DNA-loaded zein nanospheres. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 10, art. 44, 2012.

RICO, C. M. et al. Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 3485–3498, 2011.

ROBARDS, A. W. Plasmodesmata. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 26, p. 13–29, 1975.

ROBERTS, A. G.; OPARKA, K. J. Plasmodesmata and the control of symplastic transport. **Plant Cell and Environment**, v. 26, p. 103–124, 2003.

RUBIO, F. et al. A predator-parasitoid mathematical model to describe the biological control of the tomato leafminer *Tuta absoluta*. **Ecological Complexity**, v. 50, art. 100995, 2022.

SALAZAR, A. M. et al. Stability of the oil-based nanoemulsion of *Laureliopsis philippiana* (Looser) and its insecticidal activity against tomato borer (*Tuta absoluta* Meyrick). **Industrial Crops and Products**, v. 188, art. 115635, 2022.

SARAIVA, N. R. et al. Clove oil-loaded zein nanoparticles as potential bioinsecticide agent with low toxicity. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 24, art. 100554, 2021.

SAWADOGO, W. M. Ovicidal and larvicidal effects of selected plant-based biopesticides on *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Journal of Entomological Science**, v. 57, n. 4, p. 614–624, 2022.

SCHOLTHOF, H. B. Plant virus transport: motions of functional equivalence. **Trends in Plant Science**, v. 10, p. 376–382, 2005.

SCHWAB, F. Barriers, pathways and processes for uptake, translocation and accumulation of nanomaterials in plants - Critical review. **Nanotoxicology**, v. 10, n. 3, p. 257-278, 2016

SHARMA, V. et al. Molecular basis of root nodule symbiosis between *Bradyrhizobium* and 'Crack-Entry' legume groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Plants**, v. 9, n. 2, art. 276, 2020.

SHEWRY, P. R.; NAPIER, J. A.; TATHAM, A. S. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. **Plant Cell**, v. 7, n. 7, p. 945-56, 1995.

SHUKLA, R. et al. Zein: the industrial protein from corn. **Industrial Crops and Products**, v. 13, n. 3, p. 171-192, 2001.

SIDDAIAH, C. N. et al. Chitosan nanoparticles having higher degree of acetylation induce resistance against pearl millet downy mildew through nitric oxide generation. **Scientific Reports**, v. 8, art. 2485, 2018.

SPASOJEVIĆ, L. et al. Preparation of composite zein/natural resin nanoparticles. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 85, p. 369-380, 2020.

THAGUN, C. et al. Non-transgenic gene modulation via spray delivery of nucleic acid/peptide complexes into plant nuclei and chloroplasts. **ACS Nano**, v. 16, n. 3, p. 3506-3521, 2022.

TUNÇ, İ. et al. Ovicidal activity of essential oils from five plants against two stored-product insects. **Journal of Stored Products Research**, v. 36, n. 2, p. 161-168, 2000.

VERBEKE K. A. et al. Towards microbial fermentation metabolites as markers for health benefits of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**. v. 28, n. 1, p. 42-66, 2015.

VERMA, D. K.; PATEL, S.; KUSHWAH, K. S. Effects of nanoparticles on seed germination, growth, phytotoxicity and crop improvement. **Agricultural Reviews**, v. 42, n. 1, p. 1-11, 2021.

WANG, J., GU, L., KNIPPLE, D. C. Evaluation of some potential target genes and methods for RNAi-mediated pest control of the corn earworm *Helicoverpa zea*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 149, p. 67-72, 2018.

WANG, Y. et al. Characterization of core–shell structures formed by zein. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 2, p. 487-494, 2013.

WANG, Z. et al. Star Polycation mediated dsRNA improves the efficiency of RNA interference in *Phytoseiulus persimilis*. **Nanomaterials**, v. 12, n. 21, p. 3809, 2022.

WATSON, J.; CRICK, F. Molecular structure of nucleic acids: a structure for Deoxyribose Nucleic Acid. **Nature**, v. 171, p. 737–8, 1953.

WEI, H. et al. Nanocarrier-mediated transdermal dsRNA-NPF1 delivery system contributes to pest control via inhibiting feeding behavior in *Grapholita molesta*. **Journal of Pest Science**, v. 95, p. 983–995, 2022.

WILSON, C. M. Multiple zeins from maize endosperms characterized by reverse-phase HPLC. **Plant Physiology**, v. 95, p. 777-786, 1991.

WU, H.; LI, Z. Nano-enabled agriculture: how do nanoparticles cross barriers in plants?. **Plant Communications**, v. 3, n. 6, p. 100346, 2022.

XU, D. et al. Phytotoxic secondary metabolites from Fungi. **Toxins**, v. 13, n. 4, p. 261, 2021.

YAN, S. et al. Chronic exposure to the *star polycation* (SPc) nanocarrier in the larval stage adversely impairs life history traits in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 20, art. 515, 2022.

YANG, W. et al. Advances in nanocarriers to improve the stability of dsRNA in the environment. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, art. 974646, 2022.

YIU, H. H. P. et al. Comprehensive study of DNA binding on Iron (II, III) Oxide nanoparticles with a positively charged polyamine three-dimensional coating. **Langmuir**, v. 29, n. 36, p. 11354-11365, 2013.

ZAPATA, P. J. et al. Use of alginate or zein as edible coatings to delay postharvest ripening process and to maintain tomato (*Solanum lycopersicon* Mill) quality. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 88, n. 7, p. 1287-1293, 2008.

ZELIKIN, A. N. et al. A general approach for DNA encapsulation in degradable polymer microcapsules. **ACS Nano**, v. 1, n. 1, p. 63-69, 2007.

ZHAI, G. et al. Transport of gold nanoparticles through plasmodesmata and precipitation of gold ions in woody poplar. **Environmental Science and Technology Letters**, v. 1, p. 146–51, 2014.

ZHANG, H. et al. Engineering DNA nanostructures for siRNA delivery in plants. **Nature Protocols**, v.15, p. 3064–3087, 2020.

ZHANG, H. et al. Gold-Nanocluster-mediated delivery of siRNA to intact plant cells for efficient gene knockdown. **Nano Letters**, v. 21, n. 13, p. 5859-5866, 2021.

ZHANG, J. et al. The effects and the potential mechanism of environmental transformation of metal nanoparticles on their toxicity in organisms. **Environmental Science: Nano.**, v. 5 p. 2482–99, 2018.

ZHANG, Y. H. Et al. Nanocarrier-delivered dsRNA suppresses wing development of green peach aphids. **Insect Science**, v. 29, n. 3, p. 669-682, 2022.

ZHONG, X. Zein-functionalized mesoporous silica as nanocarriers for nanopesticides with pH/enzyme dual responsive properties. **Industrial Crops and Products**, v. 188, art. 115716, 2022.

ZHU, Z. et al. Effect of Surface Charge on the Uptake and Distribution of Gold Nanoparticles in Four Plant Species. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 22, p. 12391-12398, 2012.

ZYBAILOV, B, L., FLORENS, L.; WASHBURN M. P. Quantitative shotgun proteomics using a protease with broad specificity and normalized spectral abundance factors. **Molecular BioSystems**, v. 5, p. 354-60, 2007.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em nosso trabalho, investigamos a viabilidade de uso do dsRNA sintético como uma alternativa para o controle da traça-do-tomateiro por RNAi. A pulverização foliar de dsRNA sintético mostrou-se capaz de controlar as larvas de *T. absoluta*, causando até 73% de mortalidade em relação ao controle. Esses resultados sugerem que a aplicação foliar de dsRNA sintético pode ser um método eficiente contra esse inseto minador de folhas. No entanto, é necessário ressaltar que ainda existem alguns importantes desafios a serem superados, tais como custo, formulação e escala de aplicação, antes que essa abordagem possa ser implementada em larga escala na agricultura.

O uso de dsRNA sintético homólogo atingindo o gene *arginina kinase (AK)* foi mais eficiente do que *ATPase vacuolar (ATPase)* contra *T. absoluta*. No entanto, também observamos a recuperação do nível de acúmulo de transcritos do gene alvo nas larvas após um período, o que sugere a necessidade de aplicações com alguma frequência, o que pode reduzir a eficiência do controle. É crucial identificar e selecionar genes-alvos com efeitos mais drásticos, cujo silenciamento cause um impacto significativo e prolongado na sobrevivência da praga para maximizar a eficiência do dsRNA sintético como biopesticida.

A produção em larga escala de dsRNA sintético a um custo acessível representa um importante desafio. Avanços tecnológicos têm reduzido os custos de produção de dsRNA nos últimos anos, tornando os biopesticidas à base de dsRNA sintéticos mais atrativos. No entanto, ainda são necessários esforços para aprimorar os processos de produção, visando a redução dos custos e a ampliação da oferta de dsRNA sintético, a fim de tornar essa tecnologia economicamente viável e suprir demandas do mercado.

Uma das limitações do dsRNA sintético como biopesticida é a rápida degradação ambiental. Para superar essa limitação, é necessário desenvolver métodos que garantam a estabilidade do dsRNA no ambiente. Além disso, a baixa absorção celular pelos insetos também representa um desafio significativo para o uso do RNAi no controle de pragas. Uma abordagem que pode ajudar a superar essas limitações é o uso de nanocarreadores na entrega de dsRNA. Neste estudo, os nanocarreadores de zeína (nZ) associados ao

dsRNA não foram eficazes no controle das larvas da traça-do-tomateiro. Portanto, explorar outros tipos de nanocarreadores, especialmente nanomateriais sustentáveis e com baixo impacto ambiental, pode ser uma opção encorajadora para melhorar a estabilidade e a entrega do dsRNA.

APÊNDICES

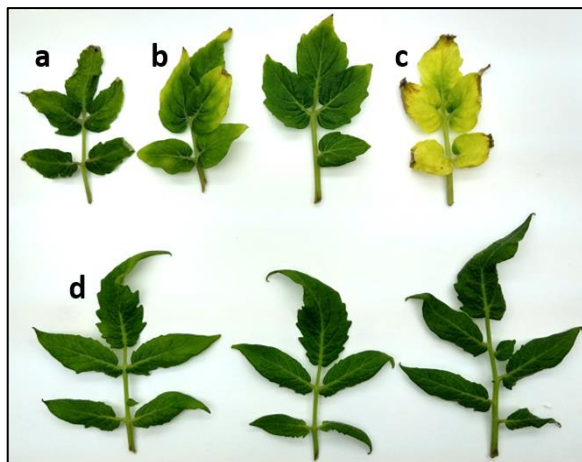


Figura 1. Folhas de tomateiro MT foram mantidas em placas de Petri de plástico por 15 dias em diferentes condições experimentais: **(a)** ausência de papel-filtro na placa e algodão umedecido no pecíolo, **(b)** presença apenas de papel-filtro umedecido na placa, **(c)** presença apenas de algodão umedecido no pecíolo e **(d)** presença de papel-filtro na placa e algodão umedecido no pecíolo

Tabela 1. Estimativa do volume de solução de dsRNA sintético com adjuvante retido em folhas de tomateiro MT por imersão foliar.

Folha	Peso fresco (μg)	Peso fresco molhado (μg)	Solução retida na folha (μL)
1	346,3	584,1	237,8
2	322,6	519,1	196,5
3	464,1	699,0	234,9
4	382,6	607,4	224,8
5	283,9	487,9	204,0
6	338,5	510,3	171,8
7	164,0	350,3	186,3
8	394,8	597,9	203,1
9	243,4	431,8	188,4
10	300,0	517,5	217,5
11	388,0	586,9	198,9
12	344,1	537,0	192,9
Média da solução de dsRNA retida por folha			201,0

ANEXOS

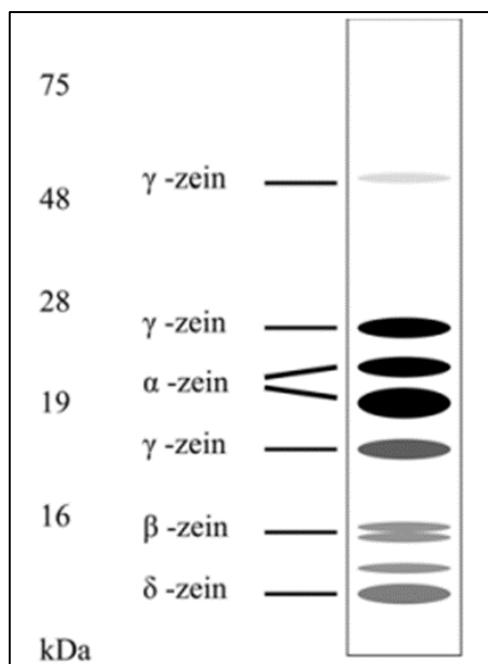


Figura 1. Representação da separação de zeína por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (ANDERSON; LAMSAL, 2011)

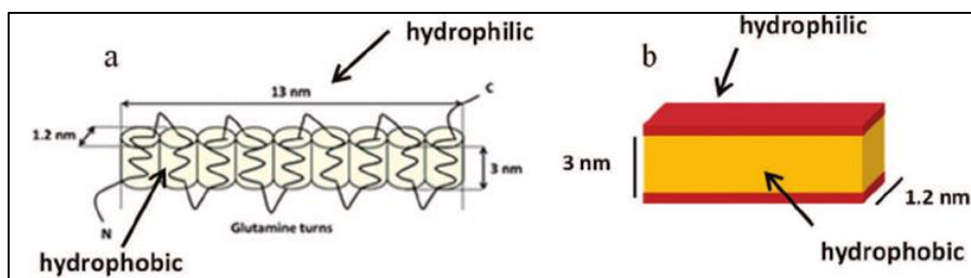


Figura 2. Representações da estrutura da zeína (DE VRIES et al., 2014)