

ISABELA MARIA REIS XAVIER AMORIM SANCHEZ

ALTERNATIVAS DE CONTROLE DE *Anticarsia gemmatalis* E *Diaphorina citri*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa - *Campus* Rio Paranaíba, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

RIO PARANAÍBA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

ISABELA MARIA REIS XAVIER AMORIM SANCHEZ

ALTERNATIVAS DE CONTROLE DE *Anticarsia gemmatalis* E *Diaphorina citri*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa *Campus* Rio Paranaíba, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

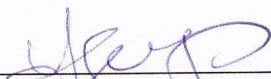
Aprovada: 13 de abril de 2018.



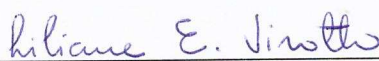
Ezequiel Marques da Silva
(Coorientador)



Pedro Ivo Vieira Good God
(Coorientador)



Jeanne Scárdini Marinho-Prado



Liliane Evangelista Visotto
(Orientadora)

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca da Universidade Federal
de Viçosa - Câmpus Rio Paranaíba**

T

S211a
2018 Sanchez, Isabela Maria Reis Xavier Amorim, 1991-
Alternativas de controle de *Anticarsia gemmatalis* e
Diaphorina citri / Isabela Maria Reis Xavier Amorim Sanchez. –
Rio Paranaíba, MG, 2018.
v, 63f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Liliane Evangelista Visôto.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Fitossanidade. 2. Lepidoptera. 3. Huanglongbing.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica
e Biologia Molecular. Mestrado em Agronomia-Produção
Vegetal (Campus CRP). II. Título.

634.304

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por sempre me acolher em seus braços de pai.

A minha mãe Maria e meu pai José (*in memoriam*) por terem me dado à vida e incentivado para que eu seguisse o meu caminho.

Ao meu marido Douglas por todo o amor, compreensão e apoio.

A minha orientadora Dr^a. Liliane Evangelista Visôto pelos ensinamentos, confiança, paciência e amizade.

Aos meus familiares e amigos, em especial Daniela, Gabriela, Luciana, Juliana e Maria Paula por sempre estarem presentes em minha vida, apesar da distância.

À Universidade Federal de Viçosa *Campus* Rio Paranaíba e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção vegetal, a todos os professores e funcionários que contribuíram para a minha formação acadêmica e profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

Meu agradecimento a Embrapa Meio Ambiente, e a todos os pesquisadores, técnicos e funcionários, em especial a Dr^a Jeanne Scardini Marinho-Prado, que abriram as portas e me ajudaram durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa proposto.

Aos professores Dr. Ézio Marques da Silva e Dr. Pedro Ivo Vieira Good God pela disponibilidade em participar da banca examinadora.

A minhas colegas de pós-graduação Ana, Daniela, Jéssica, Natália, Nayara, Thaisa pela amizade e pelos momentos de descontração durante esses anos.

A minha gratidão a todos que contribuíram durante esta jornada!

ÍNDICE

RESUMO	iv
ABSTRACT	v
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	3
CAPÍTULO I – EFEITO DE EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS E TRITERPENOS ISOLADOS DE <i>Cabrlea canjerana</i> FRENTE Á LAGARTA DA SOJA <i>Anticarsia gemmatalis</i>	5
RESUMO	5
ABSTRACT	6
1. INTRODUÇÃO	7
2. MATERIAIS E MÉTODOS	9
3. RESULTADOS	14
4. DISCUSSÃO.....	26
5. CONCLUSÕES.....	29
6. REFERÊNCIAS	30
CAPÍTULO II – POTENCIAL DE INIBIDORES DE PROTEASE PARA O CONTROLE DE <i>Diaphorina citri</i> (KUWAYAMA) (HEMIPTERA: LIVIIDAE)	35
RESUMO	35
ABSTRACT	36
1. INTRODUÇÃO	37
2. MATERIAL E MÉTODOS	39
3. RESULTADOS	45
4. DISCUSSÃO.....	52
5. CONCLUSÕES.....	55
6. REFERÊNCIAS	56
CONCLUSÕES GERAIS	63

RESUMO

SANCHEZ, Isabela Maria Reis Xavier Amorim, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa – Campus Rio Paranaíba, abril de 2018. **Alternativas de controle de *Anticarsia gemmatalis* e *Diaphorina citri***. Orientadora: Liliane Evangelista Visôto. Coorientadores: Ézio Marques da Silva e Pedro Ivo Vieira Good God.

O uso de pesticidas no controle de insetos praga e patógenos leva a uma série de consequências que prejudicam o meio ambiente e a saúde humana. Em busca de controles alternativos de pragas, este estudo avaliou o potencial de extratos brutos e substâncias isoladas da espécie vegetal *Cabralea canjerana* spp. *canjerana* sob a praga da soja, *Anticarsia gemmatalis*, e de inibidores de proteases sob a praga do citros, *Diaphorina citri*. Os extratos etanólicos de folhas, galhos, sementes, frutos, e triterpenos isolados de *C. canjerana* foram avaliados com base nos parâmetros biológicos, índices nutricionais e atividades das principais enzimas digestivas de *A. gemmatalis*. Os parâmetros biológicos mais afetados pelos extratos foram mortalidade e oviposição. Vale ressaltar que o tratamento extrato galhos 1000 ppm ocasionou uma mortalidade de 80% dos insetos. Os triterpenos não afetaram negativamente os parâmetros analisados. Em relação a *D. citri*, foi avaliado o efeito de diferentes inibidores de proteases sobre o ciclo de vida e realizada a caracterização bioquímico-cinética de cisteíno protease. Os resultados mostraram que todos os inibidores testados aumentaram a mortalidade de ninfas, no entanto, o inibidor E64 apresentou também efeitos adversos na emergência, oviposição e viabilidade dos ovos. A caracterização de cisteíno proteases de *D. citri* mostrou que o pH e temperatura de maior atividade foi 6,0 e 25°C. Ao analisar o efeito dos inibidores na atividade verificou-se que a enzima foi insensível a aprotinina e berenil, no entanto E64 (50 µM) reduziu significativamente a atividade. Os valores de $V_{\max \text{ app}}$ e $K_M \text{ app}$ foram de 31,15 nM s⁻¹ e 0,028 mM, respectivamente. Esses resultados sugerem que os psilídeos utilizam cisteíno proteases para a digestão de proteínas. Nossos experimentos demonstraram eficiência dos extratos etanólicos de *C. canjerana* em *A. gemmatalis*, e alterações danosas a *D. citri* pelo inibidor de cisteíno protease E64, o que os tornam candidatos ao desenvolvimento de um potencial inseticida.

ABSTRACT

SANCHEZ, Isabela Maria Reis Xavier Amorim, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa – *Campus* Rio Paranaíba, April, 2018. **Alternative of control of *Anticarsia gemmatalis* and *Diaphorina citri***. Adviser: Liliane Evangelista Visôto. Co-advisers: Ézio Marques da Silva and Pedro Ivo Vieira Good God.

The use of pesticides in the control of insect pests and pathogens leads to a number of consequences that harm the environment and human health. In search of alternative pest control, this study evaluated the potential of raw extracts and isolated substances of the *Cabralea canjerana* spp. *canjerana* under the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, and protease inhibitors under the citrus pest, *Diaphorina citri*. The ethanolic extracts of leaves, stems, seeds, fruits, and triterpenes isolated from *C. canjerana* were evaluated based on the biological parameters, nutritional indexes and activities of the main digestive enzymes of *A. gemmatalis*. The biological parameters most affected by the extracts were mortality and oviposition. It is noteworthy that, the treatment extract stems 1000 ppm caused a mortality of 80% of the insects. The triterpenes did not negatively affect the analyzed parameters. In relation to *D. citri*, the effect of different protease inhibitors on the life cycle and the biochemical-kinetic characterization of cysteine protease were evaluated. The results showed that all inhibitors tested increased nymph mortality, however, the E64 inhibitor also had adverse effects on emergence, oviposition and egg viability. The characterization of cysteine proteases from *D. citri* showed that the pH and temperature of highest activity was 6.0 and 25°C. In analyzing the effect of the inhibitors on the activity, it was verified that the enzyme was insensitive to aprotinin and berenil, however E64 (50 µM) significantly reduced the activity. The values of $V_{\max \text{ app}}$ and $K_M \text{ app}$ were 31.15 nM s⁻¹ and 0.028 mM, respectively. These results suggest that the psyllids use cysteine proteases for the digestion of proteins. Our experiments demonstrated the efficiency of the *C. canjerana* extracts in *A. gemmatalis*, and damage to *D. citri* by the cysteine protease inhibitor E64, which makes them candidates for the development of a potential insecticide.

INTRODUÇÃO GERAL

O uso de agroquímicos no controle de insetos praga e patógenos tem se tornando uma prática indiscriminada e excessiva que acarreta uma série de consequências prejudiciais ao meio ambiente e a saúde humana (Baskar et al., 2018). Essa forma de manejo, apesar de eficiente, possui limitações não só por ser desfavorável ao ambiente, mas também por selecionar populações de insetos resistentes (Darvishzadeh et al., 2015, Shao et al., 2017, Baskar et al., 2018).

As plantas sintetizam várias moléculas para se defender do ataque de insetos (Macedo et al., 2011), dentre elas pode-se citar os metabólitos secundários e os inibidores de proteases, que estão sendo cada vez mais explorados por serem uma alternativa ao uso de inseticidas convencionais (Dhivya et al., 2018). Os extratos de plantas são ricos em metabólitos secundários (Jamwal et al., 2018) e alguns já são comercializados, como a azadiractina (Velasques et al., 2017). Já os inibidores de proteases compreendem uma classe abundante de proteínas sintetizadas especialmente por plantas (Ussuf et al., 2001), que afetam o crescimento e desenvolvimento do inseto, pela inibição da atividade de proteases digestivas, acarretando uma privação de nutrientes e antibiose (Jadhav et al., 2016).

As culturas agrícolas estão sujeitas as pragas durante todo o seu ciclo, sendo que as mesmas podem prejudicar a qualidade do produto final e resultar em danos econômicos ao produtor (Macedo et al., 2011). Nesse sentido, algumas pragas são relevantes devido a sua importância econômica e a limitação do manejo. A lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis* (Hubner) (Lepidoptera: Erebidae), é considerada uma das principais pragas desfolhadoras das lavouras de soja do Brasil (Macedo et al., 2011). A soja (*Glycine max*) é a segunda cultura agrícola mais cultivada no território nacional (Macedo et al., 2011), e este fato aumenta o interesse no desenvolvimento de novos métodos de controle de pragas, em busca da redução de prejuízos econômicos.

O mesmo ocorre para a cultura brasileira do citros, que contribui com 18,92 milhões de toneladas na produção mundial (FAO, 2016). No entanto, a citricultura também pode ser acometida por sérios problemas fitossanitários. Quando a lavoura de citros é infectada por bactérias causadoras da doença Huanglongbing, *Candidatus Liberibacter*, os pomares são totalmente eliminados, gerando um alto prejuízo econômico a produção local, nacional e mundial de citros (Arp et al., 2017). O principal vetor dessas bactérias é o psilídeo *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae), uma praga

sugadora de seiva (Peng et al., 2017). Atualmente, o controle de *D. citri* é realizado através de agroquímicos e, em menor extensão, através do uso de inimigos naturais.

Em busca de alternativas de controle dessas pragas, o presente trabalho objetivou avaliar o efeito de extratos brutos e triterpenos isolados da espécie vegetal *Cabralea canjerana* spp. *canjerana* no controle de *A. gemmatalis* e o efeito de inibidores de proteases no controle de *D. citri*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARP, A.P.; MARTINI, X.; PELZ-STELINSKI, K.S. Innate immune system capabilities of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.148, p.94-101, 2017.

BASKAR, K.; MAHESWARAN, R.; PAVUNRAJ, M.; PACKIAM, S.M.; IGNACIMUTHU, S.; DURAI PANDIYAN, V.; BENELLI, G. Toxicity and antifeedant activity of *Caesalpinia bonduc* (L.) Roxb. (Caesalpinaceae) extracts and fractions against the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* Hub. (Lepidoptera: Noctuidae). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.101, p.69-74, 2018.

DARVISHZADEH, A.; BANDANI, A.; AMIRI, A.; MOUSAVI, S.Q. Serine and cysteine proteases of *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae) larvae raised on date palms (*Phoenix dactylifera*). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v.18, p.547-552, 2015.

DHIVYA, K.; VENGATESWARI, G.; ARUNTHIRUMENI, M.; KARTHI, S.; SENTHIL-NATHAN, S.; SHIVAKUMAR, M.S. Bioprospecting of *Prosopis juliflora* (Sw.) DC seed pod extract effect on antioxidant and immune system of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.101, p.45-53, 2018.

JADHAV, A.R.; WAR, A.R.; NIKAM, A.N.; ADHAV, A.S.; GUPTA, V.S.; SHARMA, H.C.; GIRI, A.P.; TAMHANE, V.A. *Capsicum annuum* proteinase inhibitor ingestion negatively impacts the growth of sorghum pest *Chilo partellus* and promotes differential protease expression. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v.8, p.302-309, 2016.

JAMWAL, K.; BHATTACHARYA, S.; PURI, S. Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v.9, p.26-38, 2018.

MACEDO, M.L.R.; FREIRE, M.G.M.; KUBO, C.E.G.; PARRA, J.R.P. Bioinsecticidal activity of *Talisia esculenta* reserve protein on growth and serine digestive enzymes

during larval development of *Anticarsia gemmatalis*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v.153, p.24-33, 2011.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A ALIMENTAÇÃO E A AGRICULTURA (FAO), Citrus Fruits – Fresh (Statistical Bulletin 2016). Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i8092e.pdf>, 2017. Acesso em 24 janeiro 2018.

PENG, Y.; WANG, Y.; TAO, X.; ZENG, Z.; JOHNSON, N.A.N.; YAO, Q.; CHEN, K. A genome-wide survey and analysis of basic helix-loop-helix genes in the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v.20, p.821-829, 2017.

SHAO, E.; LIN, G.; LIU, S.; MA, X.; CHEN, M.; LIN, L.; WU, S.; SHA, L.; LIU, Z.; HU, X.; GUAN, X.; ZHANG, L. Identification of transcripts involved in digestion, detoxification and immune response from transcriptome of *Empoasca vitis* (Hemiptera: Cicadellidae) nymphs. **Genomics**, v.109, p.58-66, 2017.

USSUF, K.K.; LAXMI, N.H.; MITRA, R. Proteinase inhibitors: Plant-derived genes of insecticidal protein for developing insect-resistant transgenic plants. **Current Science**, v.80, n.7, p.847-853, 2001.

VELASQUES, J.; CARDOSO, M.H.; ABRANTES, G.; FRIHLING, B.E.; FRANCO, O.L.; MIGLIOLO, L. The rescue of botanical insecticides: A bioinspiration for new niches and needs. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.143, p.14-25, 2017.

CAPÍTULO I

EFEITOS DE EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS E TRITERPENOS ISOLADOS DE *Cabralea canjerana* FRENTE À LAGARTA DA SOJA *Anticarsia gemmatalis*

RESUMO

A lagarta *Anticarsia gemmatalis* é a principal praga desfolhadora da soja. Neste estudo, o efeito inseticida de extratos etanólicos de folhas, galhos, sementes, frutos, e de triterpenos isolados de *Cabralea canjerana* foi avaliado em *A. gemmatalis*. Foram determinados os parâmetros biológicos, os índices nutricionais e as atividades das principais enzimas digestivas de lagartas submetidas ao tratamento com os extratos brutos e triterpenos de *C. canjerana*. Os parâmetros mais afetados pelos tratamentos com os extratos brutos foram mortalidade e oviposição. A mortalidade cumulativa foi superior, enquanto a oviposição foi reduzida substancialmente em todos os tratamentos com extratos etanólicos avaliados. Vale ressaltar que o tratamento de extrato galhos 1000 ppm ocasionou uma mortalidade cumulativa de 80% dos insetos. O triterpeno cabraleadiol, concentrações de 10 e 50 ppm, provocaram mortalidade larval superior ao controle, porém abaixo do esperado, 30 e 26%, respectivamente. Os extratos de sementes e frutos ocasionaram maior consumo de alimento (RCR), taxa metabólica (RMR), digestibilidade aproximada (AD), custo metabólico (CM) e redução no crescimento do inseto (RGR), na eficiência de conversão do alimento digerido e ingerido (ECI e ECD). Cabraleadiol (10 e 100ppm) e ocotilona (100 ppm) também ocasionaram aumento e ou redução dos índices nutricionais. Em relação ao potencial inibitório dos extratos e triterpenos sobre enzimas digestivas verificou-se que a atividade de proteases totais foi reduzida na maioria dos tratamentos com extratos etanólicos, cabraleadiol em todas as concentrações testadas e ocotilona 100 ppm. A atividade de cisteíno proteases foi inibida pelos extratos de frutos, cabraleadiol 10 ppm e ocotilona 50 e 100 ppm. Nossos experimentos demonstraram que os extratos etanólicos de *C. canjerana* afetam negativamente vários aspectos fisiológicos de *A. gemmatalis*, tornando-os candidatos ao desenvolvimento de um potencial inseticida.

Palavras-chave: fitossanidade, *Glycine max*, lepidópteros, Meliaceae

ABSTRACT

The caterpillar *Anticarsia gemmatalis* is one of the main pests of soybean. In this study, the insecticidal effect of ethanolic extracts of leaves, stems, seeds, fruits and triterpenes isolated from *Cabralea canjerana* was evaluated in control of *A. gemmatalis*. The biological parameters, nutritional indexes and activities of the digestive enzymatic principles of caterpillars submitted to treatment with crude extracts and triterpenes of *C. canjerana* were determined. The parameters affected by treatments with crude extracts were mortality and oviposition. The cumulative rate was higher, while oviposition was interrupted in all treatments with ethanolic extracts evaluated. It is worth mentioning the treatment of extract of stems 1000 ppm caused a cumulative rate of 80% of the insects. The cabraleadiol triterpene piped at concentrations of 10 and 50 ppm caused larval mortality higher than control, but less than expected, 30 and 26%, respectively. The main seeds and fruits of food consumption (RCR), metabolic rate (RMR), approximate digestibility (AD), metabolic cost (CM) and reduction of insect growth (RGR), ingestion conversion efficiency and ECD). Cabraleadiol (10 and 100 ppm) and ocotilone (100 ppm) also caused an increase and decrease of nutritional indexes. Regarding the inhibitory potential of extracts and triterpenes on digestive enzymes, it was found that protease activity was higher for most treatments with ethanolic extracts at all concentrations tested and ocotilone (100 ppm). Cysteine protease activity was inhibited by fruit extracts, cabraleadiol 10 ppm and ocotilone 50 and 100 ppm. Our experiments demonstrated that *C. canjerana* ethanolic extracts negatively affected all the physiological aspects of *A. gemmatalis*, making them potential for the development of a potential insecticide.

Keywords: phytosanitary, *Glycine max*, Lepidoptera, Meliaceae

1. INTRODUÇÃO

A produção de soja, *Glycine max* (L.) Merrill (Fabaceae: Phaseoleae) uma das leguminosas mais importantes no mundo, é afetada por vários fatores abióticos e bióticos ao longo de todo o ciclo da cultura (Marques et al., 2017). Dentre os fatores bióticos está a lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Erebidae), que é uma praga desfolhadora (Bernardi et al., 2012; Panizzi, 2013). Uma das principais formas de controle utilizada são os inseticidas sintéticos, que controlam efetivamente a lagarta (Bernardi et al. 2012), mas geram vários danos ecológicos, como a seleção de indivíduos resistentes, desequilíbrios ecológicos, danos aos mamíferos (Maheswaran & Ignacimuthu, 2013; Ponsankar et al., 2016), além de impedir o equilíbrio entre pragas e inimigos naturais (Panizzi, 2013).

Em busca de métodos alternativos de controle, os inseticidas botânicos estão sendo cada vez mais explorados (Chermenskaya et al., 2010). Os extratos vegetais são ricos em metabólitos secundários, que são compostos de defesa química, naturalmente produzidos pelas plantas (Jamwal et al., 2018). Estas substâncias podem causar os mais variados efeitos ao inseto, como repelência, dissuasão alimentar, toxicidade aguda, alterações na oviposição, desenvolvimento e crescimento (Isman, 2017), com a vantagem da maioria ser biodegradável, apresentar baixa toxicidade a mamíferos e baixo risco para o meio ambiente, quando usadas de maneira adequada e em pequenas quantidades (Kéita et al., 2001).

A família Meliaceae é conhecida pelo seu potencial no controle de pragas. As plantas pertencentes a essa família são ricas em metabólitos secundários, com destaque para os limonóides e triterpenos (Da Silva et al., 1984; Sarria et al., 2011). A espécie vegetal *Cabralea canjerana* pertence a família Meliaceae e compreende três subespécies, sendo uma delas a *C. canjerana* ssp. *canjerana*, que ocorre nas florestas neotropicais (Melo et al., 2014), estendendo-se da Costa Rica ao Sul do Brasil e norte da Argentina (Sarria et al. 2011). Estudos realizados com os extratos e metabólitos de *C. canjerana* vêm mostrando o potencial desta espécie para o controle de insetos praga. Triterpenos e limonóides isolados de *C. canjerana* apresentaram atividade biológica frente a *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) afetando o seu desenvolvimento (Sarria et al., 2011). O extrato bruto e a fração hexânica das folhas de *C. canjerana* também foram eficientes no controle do caruncho do feijão *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Bruchidae) (Smaniotto et al., 2010). Extratos aquosos de sementes, folhas e frutos de *C. canjerana* ssp. *polytricha*, se mostraram

efetivos sobre o curuquerê-da-couve, *Acia monuste orseis* (Lepidoptera: Pieridae) ocasionando mortalidade dos insetos antes que eles chegassem à fase pupal (Mata & Lomonaco, 2013).

Devido a eficiente atividade biológica dos extratos e metabólitos isolados de *C. canjerana* relatada, objetivou-se no presente trabalho avaliar o efeito dos extratos etanólicos de diferentes partes vegetais (folhas, galhos, sementes e frutos) e de dois triterpenos (cabraleadiol e ocotilona) isolados de *C. canjerana* nos parâmetros biológicos e índices nutricionais e a possível ação inibitória sobre as principais enzimas digestivas de *A. gemmatalis*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e reagentes

As folhas, frutos maduros, galhos e sementes de *Cabralea canjerana* ssp. *canjerana* foram coletados no departamento de Dendrologia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, Brasil. A identificação foi realizada pelo botânico Terence Dale Pennington do Royal Botanic Gardens, Reino Unido, Inglaterra. Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich Química Brasil (São Paulo, SP, Brasil), exceto o ácido ascórbico e o nipagin, os quais foram adquiridos da Synth-LabSynth (São Paulo, SP, Brasil). Feijão, gérmen de trigo, proteína de soja e vitaminas foram obtidos do mercado local.

2.2. Obtenção dos extratos brutos e isolamento dos triterpenos

2.2.1. Extrato bruto etanólico

As folhas, frutos, galhos e sementes de *C. canjerana* foram manualmente separados, secos, moídos e armazenados a -20°C. Para a obtenção dos extratos etanólicos de cada parte vegetal, foram pesadas 100 g de matéria seca do respectivo material, e adicionados 1000 mL de etanol PA. A mistura foi homogeneizada diariamente por sete dias.

2.2.2. Isolamento dos triterpenos

O extrato etanólico (10,0 g) dos frutos maduros de *C. canjerana* foi submetido a extração líquido-líquido com 120 mL de solução metanol-água (1:3). A solução foi extraída com diferentes solventes, para obtenção das frações em hexano (6,4 g), diclorometano (1,8 g), acetato de etila (0,77 g) e metanol (1,03 g). Os triterpenos, cabraleadiol (1) e ocotilona (2) (Figura 1) foram isolados como segue. A fração de diclorometano (5,4 g) dos frutos de *C. canjerana* foi submetida a uma coluna de sílica gel (230 - 400 mesh, 4,0 cm × 16,0 cm), utilizando hexano / acetato de etila com eluição isocrática de (5: 2), produzindo noventa e seis frações. As frações oitenta e quatro, cinco, seis, sete e nove foram agrupadas obtendo-se o composto 1 (20 mg). ¹H NMR (δ, 400 MHz, CDCl₃): 3,40 (*t*), H-3; 3,64 (*dd*), H-24; 0,98 (*s*), Me-18; 0,87 (*s*), Me-19; 1,15

(s), Me-21; 1,19 (s), Me-26; 1,11 (s), Me-27; 0,94 (s), Me-28; 0,84 (s), Me-29; 0,89 (s), Me-30. ^{13}C NMR (δ , 100 MHz, CDCl_3): 33,6 (C-1); 25,3 (C-2); 76,2 (C-3); 37,6 (C-4); 49,5 (C-5); 18,2 (C-6); 35,1 (C-7); 40,6 (C-8); 50,6 (C-9); 37,2 (C-10); 21,6 (C-11); 27,0 (C-12); 42,7 (C-13); 50,1 (C-14); 31,4 (C-15); 25,8 (C-16); 49,8 (C-17); 15,5 (C-18); 16,0 (C-19); 86,5 (C-20); 27,7 (C-21); 34,7 (C-22); 26,3 (C-23); 86,2 (C-24); 70,2 (C-25); 27,8 (C-26); 24,0 (C-27); 28,3 (C-28); 22,1 (C-29) e 16,5 (C-30). As frações noventa e um, dois, três, quatro, cinco e seis produziram o composto 2 (25,0 mg). ^1H NMR (δ , 200 MHz, CDCl_3): 3,63 (m), H-24; 0,89 (s), Me-18; 0,95 (s), Me-19; 1,15 (s), Me-21; 1,12 (s), Me-26; 1,19 (s), Me-27; 1,08 (s), Me-28; 1,04 (s), Me-29; 1,01 (s), Me-30. ^{13}C NMR (δ , 50 MHz, CDCl_3): 39,9 (C-1); 34,6 (C-2); 218,0 (C-3); 47,4 (C-4); 55,3 (C-5); 19,7 (C-6); 34,1 (C-7); 40,3 (C-8); 50,0 (C-9); 36,8 (C-10); 22,3 (C-11); 25,0 (C-12); 43,3 (C-13); 50,2 (C-14); 31,4 (C-15); 26,9 (C-16); 49,8 (C-17); 16,0 (C-18); 15,2 (C-19); 86,5 (C-20); 24,3 (C-21); 34,8 (C-22); 27,1 (C-23); 86,4 (C-24); 70,3 (C-25); 26,8 (C-26); 27,1 (C-27); 26,4 (C-28); 21,0 (C-29) e 16,3 (C-30).

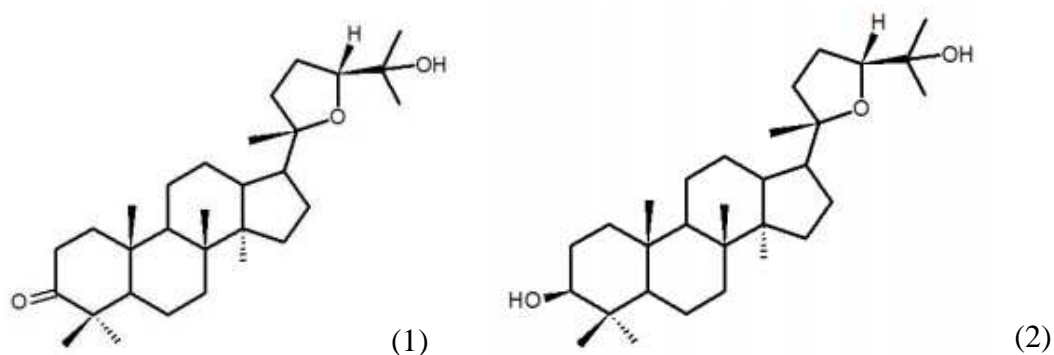


Fig.1. Triterpenos (1) cabraleadiol e (2) ocotilona isolados de *Cabralea canjerana*.

2.3. Insetos e tratamentos

Lagartas de *A. gemmatalis* foram obtidas da criação em massa do Laboratório de BIOFITOMOL da Universidade Federal de Viçosa - *Campus* Rio Paranaíba, em Rio Paranaíba, Minas Gerais, Brasil. Os insetos foram alimentados com dieta artificial (Hoffman-Campo et al., 1985) e mantidos em potes plásticos, em condições controladas de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, UR de $70 \pm 5\%$ e fotoperíodo de 12h.

Todos os extratos brutos foram incorporados à dieta artificial, quando a mesma se encontrava a uma temperatura de aproximadamente 50°C , nas concentrações de 0, 100, 500 e 1000 ppm, e os triterpenos nas concentrações de 0, 10, 50 e 100 ppm.

2.4. Bioensaio de desenvolvimento e sobrevivência

O desenvolvimento e sobrevivência das lagartas de *A. gemmatalis* foram avaliados por meio da exposição dos insetos a doses crescentes dos extratos brutos e triterpenos isolados. Cinquenta lagartas de primeiro instar foram individualizadas para cada tratamento, incluindo o controle (0 ppm), em potes plásticos e mantidas nas mesmas condições mencionadas para a criação massal. A dieta foi oferecida *ad libitum* para os insetos e seu desenvolvimento foi acompanhado até a fase adulta (Pilon et al., 2006). Foram avaliados o tempo do ciclo larval, a mortalidade larval, o peso pupal, a emergência, a deformação pupal, a mortalidade pupal, a mortalidade cumulativa corrigida e o total de ovos depositados (contados diariamente por cinco dias). O peso pupal foi determinado por meio de balança analítica (Shimadzu AW/AX/AY Series, Kyoto, Japão).

2.5. Bioensaio dos parâmetros nutricionais

Para a avaliação dos índices nutricionais, cada tratamento consistiu de 30 lagartas de segundo instar, individualizadas em potes plásticos, onde diariamente foi oferecido um grama de dieta artificial, até o último instar de desenvolvimento. Para a determinação do peso dos insetos ao final do período de alimentação, lagartas de 6º instar foram transferidas para placas de Petri e mantidas em estufa a 60°C, para completa desidratação. Diariamente, o alimento restante nos potes e as fezes produzidas pelos insetos ao final das 24 h, foram desidratados a 60°C, e o peso seco determinado através de uma balança analítica. Para o cálculo dos índices nutricionais foi utilizada a metodologia proposta por Waldbauer (1968) com modificações feitas por Scriber & Slansky Jr. (1981). Foram determinados os índices nutricionais para cada tratamento, por meio das seguintes fórmulas: RCR - taxa de consumo relativo (g/g/dia) = $I/B_m \times T$; RGR - taxa de crescimento relativo (g/g/dia) = $B/B_m \times T$; RMR - taxa metabólica relativa (g/g/dia) = $M/B_m \times T$; AD - digestibilidade aproximada (%) = $(I-F)/I \times 100$; ECI - eficiência de conversão do alimento ingerido (%) = $B/I \times 100$; ECD - eficiência de conversão do alimento digerido (%) = $B/I-F \times 100$; custo metabólico (%) = $100 - ECD$. Onde: F = peso das fezes produzidas (g) durante T; B = ganho de peso pelas lagartas (g) durante T; B_m = peso médio das lagartas (g) durante T; I = peso do alimento ingerido (g) durante T; I-F = alimento assimilado (g) durante T; M = (I-F)-B = alimento metabolizado durante o período de alimentação.

2.6. Quantificação de proteínas e ensaios enzimáticos

2.6.1. Obtenção do extrato enzimático

Aproximadamente 10 insetos de 5^o instar, para cada uma das três repetições, de todos os tratamentos foram acondicionados a -20°C, por 5 min. para redução das suas atividades vitais. Em seguida foi realizada a retirada do intestino médio a 4°C. Os intestinos foram armazenados em 1 mL de solução de HCl 10⁻³ mol L⁻¹ a -20°C, até o momento das análises enzimáticas. No momento dos ensaios, os intestinos foram submetidos a lise celular por meio de nove ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 37°C (Pilon et al., 2006, Visôto et al., 2009). Alíquotas de 1 mL do extrato intestinal foram centrifugadas a 100.000 x g por 30 min. a 4°C. O sobrenadante obtido foi coletado e utilizado como fonte de proteínas e enzimas.

2.6.2. Determinação da concentração de proteína e ensaios enzimáticos

A concentração de proteína foi determinada, segundo o método de Bradford (1976). Soluções de soroalbumina bovina (BSA) de 0 a 0,2 mg mL⁻¹ foram usadas como padrão. Atividade de proteases totais foi determinada usando azocaseína como substrato na concentração final de 2% (m/v). A reação foi incubada por 30 minutos e cessada pela adição de ácido tricloroacético a 10% (10%, m/v). As amostras foram centrifugadas a 8.000 x g por 5 min. para remover o depósito de proteínas, e 1 M NaOH foi adicionado ao sobrenadante para determinação da atividade de proteases totais, a 440 nm, seguindo o método de Kunitz (1947), modificado por Oliveira et al. (2005). A atividade de serino protease foi determinada como descrito por Erlanger et al. (1961), utilizando o substrato cromogênico N-benzoil-L-arginil *p*-nitroanilina (L-BApNA), na concentração final de 0,5 mM em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, contendo 20 mM de CaCl₂. A atividade de cisteíno protease foi determinada conforme descrito para a atividade de serino protease, mas foi adicionado solução de benzamidina 1 mM, um inibidor específico de serino protease. As velocidades foram determinadas pela formação do produto *p*-nitroanilida, pela medida da absorvância a 410 nm em função do tempo (2,5 min), utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de 8800 (M⁻¹ x cm⁻¹) (Xavier et al., 2005).

A atividade da amilase foi determinada utilizando-se o kit enzimático K003 da empresa Bioclin® (QUIBASA- Química Básica Ltda, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), com base na metodologia de Caraway (1959) modificada, que consiste na

incubação do extrato enzimático em presença do substrato tamponado contendo amido. A absorbância foi determinada 660 nm. A atividade de lipase foi determinada por meio do kit enzimático K025, também da empresa Bioclin®, segundo a metodologia adaptada de Cherry & Crandall (1932). Esse método baseia-se na atividade de lipases sobre um glicerol ester, que libera um composto cromogênico que é quantificado a 410 nm. As atividades de amilase e lipase foram expressas como unidades de amilase (AU dLx1) e unidades internacionais (UI), respectivamente. Unidades de amilase (AU dLx1) refere a quantidade de amilase que hidrolisa 10 mg de amido em 30 min. a 37°C, enquanto a unidade de atividade de lipase refere-se a quantidade de lipase que libera 1 mmol de ácidos graxos/min. Três replicatas foram usadas para a determinação do teor de proteínas e para as atividades enzimáticas.

2.7. Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, sendo cada lagarta uma repetição. Os dados dos parâmetros biológicos e atividades enzimáticas foram submetidas a análise de variância realizadas no software R Studio® e as médias comparadas pelo teste de Skott Knott e Tukey a 5%, respectivamente.

Os resultados de parâmetros nutricionais foram avaliados através de análise multivariada, análise de componentes principais (ACP) com o intuito de avaliar a importância de cada variável estudada sobre a variação total entre os tratamentos. A escolha dessa avaliação residiu na possibilidade de destacar as variáveis que contribuem para o efeito dos tratamentos avaliados, sem perda significativa da informação geral (Manly, 2008).

3. RESULTADOS

3.1. Efeito dos extratos brutos etanólicos e dos triterpenos de *C. canjerana* na sobrevivência e no desenvolvimento dos insetos

O efeito dos extratos etanólicos de *C. canjerana* nos parâmetros biológicos de *A. gemmatalis* estão apresentados na Tabela 1. Em relação à duração do ciclo larval, verificou-se aumento nos dias de desenvolvimento das larvas submetidas aos tratamentos folhas e galhos (500 e 1000 ppm) e redução nos tratamentos sementes e frutos em todas as concentrações testadas. A mortalidade larval foi significativamente maior nos tratamentos folhas e galhos (500 e 1000 ppm) e sementes e frutos (100 ppm). O peso pupal reduziu significativamente apenas nos tratamentos com sementes, os demais tratamentos não diferiram do controle. Houve redução significativa na porcentagem de emergência das pupas em adultos em todos os tratamentos, exceto sementes 500 ppm que não diferiu do controle. Observou-se também deformação pupal significativa nos tratamentos sementes 100, 500 e 1000 ppm e frutos 500 e 1000 ppm. A mortalidade pupal foi significativamente maior que o controle nos tratamentos folhas e galhos (100 ppm), sementes (100, 500 e 1000 ppm) e frutos (500 e 1000 ppm).

Considerando a porcentagem de mortalidade cumulativa verificou-se que todos os tratamentos apresentaram uma porcentagem significativamente superior ao do controle, exceto o tratamento sementes 500 ppm (Figura 1). As maiores mortalidades foram observadas nos tratamentos galhos 1000 ppm (80%), folhas 1000 ppm (55%) e sementes 100 ppm (55%).

O número de ovos depositados por *A. gemmatalis* foi significativamente menor em todos os tratamentos com extratos de *C. canjerana*, quando comparados ao controle (Figura 2). Os extratos mais efetivos na inibição da oviposição foram folhas e galhos (1000 ppm) e todas as concentrações testadas dos extratos de sementes e frutos.

Tabela 1. Média (\pm EP) dos parâmetros biológicos de *Anticarsia gemmatalis* submetidas aos tratamentos com extratos brutos etanólicos de *Cabralea. canjerana*.

Tratamentos	Concentrações (ppm)	Tempo do ciclo larval (dias)	Mortalidade larval (%)	Peso pupal (g)	Emergência (%)	Deformação pupal (%)	Mortalidade pupal (%)
Controle	0	13,14 \pm 1,86c	16 \pm 2,68b	0,245 \pm 0,04a	68,00 \pm 1,67a	4,00 \pm 1,09b	16 \pm 3,03c
	100	13,25 \pm 1,67c	28 \pm 2,60b	0,230 \pm 0,04 a	36,00 \pm 1,09b	12,00 \pm 1,67b	36 \pm 2,28b
Folhas	500	16,20 \pm 1,85a	58 \pm 4,56a	0,234 \pm 0,03 a	24,00 \pm 1,09c	8,00 \pm 0,89b	10 \pm 2,00c
	1000	14,55 \pm 1,70b	60 \pm 4,00a	0,233 \pm 0,04 a	22,00 \pm 0,89c	8,00 \pm 1,67b	18 \pm 2,19c
Galhos	100	12,84 \pm 1,61c	22 \pm 2,60b	0,241 \pm 0,04 a	36,00 \pm 1,09b	8,00 \pm 0,89b	42 \pm 2,60b
	500	15,47 \pm 1,83a	54 \pm 2,68a	0,248 \pm 0,03 a	30,00 \pm 2,00c	6,00 \pm 1,78b	16 \pm 1,09c
	1000	15,91 \pm 1,31a	76 \pm 1,09a	0,252 \pm 0,03 a	10,00 \pm 0,00d	4,00 \pm 1,09b	14 \pm 1,78c
Sementes	100	9,06 \pm 0,99g	42 \pm 6,22a	0,212 \pm 0,03b	22,00 \pm 0,89c	22,00 \pm 3,84a	36 \pm 4,14b
	500	10,02 \pm 1,42f	16 \pm 4,38b	0,217 \pm 0,04b	52,00 \pm 0,89a	30,00 \pm 3,16a	32 \pm 3,57b
	1000	11,89 \pm 1,62d	8 \pm 1,67b	0,183 \pm 0,04c	40,00 \pm 1,41b	40,00 \pm 3,16a	52 \pm 2,60a
Frutos	100	10,86 \pm 1,56e	40 \pm 7,34a	0,231 \pm 0,04 a	40,00 \pm 1,41b	12,00 \pm 2,60b	18 \pm 2,60c
	500	10,95 \pm 1,80e	12 \pm 1,67b	0,238 \pm 0,04 a	40,00 \pm 2,82b	36,00 \pm 3,03a	48 \pm 2,60a
	1000	10,43 \pm 1,83e	12 \pm 2,60b	0,228 \pm 0,04 a	28,00 \pm 1,67c	32,00 \pm 2,19a	60 \pm 4,47a

Médias seguidas por letras diferentes em uma mesma coluna diferem entre si pelo teste de Skott Knott a 5% de significância.

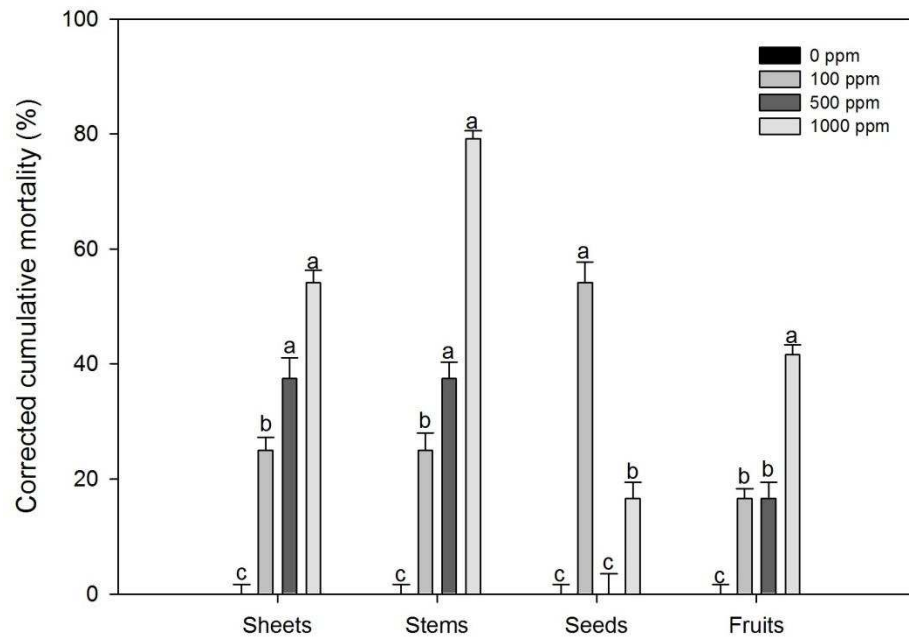


Figura 1. Mortalidade cumulativa corrigida (Abbott 1925) de *Anticarsia gemmatalis* submetida aos tratamentos com extratos etanólicos de *Cabrlea canjerana*. Cada barra corresponde a media \pm EP de cinquenta repetições. Diferentes letras indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

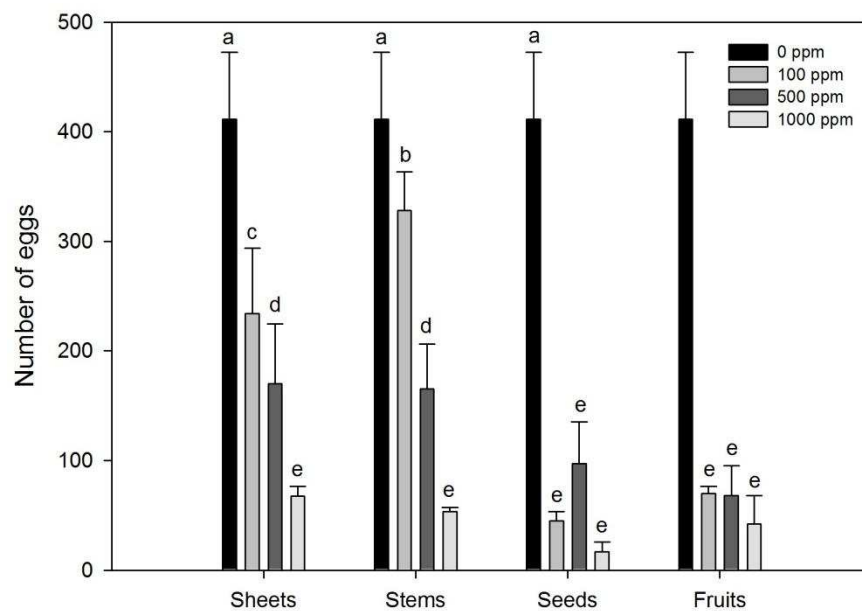


Figura 2. Número de ovos depositados por mariposas de *Anticarsia gemmatalis* submetidas aos tratamentos com extratos etanólicos de *Cabrlea canjerana*. Cada barra corresponde a media \pm EP de cinquenta repetições. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O efeito dos triterpenos isolados de *C. canjerana*, cabraleadiol e ocotilona sobre a duração do ciclo e a mortalidade larval de *A. gemmatalis* está apresentado na Tabela 2. Os tratamentos cabraleadiol e ocotilona 100 ppm reduziram a duração do desenvolvimento larval, enquanto os tratamentos ocotilona 10 e 50 ppm aumentaram significativamente esse tempo. Apenas cabraleadiol nas concentrações 10 e 50 ppm diferiram do tratamento controle em relação ao percentual de mortalidade larval, alcançando 30 e 26% de mortalidade de larvas, respectivamente.

Tabela 2. Média (\pm EP) da duração do ciclo larval e sobrevivência de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* submetidas aos tratamentos com os triterpenos isolados de *Cabralea. canjerana*.

Tratamentos	Concentrações (ppm)	Duração do ciclo larval (dias)	Mortalidade larval (%)
Controle	0	8,56 \pm 0,403 b	8,00 \pm 3,741b
Cabraleadiol	10	9,16 \pm 0,521 b	30,00 \pm 3,162a
	50	9,96 \pm 0,416 b	26,00 \pm 6,782 a
	100	4,56 \pm 0,294 c	4,00 \pm 2,449 b
Ocotilona	10	12,10 \pm 0,508 a	12,00 \pm 4,89 b
	50	11,90 \pm 0,477 a	8,00 \pm 3,74 b
	100	3,73 \pm 0,253 c	0,00 \pm 0,00 c

Médias seguidas por letras diferentes em uma mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância

3.2. Efeito dos extratos brutos etanólicos e dos triterpenos de *C. canjerana* nos parâmetros nutricionais dos insetos

Com base no gráfico biplot pode-se observar uma maior dispersão dos tratamentos folhas e galhos em relação às variáveis que definem os componentes (Figura 3 A e B). É possível visualizar que o tratamento folhas 100 ppm apresentou um maior consumo, crescimento relativo, taxa metabólica, digestibilidade aproximada e custo metabólico quando comparado aos outros tratamentos (controle, frutos 500 e 1000 ppm). No tratamento galhos 100, 500 e 1000 ppm houve menor consumo e menor taxa metabólica, por consequência o crescimento dos insetos foi reduzido em relação ao controle.

Os tratamentos sementes e frutos (100, 500 e 1000 ppm) ficaram mais próximos no gráfico biplot, no entanto, foram mais discriminados em relação ao controle (Figura 3 C e D). Foi possível observar que os insetos submetidos aos tratamentos sementes e

frutos consumiram mais alimento, apresentaram uma taxa metabólica, digestibilidade e custo metabólico maior. Porém a eficiência de conversão do alimento ingerido e digerido assim como o crescimento foi menor do que os insetos controle.

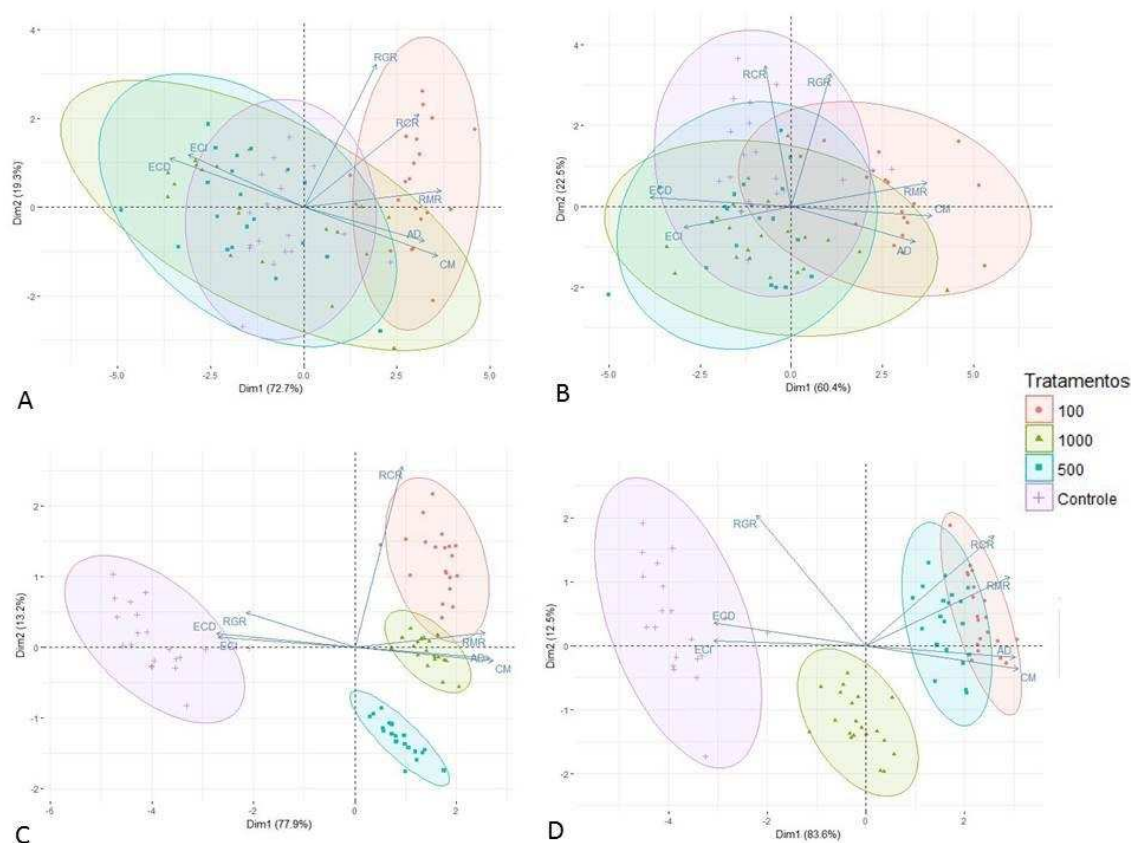


Figura 3. Gráfico de Biplot dos tratamentos dispersos entre os componentes principais para os índices nutricionais: taxa de consumo relativo (RCR), taxa de crescimento relativo (RGR), taxa metabólica relativa (RMR), digestibilidade aproximada (AD), eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI), eficiência de conversão do alimento digerido (ECD) e custo metabólico (CM). A: Tratamento Folhas, B: Tratamento Galhos, C: Tratamento Sementes e D: Tratamento Frutos.

Os tratamentos com o triterpeno cabraleadiol nas concentrações 10 e 100 ppm afetaram significativamente ($P < 0,05$) diversos parâmetros nutricionais dos insetos (Tabela 3). Quando insetos alimentaram-se de dietas com cabraleadiol 10 ppm observou-se aumento na RCR, RMR, AD e CM, e redução nos índices ECI e ECD. No tratamento cabraleadiol 100 ppm houve aumento na RGR, ECI e ECD, e redução na RMR, AD e CM. Não houve diferença significativa nos índices nutricionais dos insetos no tratamento cabraleadiol 500 ppm, exceto ECD, que foi reduzida.

Os índices nutricionais do tratamento com o triterpeno ocotilona foi avaliado apenas na concentração de 100 ppm, devido ao baixo rendimento do processo de purificação da substância, o que inviabilizou as análises nas outras concentrações. Assim, observou-se nos insetos submetidos a dietas com ocotilona 100 ppm aumento na RCR, AD e CM, enquanto os índices RMR, ECI e ECD reduziram significativamente (Tabela 3).

Tabela 3. Índices nutricionais de *Anticarsia gemmatalis* submetidas ao tratamento com os triterpenos isolados de *Cabralea canjerana* em diferentes concentrações.

Índices nutricionais	Concentração 10 ppm		
	Controle	Cabraleadiol	Ocotilona
RCR (g/g/dia)	0,697 ± 0,060b	0,995 ± 0,066a	-
RGR (g/g/dia)	0,120 ± 0,009a	0,105 ± 0,013a	-
RMR (g/g/dia)	0,395 ± 0,039b	0,704 ± 0,043a	-
AD (%)	73,749 ± 1,516b	81,383 ± 1,294a	-
ECI (%)	17,551 ± 0,992a	10,390 ± 1,009b	-
ECD (%)	24,111 ± 1,868a	12,818 ± 1,269b	-
CM (%)	75,888 ± 1,868b	87,181 ± 1,269a	-

Índices nutricionais	Concentração 50 ppm		
	Controle	Cabraleadiol	Ocotilona
RCR (g/g/dia)	0,697 ± 0,060a	0,735 ± 0,039a	-
RGR (g/g/dia)	0,120 ± 0,009a	0,110 ± 0,014a	-
RMR (g/g/dia)	0,395 ± 0,039a	0,435 ± 0,026a	-
AD (%)	73,749 ± 1,516a	74,266 ± 2,025a	-
ECI (%)	17,551 ± 0,992a	14,265 ± 1,313a	-
ECD (%)	24,111 ± 1,868a	19,883 ± 1,992b	-
CM (%)	75,888 ± 1,868a	80,116 ± 1,992a	-

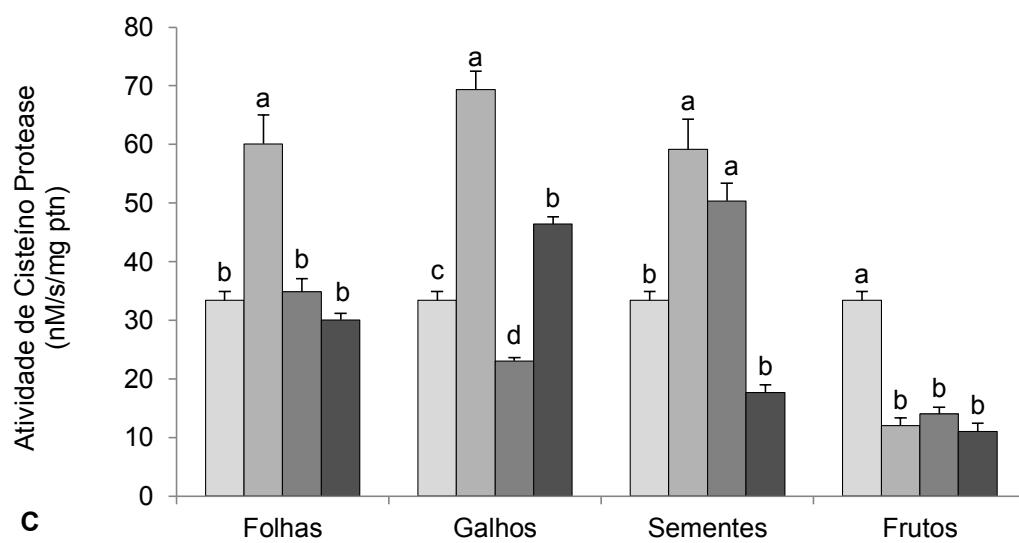
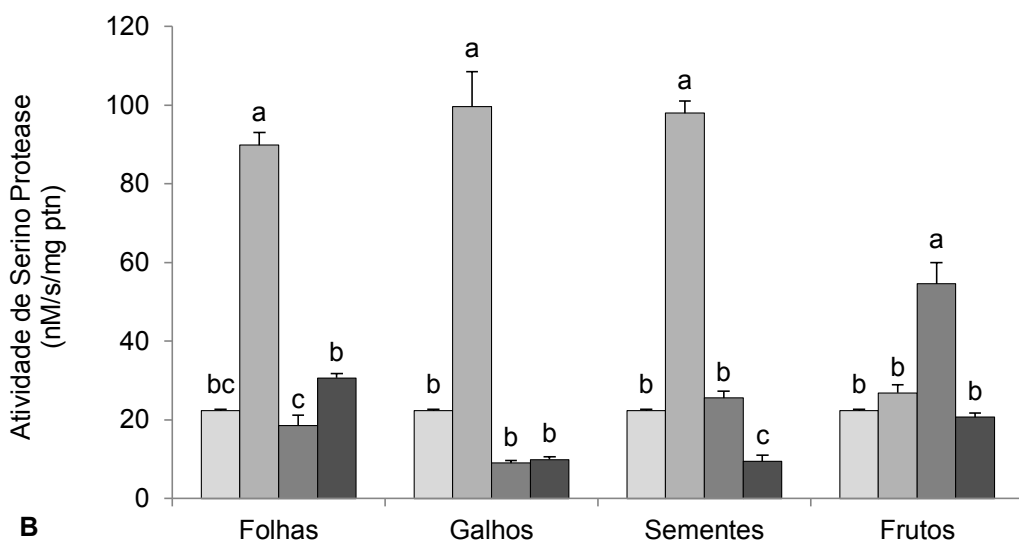
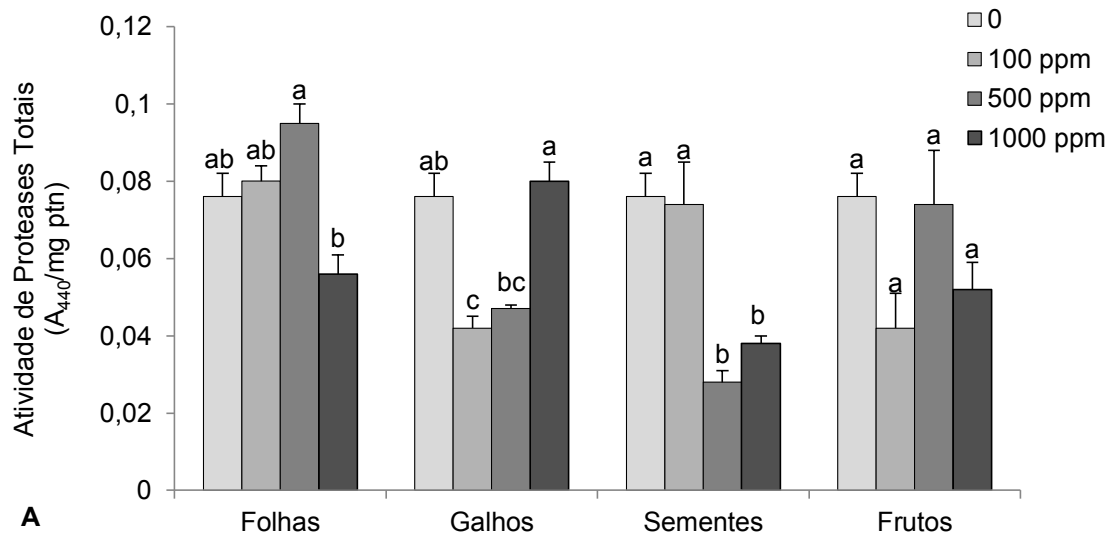
Índices nutricionais	Concentração 100 ppm		
	Controle	Cabraleadiol	Ocotilona
RCR (g/g/dia)	0,697 ± 0,060b	0,851 ± 0,042b	1,808 ± 0,329a
RGR (g/g/dia)	0,120 ± 0,009b	0,249 ± 0,019a	0,189 ± 0,031ab
RMR (g/g/dia)	0,395 ± 0,039 a	0,211 ± 0,030b	0,048 ± 0,012c
AD (%)	73,749 ± 1,516 b	53,792 ± 3,540c	87,182 ± 4,209a
ECI (%)	17,551 ± 0,992 b	29,142 ± 1,319a	11,543 ± 0,824c
ECD (%)	24,111 ± 1,868 b	55,574 ± 3,366a	13,144 ± 0,356c
CM (%)	75,888 ± 1,868 b	44,425 ± 3,366c	86,855 ± 0,356a

Médias (\pm EP) seguidas por letras diferentes em uma mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Índices nutricionais: taxa de consumo relativo (RCR), taxa de crescimento relativo (RGR), taxa metabólica relativa (RMR), digestibilidade aproximada (AD), eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI), eficiência de conversão do alimento digerido (ECD) e custo metabólico (CM).

3.3. Efeito dos extratos brutos etanólicos e dos triterpenos de *C. canjerana* nas atividades de enzimas digestivas dos insetos

A atividade de proteases totais de *A. gemmatalis* foi afetada pelos extratos etanólicos e pelos triterpenos. Os extratos galhos (100 ppm) e sementes (500 e 1000 ppm) reduziram significativamente a atividade de proteases totais (Figura 4 A). As atividades específicas de serino proteases e cisteíno proteases também foram alteradas pelos extratos brutos. Os tratamentos folhas, galhos e sementes (100 ppm) e frutos (500 ppm) aumentaram a atividade de serino proteases de *A. gemmatalis*, enquanto esta foi reduzida pelo de sementes 1000 ppm (Figura 4B). Em relação a cisteíno protease verificou-se aumento da atividade nos tratamentos folhas (100 ppm), galhos (100 e 1000 ppm), sementes (100 e 500 ppm), no entanto, houve redução na atividade nos tratamentos com galhos 500 ppm e frutos em todas as concentrações testadas (Figura 4 C). Os demais tratamentos não diferiram do controle.

As atividades de amilase e lipase também foram afetadas pelos extratos etanólicos (Figura 4 D e E). Houve aumento significativo da atividade amilásica em todas as concentrações de todos os tratamentos, exceto galhos 1000 ppm e sementes 500 ppm, que não diferiu do controle (Figura 4 D). Já a atividade lipásica variou entre os tratamentos, verificou-se aumento nos tratamentos folhas (100 e 500 ppm), galhos (100 e 1000 ppm) e sementes (100 ppm). Apenas no tratamento folhas 500 observou-se redução na atividade de lipase (Figura 4 E). Nos tratamentos folhas 1000 ppm, sementes 500 e 1000 ppm e em todas as concentrações do tratamento frutos não houve diferença significativa em relação ao controle (Figura 4 E).



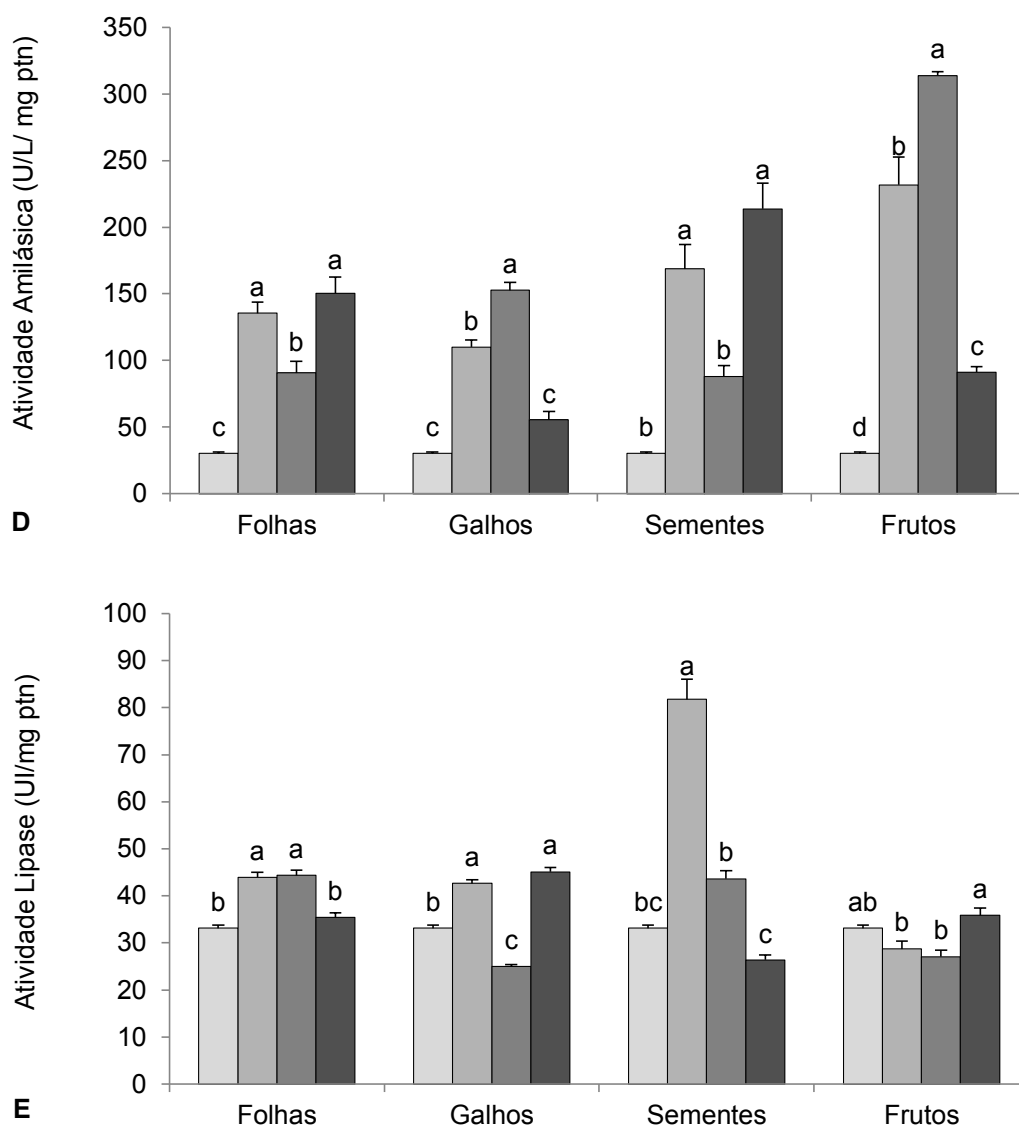
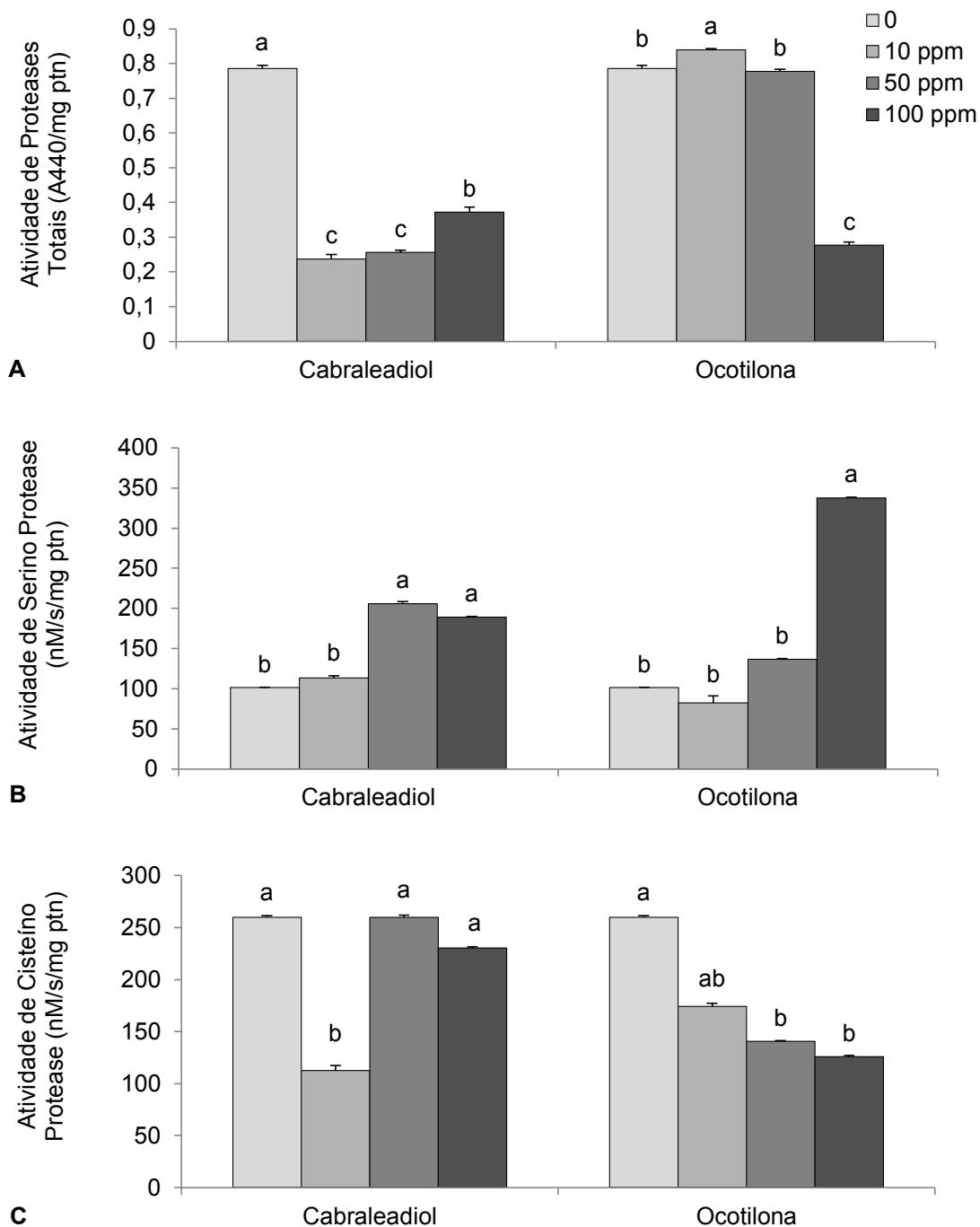


Figura 4. Efeito de extratos etanólicos brutos de *Cabralea canjerana* sobre a atividade das enzimas digestivas de *Anticarsia gemmatalis*, proteases totais (A), serino proteases (B), cisteíno proteases (C), amilase (D) e lipase (E). Médias com letras diferentes dentro do mesmo tratamento apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os triterpenos cabraleadiol e ocotilona afetaram todas as atividades das enzimas digestivas analisadas (Figura 5). A atividade de proteases totais foi aumentada apenas no tratamento ocotilona 10 ppm, nos tratamentos ocotilona 100 ppm e cabraleadiol em todas as concentrações verificou-se uma redução significativa (Figura 5 A). A atividade de serino protease aumentou nos tratamentos cabraleadiol 50 e 100 ppm e ocotilona 100 ppm (Figura 5 B), enquanto a cisteíno protease reduziu nos tratamentos cabraleadiol 10 ppm e ocotilona 50 e 100 ppm (Figura 5 C). A atividade amilásica reduziu no tratamento com cabraleadiol 10 e 50 ppm, enquanto que para a concentração de 100

ppm e todas os tratamentos com ocotilona aumentaram significativamente (Figura 5 D). Já a atividade de lipase foi reduzida nos tratamentos cabraleadiol 10 e 50 ppm e ocotilona 10 ppm e aumentada nos tratamentos cabraleadiol e ocotilona 100 ppm (Figura 5 E).



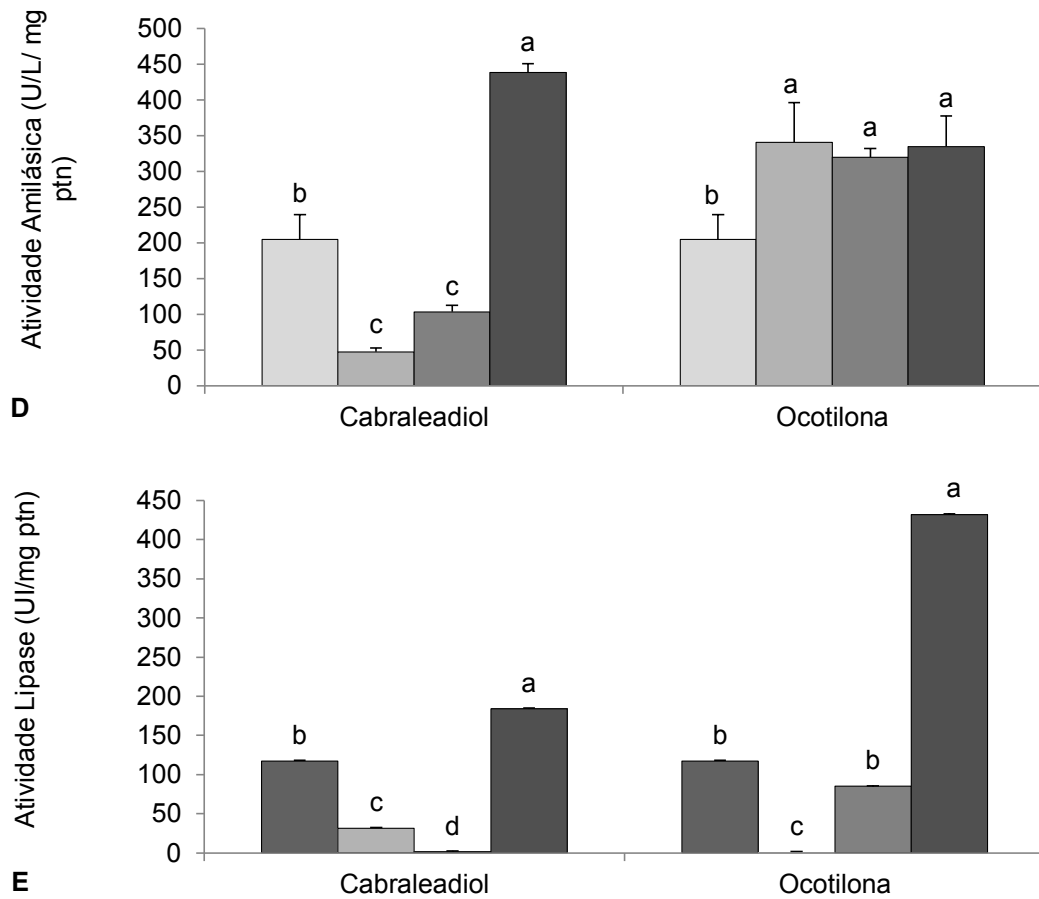


Figura 5. Efeito de triterpenos, ocotilona e cabraleadiol isolados de *Cabralea canjerana* sobre a atividade das enzimas digestivas de *Anticarsia gemmatalis*, proteases totais (A), serino proteases (B), cisteíno proteases (C), amilase (D) e lipase (E). Médias com letras diferentes dentro do mesmo tratamento apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4. DISCUSSÃO

Para se defenderem do ataque de insetos as plantas sintetizam uma variedade de moléculas, terpenos, alcalóides, fenóis e outros (Macedo et al., 2011). Dentre as famílias com espécies vegetais mais promissoras para o controle de pragas, está a Meliaceae (Jacobson, 1989), à qual pertence a espécie *Cabralea canjerana* ssp. *canjerana*, alvo de nossos estudos. Essa espécie é rica em limonóides e triterpenos (Braga et al., 2006), substâncias que possuem potencial atividade inseticida, especialmente contra lepidópteros, por ter propriedades repelentes e, ou, intoxicantes, além de interferir no crescimento, metamorfose e oviposição de insetos e causar deterrência alimentar (Schmutterer, 1987; Jacobson, 1989; Saxena, 1989).

Em geral, os extratos etanólicos de sementes e frutos foram os tratamentos que mais geraram prejuízos aos insetos, em relação ao ciclo larval, emergência e deformação de pupas. A mortalidade cumulativa foi superior ao controle para a maioria dos tratamentos com os extratos etanólicos. Dentre os triterpenos, somente cabraleadiol nas menores concentrações ocasionaram um aumento da mortalidade larval. Esse aumento das mortalidades pode ser devido a deficiências nutricionais provocadas pelos extratos, o que afetou seu correto desenvolvimento.

A redução do número de ovos para todos os tratamentos com extratos etanólicos possivelmente ocorreu devido à presença de substâncias que podem ter afetado a disponibilidade de nutrientes, ou até mesmo o correto desenvolvimento do sistema reprodutor.

Os extratos etanólicos de sementes e frutos ocasionaram juntamente com a redução no crescimento do inseto (RGR-Taxa de crescimento relativo); o aumento no consumo relativo (RCR-Taxa de consumo relativo) e da digestibilidade aproximada (AD), o que pode ser justificado como uma forma do inseto atender sua demanda nutricional, a fim de aumentar a taxa absoluta de absorção de nutrientes. Tal resultado corrobora com os estudos feitos com *A. gemmatalis* alimentadas com sementes de soja, em amendoim e dieta artificial (Bortoli et al., 2005) onde também houve o aumento do índice RCR. A eficiência de conversão do alimento ingerido e digerido (ECI e ECD) em relação ao controle foi reduzida, o que também foi observado por Nathan et al., (2006) ao avaliarem o efeito do extrato de neem e dos extratos das folhas de *Vitex negundo* L. (Verbenaceae), sobre *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Crambidae).

Ao avaliar os triterpenos isolados cabraleadiol 10 ppm e ocotilona 100 ppm, eles tiveram efeito similar ao ocorrido para sementes e frutos, onde foi reduzido ECI e ECD

e aumentado RCR e AD. Gazzoni & Tutida (1996) em seu trabalho também observaram a redução da conversão do alimento ingerido e digerido com o aumento do consumo de alimento, ao avaliar o efeito de diferentes genótipos de soja frente a *A. gemmatalis*.

A taxa de crescimento relativa (RGR) maior dos insetos submetidos aos tratamentos contendo 100 ppm de cabraleadiol, provavelmente ocorreu devido ao aumento na quantidade de alimento ingerido (RCR), o que também foi observada por Busato et al., (2002), ao verificar que este índice foi maior para o consumo de folhas de milho em relação às folhas de arroz por *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae).

Quanto ao custo para metabolizar o alimento (CM), os extratos de sementes e frutos, o triterpeno cabraleadiol e ocotilona, nas concentrações de 10 e 100 ppm respectivamente, gastaram uma maior quantidade de energia, o que também ocorreu nos trabalhos de Bortoli et al., (2005) e Busato et al., (2002).

As lagartas de lepidópteros alimentam-se vorazmente das culturas em que se hospedam para obter nutrientes para um bom crescimento (Tabatabaei et al., 2011); quando se adiciona extratos vegetais à dieta, observa-se a atividade de compostos inseticidas (Mordue (Luntz) & Nisbet, 2000). O principal constituinte da dieta das lagartas são proteínas, que através das proteases as digerem em aminoácidos. Sendo assim, qualquer interferência na digestão seja pela presença de inibidores enzimáticos ou substâncias deterrentes, pode levar a alterações no consumo alimentar, absorção de nutrientes e conseqüentemente no desenvolvimento do inseto (Tabatabaei et al., 2011), reduzindo alguns eventos fisiológicos, como a produção e a atividade de enzimas específicas (Smirle et al., 1996).

A atividade de proteases totais foi reduzida em boa parte dos tratamentos o que indica que os extratos e triterpenos afetam a digestibilidade protéica. Em relação às classes de proteases, observou-se que, em geral, os extratos etanólicos e triterpenos utilizados não apresentaram efeito de inibição sob as serino proteases, mas inibiram a atividade de cisteíno proteases, nos tratamentos com extrato de frutos e com o triterpeno ocotilona. O fato da atividade de serino proteases não ter sido inibida, e sim aumentada, deve-se a uma compensação do inseto, para minimizar os efeitos deletérios da inibição da cisteíno protease. Tais resultados podem também ter ocasionado o aumento no consumo de alimento (RCR), a redução da taxa de crescimento (RGR) e mortalidade.

Os efeitos negativos observados no desenvolvimento do inseto, provavelmente estão relacionados ao alimento consumido, devido as alterações que ocorreram nos índices nutricionais, como o aumento na taxa de consumo relativo. A presença de

substâncias deterrentes nos extratos e nos triterpenos testados, possivelmente alterou a disponibilidade de aminoácidos, fazendo com que o inseto se alimentasse mais para compensar tal déficit. Segundo Couture et al., (2016), quando o inseto se alimenta de dieta contendo toxinas, eles tentam consumir alimento suficiente para suprir sua necessidade nutricional e manter o crescimento.

A redução na atividade de proteases totais e o aumento de classes específicas de proteases, juntamente com o aumento no consumo alimentar e a redução na eficiência da conversão do alimento ingerido e digerido e da taxa de crescimento relativo, sugerem que os metabólitos presentes nos extratos etanólicos de galhos de *C. canjerana*, em reduzem a digestão proteica e inibem a atividade de proteases, afetando o crescimento e o desenvolvimento do inseto.

5. CONCLUSÕES

Todos os extratos etanólicos brutos e triterpenos testados sobre *A. gemmatalis* ocasionaram alteração em um ou mais parâmetro biológico analisado.

O extrato etanólico bruto de galhos de *C. canjerana*, na concentração de 1000 ppm, foi o que causou maior mortalidade de *A. gemmatalis*.

Os índices nutricionais foram mais afetados pelos extratos etanólicos brutos de sementes e frutos.

Os triterpenos isolados não causaram alterações como os extratos brutos, nos parâmetros biológicos e índices nutricionais.

Os extratos etanólicos brutos de folhas e galhos e o triterpeno cabraleadiol levaram a alterações nas atividades enzimáticas do intestino médio do inseto.

6. REFERÊNCIAS

- Abbott, W.S., 1925. A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18 (2), 265–267.
- Bernardi, O., Malvestiti, G.S., Dourado, P.M., Oliveira, W.S., Martinelli, S., Berger, G.U., Head, G.P., Omoto, C., 2012. Assessment of the high-dose concept and level of control provided by MON 87701 x MON 89788 soybean against *Anticarsia gemmatalis* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Pest Management Science* 68, 1083–1091.
- Bortoli, S.A., Dória, H.O.S., Albergaria, N.M.M.S., Murata, A.T., Vescove, H.V., 2005. Aspectos biológicos e nutricionais de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) em soja, amendoim e dieta artificial. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* 31, 171–178.
- Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
- Braga, P.A.C., Soares, M.S., da Silva, M.F.G.F., Vieira, P.C., Fernandes, J.B., Pinheiro, A.L., 2006. Dammarane triterpenes from *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae): Their chemosystematic significance. *Biochemical Systematics and Ecology* 34, 282–290.
- Busato, G.R., Grützmacher, A.D., Garcia, M.S., Giolo, F.P., Martins, A.F. 2002. Consumo e Utilização de Alimento por *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) Originária de Diferentes Regiões do Rio Grande do Sul, das Culturas do Milho e do Arroz Irrigado. *Neotropical Entomology* 31 (4), 525–529.
- Caraway, W.T., 1959. A stable starch substrate for the determination of amylase in serum and other body fluids. *American Journal of Clinical Pathology* 32, 97–99.
- Chermenskaya, T.D., Stepanycheva, E.A., Schenikova, A.V., Chakaeva, A. S., 2010. Insectoacaricidal and deterrent activities of extracts of Kyrgyzstan plants against three agricultural pests. *Industrial Crops and Products* 32, 157–163.
- Cherry, I.S., Crandall Jr., L.A., 1932. The specificity of pancreatic lipase: its appearance in the blood after pancreatic injury. *American Journal of Physiology* 100, 266–273.

- Couture, J.J., Mason, C.J., Habeck, C.W., Lindroth, R.L., 2016. Behavioral and morphological responses of an insect herbivore to low nutrient quality are inhibited by plant chemical defenses. *Arthropod-Plant Interactions* 10, 341–349.
- Da Silva, M.F.G.F., Gottlieb, O.R., Dreyer, D.L., 1984. Evolution of Limonoids in the Meliaceae. *Biochemical Systematics and Ecology* 12 (3), 299–310.
- Erlanger, B. F., Kokowsky, N., Cohen, W., 1961. The Preparation and Properties of Two New Chromogenic Substrates of Trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 95, 271–278.
- Gazzoni, D.L., Tutida, F., 1996. Efeitos de genótipos resistentes e suscetíveis sobre a biologia da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis* Hübner). *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 31 (10), 709–714.
- Hoffman-Campo, C.B., Oliveira, E.B., Moscardi, F., 1985. Criação massal da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*). Embrapa-CNPSO, Documentos, 10.
- Isman, M.B., 2017. Bridging the gap: Moving botanical insecticides from the laboratory to the farm. *Industrial Crops & Products* 110, 10–14.
- Jamwal, K., Bhattacharya, S., Puri, S., 2018. Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 9, 26–38.
- Jacobson, M., 1989 Botanical pesticides. Past, present and future. In: Arnason, J.T., Philogene, B.J.R., Morand, P. *Insecticides of plant origin*. Washington: American Chemical Society, cap.1, 1–7.
- Kéita, S.M., Vincent, C., Schmit, J-P., Arnason, J.T., Bélanger, A., 2001. Efficacy of essential oil of *Ocimum basilicum* L. and *O. gratissimum* L. applied as an insecticidal fumigant and powder to control *Callosobruchus maculatus* (Fab.) [Coleoptera: Bruchidae]. *Journal of Stored Products Research* 37, 339–349.
- Kunitz, M., 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor: II – General Properties. *Journal of General Physiology* 30 (4), 291–310.
- Macedo, M.L.R., Freire, M.G.M., Kubo, C.E.G., Parra, J.R.P., 2011. Bioinsecticidal activity of *Talisia esculenta* reserve protein on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Anticarsia gemmatalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology (C)* 153, 24–33.
- Manly, B.J.F., 2008. *Métodos estatísticos multivariados: uma introdução*. 3 ed. Porto Alegre: Bookman, 229p.

- Maheswaran, R., Ignacimuthu, S., 2013. Bioefficacy of essential oil from *Polygonum hydropiper* L. against mosquitoes, *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 97, 26–31.
- Marques, L.H., Santos, A.C., Castro, B.A., Moscardini, V.F., Rosseto, J., Silva, O.A.N., Zobiolo, L.H.S., Valverde-Garcia, P., Babcock, J.M., Storer, N.P., Rule, D.M., Fernandes, O.A., 2017. Field evaluation of soybean transgenic event DAS-81419-2 expressing Cry1F and Cry1Ac proteins for the control of secondary lepidopteran pests in Brazil. *Crop Protection* 96, 109–115.
- Mata, R.F.F., Lomonaco, C., 2013. Toxicidade, deterrência e repelência de extratos aquosos de *Cabralea canjerana* ssp. *polytricha* (A. Juss.) Penn. (Meliaceae) sobre o curuquerê-da-couve *Ascia monuste orseis* (Godart) (Lepidoptera: Pieridae). *Revista Árvore* 37 (2), 361–368.
- Melo, A.T.O., Coelho, A.S.G., Pereira, M.F., Blanco, A.J.V., Franceschinelli, E.V., 2014. High genetic diversity and strong spatial genetic structure in *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae): implications to Brazilian Atlantic Forest tree conservation. *Natureza & Conservação* 12 (2), 129–133.
- Mordue (Luntz), A.J., Nisbet, A.J., 2000. Azadirachtin from the Neem Tree *Azadirachta indica*: its Action Against Insects. *Entomological Society of Brazil* 29 (4), 615–632.
- Nathan, S.S., Kalaivani, K., Murugan, K., 2006. Effect of biopesticides on the lactate dehydrogenase (LDH) of the rice leaf folder, *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 65, 102–107.
- Oliveira, M.G.A., Simone, S.G., Xavier, L.P., Guedes, R.N.C., 2005. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. *Comparative Biochemistry and Physiology (B)*, 140, 369–380.
- Panizzi, A.R., 2013. History and Contemporary Perspectives of the Integrated Pest Management of Soybean in Brazil. *Neotropical Entomology*. 42, 119–127.
- Pilon, A.M., Oliveira M.G.A., Guedes, R.N.C., 2006. Protein digestibility, protease activity and post-embryonic development of velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatilis*) exposed to the trypsin-inhibitor benzamidine. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 86, 23–29.
- Ponsankar, A., Vasantha-Srinivasan, P., Senthil-Nathan S., Thanigaivel, A., Edwin, E-S., Selin-Rani, S., Kalaivani, K., Hunter, W.B., Alessandro, R.T., Abdel-

- Megeed, A., Paik, C-H., Duraipandiyar, V., Al-Dhabi, N.A., 2016. Target and non-target toxicity of botanical insecticide derived from *Couroupita guianensis* L. flower against generalist herbivore, *Spodoptera litura* Fab. and an earthworm, *Eisenia foetida* Savigny. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 133, 260–270.
- Sarria, A.L.F., Soares, M.S., Matos, A.P., Fernandes, J.B., Vieira, P.C., Da Silva, M.F.G.F., 2011. Effect of Triterpenoids and Limonoids Isolated from *Cabranea canjerana* and *Carapa guianensis* (Meliaceae) against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Zeitschrift für Naturforschung (C)*, 66, 245–250.
- Saxena, R.C., 1989. Insecticides from neem. In Arnason, J.T., Philogene, B.J.R., Morand, P. (Ed.). *Insecticides of plant origin*. Washington: American Chemical Society, cap. 9, 110–129.
- Scriber, J.M., Slansky Jr., F., 1981. The nutritional ecology of immature insects. *Annual Review of Entomology* 26, 183–211.
- Schmutterer, H. 1987. Insect growth-disrupting and fecundity-reducing ingredients from the neem and chynaberry trees. In Morgan, E.D., Mandava, N.B. *CRC Handbook of Natural Pesticides: insect growth regulators, Part B*. Boca Raton: CRC Press 3, 119–167.
- Smaniotta, L., Moura, N.F., Denardin, R.B.N., Garcia, F.R.M., 2010. Bioatividade da *Cabranea canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae) no controle de adultos de *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera, Bruchidae) em laboratório. *Biotemas* 23 (2), 31–35.
- Smirle, M.J., Lowery, D.T., Zurowski, C.L., 1996. Influence of Neem Oil on Detoxication Enzyme Activity in the Obliquebanded Leafroller, *Choristoneura rosaceana*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 56, 220–230.
- Tabatabaei, P.R., Hosseinaveh, V., Goldansaz, S.H., Talebi, K., 2011. Biochemical characterization of digestive proteases and carbohydrases of the carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller) (Lepidoptera:Pyralidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology* 14, 187–194.
- Visôto, L.E., Oliveira, M.G.A., Ribon, A.O.B., Mares-Guia, T.R., Guedes, R.N.C., 2009. Characterization and Identification of Proteolytic Bacteria from the Gut of the Velvetbean Caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Entomology* 38 (4), 1078–1085.
- Xavier, L.P., Oliveira, M.G.A., Guedes, R.N.C., Santos, A.V., Simone, S.G., 2005. Trypsin-like activity of membrane-bound midgut proteases from *Anticarsia*

gemmatalis (Lepidoptera: Noctuidae). European Journal of Entomology 102 (2), 147–153.

Waldbauer, G. P., 1968. The consumption and utilization of food by insects. Advances in Insect Physiology 5, 229–288.

CAPÍTULO II

POTENCIAL DE INIBIDORES DE PROTEASES PARA O CONTROLE DE *Diaphorina citri* (KUWAYAMA) (HEMIPTERA: LIVIIDAE)

RESUMO

Os inibidores de protease compreendem uma classe abundante de proteínas, que prejudicam a atividade proteolítica dos organismos que entram em contato com o mesmo. Este estudo avaliou pela primeira vez o efeito de diferentes inibidores de proteases sobre o ciclo de vida do psilídeo-dos-citros *Diaphorina citri* e caracterizou a principal classe de protease atuante nesse inseto, cisteíno protease. Para isso os insetos foram colocados em gaiolas com plantas de murta-de-cheiro, pulverizadas com solução preparada a partir de cada inibidor. Os resultados mostraram que todos os inibidores acarretaram em um aumento na mortalidade de ninfas, sendo que o inibidor E64 apresentou também efeitos adversos na emergência, oviposição e viabilidade dos ovos. Resultados da caracterização enzimática de *D. citri* mostraram que o pH e temperatura de maior atividade foram 6,0 e 25°C, respectivamente. Ao analisar o efeito dos inibidores na atividade de cisteíno protease, verificou-se que a enzima foi insensível a aprotinina e berenil e que, apenas o E64 (50 µM) reduziu significativamente a atividade enzimática. Os valores de $V_{\max \text{ app}}$ e $K_{M \text{ app}}$ foram de 31,15 nM s⁻¹ e 0,028 mM, respectivamente. Esses resultados sugerem que os psilídeos utilizam cisteíno proteases acídicas para a digestão de proteínas. Com base nesses resultados pode-se inferir que o inibidor E64, mostrou potencial para o controle de *D. citri*.

Palavras-chave: fitossanidade, psilídeo-do-citros, Huanglongbing, caracterização bioquímico-cinética

ABSTRACT

Protease inhibitors comprise an abundant class of proteins, which impairs the proteolytic activity of the organisms that come in contact therewith. This study evaluated for the first time the effect of different protease inhibitors on the citrus psyllid life cycle *Diaphorina citri* and characterized the main class of protease acting on this insect, cysteine protease. For this, the insects were placed in cages with plants of smelt, sprayed with solution prepared from each inhibitor. The results showed that all inhibitors led to an increase in nymph mortality, and the E64 inhibitor also had adverse effects on egg emergence, oviposition and egg viability. Results of the enzymatic characterization of *D. citri* showed that the pH and temperature of higher activity were 6.0 and 25°C, respectively. When analyzing the effect of inhibitors on cysteine protease activity, the enzyme was found to be insensitive to aprotinin and berenil and that only E64 (50 µM) significantly reduced enzyme activity. The values of $V_{\max \text{ app}}$ and $K_{\text{M app}}$ were 31.15 nM s⁻¹ and 0.028 mM, respectively. These results suggest that the psyllids use cysteine acidic proteases for the digestion of proteins. Based on these results it can be inferred that the inhibitor E64 showed potential for the control of *D. citri*.

Keywords: phytosanitary, citrus psyllid, Huanglongbing, biochemical-kinetic characterization

1. INTRODUÇÃO

A citricultura enfrenta diversos contratemplos, em especial, os associados a fatores bióticos como é o caso da doença Huanglongbing (HLB) (Halbert & Manjunath, 2004), popularmente conhecida como amarelão do citros. Essa doença foi relatada no Brasil em março de 2004, pela primeira vez, em propriedades do estado de São Paulo (Teixeira et al., 2005), e segundo a Fundecitrus (2018), é considerada a mais destrutiva no país, pois ainda não há no mercado variedades ou porta-enxertos resistentes a ela.

A HLB é associada a bactérias não cultiváveis do gênero *Candidatus Liberibacter* spp., na forma americana (*Candidatus Liberibacter americanus*) e na forma asiática (*Candidatus Liberibacter asiaticus*) (Bové, 2006) que colonizam o floema da planta causando o retardamento no crescimento (Da Graça, 1991). Após a infecção, demora de seis a 12 meses para aparecerem os primeiros sintomas (Bové, 2006). Dentre os principais sintomas que as plantas apresentam estão o aparecimento de brotos amarelados e folhas com padrão de manchas amarelas e verdes; queda excessiva, deformidade e assimetria de frutos; além do abortamento de sementes (Gottwald et al., 2007).

As plantas contaminadas não podem ser tratadas e a poda é inútil e perigosa porque as brotações subsequentes são fonte para novas infecções. Atualmente, os pomares acometidos pela HLB são totalmente eliminados, acarretando grandes prejuízos ao produtor e ao agronegócio (Fundecitrus, 2018).

As bactérias que causam o HLB são disseminadas pelos psílídeos-dos-citros *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) (Capoor et al., 1967), que é capaz de manter e transmitir a bactéria durante todo o seu ciclo de vida (Gottwald et al., 2007). Inicialmente, *D. citri* foi identificado como uma praga secundária e relatado pela primeira vez no Brasil em 1942 (Costa Lima, 1942). Hoje esse inseto está presente nas principais regiões produtoras de citros do Brasil e é considerada uma das principais pragas da citricultura.

O psílídeo é um inseto sugador que vive em plantas da família Rutaceae, principalmente falsa-murta (*Murraya* spp.) e citros. Suas preferências para alimentação e oviposição são nos brotos, sobre e entre as folhas dobráveis dessas plantas. Após a eclosão dos ovos, as ninfas passam por cinco ínstares, alcançando a fase adulta. A duração do seu ciclo de vida varia de 15 a 47 dias, a depender da estação (Mead, 1977).

Para identificar as áreas invadidas pelos psilídeos a forma mais recomendada é a amostragem (Hall et al., 2010)., após a vistoria, a supressão da população do inseto vetor é feita por meio do uso de diferentes métodos de controle (Qureshi & Stansly, 2008), como a aplicação de inseticidas sistêmicos e de contato (Bové, 2006).

Há inúmeros relatos do uso potencial de inibidores de proteases no controle de insetos praga, em especial da ordem Lepidoptera e Coleoptera (Jayachandran et al., 2013; Marathe et al., 2016; Patil et al., 2016; Ashouri et al., 2017), entretanto pouco se sabe em relação a insetos da ordem Hemiptera.

Os inibidores de proteases compreendem uma classe abundante de proteínas sintetizadas especialmente por plantas (Ussuf et al., 2001), que afetam o crescimento e desenvolvimento do inseto, pela inibição da atividade de proteases digestivas, acarretando uma privação de nutrientes e antibiose (Jadhav et al., 2016). Os inibidores de proteases interagem no domínio catalítico da protease alvo específica, formando um complexo estável enzima-inibidor, prejudicando a atividade proteolítica. As proteases, por sua vez, são enzimas responsáveis pela regulação da síntese proteica e fornecimento de aminoácidos livres para o crescimento e desenvolvimento normal dos insetos (Lawrence & Koundal, 2002).

Não há na literatura relatos sobre o efeito de inibidores de protease na biologia e bioquímica de *D. citri*. Dessa forma, o presente trabalho propõe avaliar a ação dos inibidores de protease: Antipaina, Aprotinina, Bowman-Birk Inhibitor (BBI), Diminazene aceturate (Berenil), E64, Leupeptina, Quimostatina e Inibidor de tripsina da soja do tipo Kunitz (SKTI) sobre os parâmetros biológicos de *D. citri*. Além disso, caracterizar bioquímico e cineticamente cisteíno-proteases, a fim de controlar a população desse inseto.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Entomologia e Fitopatologia (LEF) da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP.

2.1. Obtenção de mudas de *M. paniculata*

As mudas de *M. paniculata* utilizadas para a criação e experimentos foram obtidas de viveiros comerciais da região de Campinas-SP. As mudas utilizadas na criação possuíam de 5 a 10 perfilhos, com altura média de 50 cm, cultivadas em sacolas plásticas de 5 litros com solo e substrato. Para os experimentos as mudas foram cultivadas em tubetes e em copos plásticos descartáveis de 500 mL com substrato comercial. Todas as plantas foram mantidas em casa de vegetação, isentas de aplicação de inseticidas. As mudas foram podadas e adubadas, 10 a 15 dias antes de sua utilização, para o estímulo do surgimento de brotos ideais para o desenvolvimento dos insetos (Diniz, 2013).

2.2. Criação de insetos

D. citri foi criada em mudas de plantas de murta-de-cheiro (*M. paniculata*) com 25 a 30 cm de altura, que apresentaram brotos, ideais para a oviposição e desenvolvimento das ninfas. Essas mudas foram colocadas em gaiolas teladas, contendo adultos do psíldeo e mantidas em sala de criação climatizada a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotofase de 12h.

2.3. Inibidores de proteases

Os inibidores de protease: Antipaína (N-N α -Carbonyl-Arg-Val-Arg-al)-Phe), Aprotinina (Aprotinin from bovine lung), BBI (Bowman-Birk Inhibitor), benzamidina, berenil (Diminazene aceturate), E64 (*trans*-Epoxy succinyl-L-leucylamido-(4-guanidino) butane), Leupeptina (Acetyl-Leu-Leu-Arg-al hydrochloride), Quimostatina (n-(N α -Carbonyl-Cpd-X-Phe-al)-Phe (Cpd=capreomycidine) (capreomycidine = [S,S]- α -(2-Iminohexahydro-4-pyrimidyl)glycine), SKTI (Kunitz Inhibitor) e o substrato cromogênico N-benzoil-L-arginil *p*-nitroanilina (L-BApNA) foram obtidos da Sigma-Aldrich Brasil Ltda (São Paulo, SP, Brasil).

2.4. Bioensaios

2.4.1. Efeito dos IPs sobre ninfas de *Diaphorina citri*

O efeito dos IPs sobre as ninfas de *D. citri* foi avaliada em ninfas de 3º instar. Seis mudas de *M. paniculata* para cada tratamento cresceram em tubetes contendo substrato e foram podadas para estimular o crescimento. Após o surgimento dos brotos (2 a 3 cm de comprimento), cada tubete com muda de *M. paniculata* foi acondicionado em uma gaiola elaborada com estrutura plástica, identificada e disposta para o experimento em sala de criação, conforme descrito a seguir.

Um copo plástico transparente de 500 mL vazio (copo 1) teve em sua base um orifício cortado com estilete de cerca de 3 cm de diâmetro. Outro copo (copo 2), de igual volume, teve um orifício cortado com estilete no mesmo tamanho de seu diâmetro inferior salvaguardando 1 cm das bordas, que foi fechado por tecido tipo voil. Um tubete contendo uma muda da planta foi introduzido no interior dessa estrutura montada e fixado, pela borda do tubete, ao orifício cortado no copo 1. Um círculo de papel filtro, cortado com o mesmo diâmetro do copo, foi disposto entre a planta e o solo do tubete a fim de que fossem coletados insetos mortos. Os copos 1 e 2 foram posicionados de modo a coincidir suas bocas. A fixação e a vedação completa dos copos nesse local foram realizadas com Parafilm. Um copo plástico de 500 mL com tampa (copo 3), teve um orifício cortado com estilete em sua tampa, até alcançar o mesmo diâmetro do orifício do copo 1. O copo 1 foi fixado na tampa do copo 3 utilizando cola quente. Posteriormente, cada uma das seis plantas de cada tratamento foi pulverizada com 5 mL das soluções dos inibidores (Tabela 1), com o auxílio de um aerógrafo acoplado a uma bomba de pressão constante 1,2 kgf/cm, até o ponto de escorrimento. Após a secagem cada repetição foi infestada com 10 ninfas de terceiro instar de *D. citri* (Ribeiro et al., 2015). A água destilada adicionada do espalhante adesivo a 0,01% (Triton X-100) usada para o preparo das soluções, foi considerada como solução controle.

Tabela 1. Inibidores de proteases e respectivas concentrações testadas.

Inibidores	Concentrações	Referências
Antipaina	1000 μ M	Oppert et al., 2003
Aprotinina	50 μ M	Burguess et al., 2002
BBI	5 mg/L	Prasad et al., 2010
Berenil	0,5 g/L	Souza 2015
E64	27,9 μ M	Oppert et al., 2003
Leupeptina	1000 μ M	Oppert et al., 2003
Quimostatina	500 μ M	Bown et al., 1997
SKTI	20 μ M	Bown et al., 1997

Após a aplicação dos tratamentos as mudas foram levadas para a sala de criação com condições controladas ($26 \pm 2^\circ\text{C}$ e $70 \pm 10\%$ UR). A mortalidade das ninfas em cada unidade experimental foi avaliada após 24, 48, 72 e 96 h da infestação. Após 17 dias foi avaliado o número de adultos que emergiram. As ninfas e os adultos que não mostraram nenhuma reação ao toque foram considerados mortos.

2.4.2. Efeito residual dos IPs em *Diaphorina citri*

Para avaliar a toxicidade residual dos inibidores de proteases em *D. citri*, foram utilizadas mudas de *M. paniculata*, cultivadas em copos descartáveis de 500 mL, contendo substrato e dispostas em gaiolas como descrito anteriormente. Cada muda foi podada a cinco centímetros para o estímulo do crescimento. Após a emergência dos brotos (2 a 3 cm de comprimento), as mudas foram submetidas a aplicação dos inibidores, via pulverização, com 5 mL de solução dos tratamentos que apresentaram maior efeito tóxico no experimento anterior. A água destilada com o espalhante adesivo a 0,01% (Triton X-100) usados para o preparo das soluções foi considerado o controle.

Os tratamentos foram aplicados com o auxílio de um aerógrafo acoplado a uma bomba de pressão constante 1,2 kgf/cm. Após a aplicação dos tratamentos, as mudas foram mantidas em condições controladas ($26 \pm 2^\circ\text{C}$ e $70 \pm 10\%$ UR). Cinco repetições, com 25 insetos adultos cada uma, foram utilizadas por tratamento (Chen et al., 2017). Em cada unidade experimental foi avaliado o ciclo dos adultos até a morte e o efeito dos inibidores sobre o número de ovos, viabilidade destes e a mortalidade de ninfas. Sempre após a constatação da morte do adulto ou ninfa, o mesmo foi retirado da gaiola.

2.5. Avaliação dos parâmetros bioquímicos

Para realização da avaliação de proteases totais, adultos de *D. citri* foram expostos a plantas de *M. paniculata* pulverizadas com os inibidores: Aprotinina, Berenil e E64, que apresentaram melhores resultados no experimento inicial. Para as outras avaliações, os insetos utilizados foram obtidos diretamente da criação, estando assim isentos de contato com inibidores. Para avaliar as proteases totais foram utilizadas três repetições por tratamento, cada uma com 100 insetos e para as outras análises foram utilizados 300 insetos por repetição. Após a coleta da quantidade necessária, foram colocados em microtubos de 2 mL e levados ao freezer, juntamente com 1 mL de solução tampão HCl 10^{-3} M, para que ocorresse a morte súbita dos mesmos. Após a morte, foram inteiramente macerados (para que ocorresse o rompimento celular). O homogenato foi centrifugado a 12.000 rpm, durante 10 minutos, e o sobrenadante (Extrato Enzimático Bruto), foi mantido a 4°C até o final dos ensaios (Oliveira et al., 2005).

Nos ensaios bioquímicos foram avaliados o teor de proteínas e as atividades de proteases totais e cisteíno proteases. Todos os experimentos bioquímicos foram realizados em uma série de quatro repetições.

2.5.1. Determinação do teor de proteínas

O teor de proteínas totais foi determinado pelo método de Bradford (1976), utilizando soroalbumina bovina (BSA) como padrão na concentração de 0,2 mg/mL.

2.5.2. Atividade das proteases totais

Atividade de proteases totais foi determinada pelo método de Kunitz (1947), que consiste na verificação da hidrólise do substrato azocaseína, a 440 nm, pelas proteases presentes no extrato. Amostras de 25 µL de azocaseína a 2 % foram incubadas a 37 °C com 30 µL do extrato enzimático em tampão Tris-HCl, pH 8,0, por 30 min. Após esse tempo, 120 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 10 % foram adicionados e a mistura deixada em repouso, por 15 minutos, em banho de gelo. Posteriormente, foi realizada uma centrifugação, por 5 minutos, a 8.000 rpm. Do sobrenadante, foram transferidos 100 µL para um tubo contendo 140 µL de NaOH 0,1 M e a determinação da absorbância foi realizada a 440 nm.

2.6. Caracterização dos parâmetros bioquímico-cinéticos de cisteíno protease

A cisteíno protease é a classe de enzimas proteolíticas mais proeminente em Hemiptera (Silva et al., 2012), além disso, cisteíno protease apresentou maior atividade em *D. citri* em estudos anteriores, sendo assim foi realizada a caracterização dos seus parâmetros bioquímicos-cinéticos.

A atividade de cisteíno-proteases foi realizada pelo método descrito por Erlanger et al., (1961) modificado, utilizando o substrato cromogênico L-BApNA na concentração final de 0,5 mM, a 25 °C em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo 20 mM de CaCl₂ e 5 mM do agente redutor Ditioneitol (DTT). Ao extrato enzimático foram adicionados 100 µL do inibidor de serino protease, benzamidina, na concentração final de 1 mM, a fim de se medir apenas a atividade de cisteíno proteases. As velocidades iniciais foram determinadas pela medida da absorvância a 410 nm em função do tempo (2,5 min), utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de 8800 (M⁻¹ x cm⁻¹) para o produto.

Para avaliar o efeito da temperatura na atividade, foi utilizado banho-maria e espectrofotômetro Scanning UV-VIS modelo Nicolet Evolution 100 com sistema de temperatura controlada e as temperaturas variarão de 10 a 50°C (Mendonça et al., 2011). O efeito do pH na atividade enzimática foi determinado com a temperatura que apresentou melhor atividade, utilizando a faixa de pH de 4,0 a 10,0.

A determinação dos parâmetros cinéticos K_M app e V_{max} app foi realizada na temperatura e com o tampão de pH que apresentou maior atividade (25°C e pH 6,0), A faixa de concentração utilizada do substrato L-BApNA foi de 0,1 a 2,5 mM. Os parâmetros cinéticos, no estado estacionário, serão obtidos por meio de regressão não-linear, empregando-se o programa de computação Sigma Plot 10.0 (Mendonça et al., 2011).

2.7. Avaliação do efeito dos inibidores de proteases

Para avaliar o efeito de inibidores de protease sobre a atividade de cisteíno proteases de *D. citri*, foi utilizado a temperatura e o pH que apresentaram maior atividade. A concentração de L-BApNA utilizada foi de 0,5 mM e o protocolo seguido foi o mesmo descrito no item 2.6. As concentrações avaliadas do inibidor de serino protease Aprotinina foi de 0,5 µM a 4 µM, do inibidor sintético de serino protease

Berenil de 5 mg/L a 25 mg/L e do inibidor de cisteíno protease E64 de 1 μ M a 50 μ M. Foram avaliadas quatro repetições por tratamento.

2.8. Análises Estatísticas

Foi utilizado para todas as análises o delineamento inteiramente casualizado. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e comparados pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Para determinação do efeito do pH e temperatura sobre a atividade de cisteíno-proteases foi utilizada estatística descritiva.

3. RESULTADOS

3.1. Efeito tóxico dos IPS sobre ninfas de *D. citri*

Avaliando o efeito dos inibidores de proteases sobre a mortalidade de ninfas de *D. citri* observou-se que todos os inibidores testados causaram mortalidade média superior ao controle (Figura 1), no entanto, os que apresentaram diferença significativa foram Antipaina, Aprotinina, Berenil, E64 e Quimostatina.

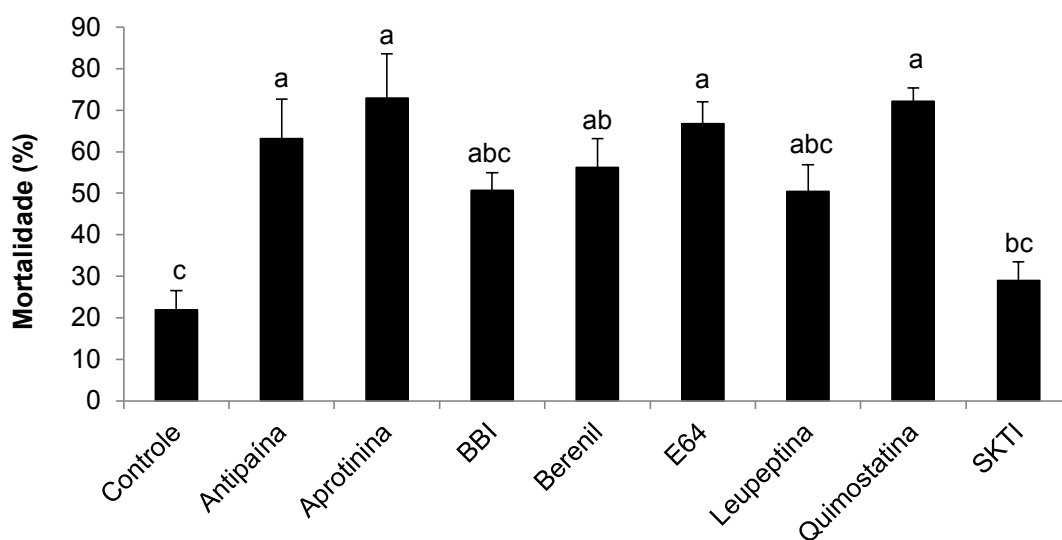


Figura 1. Mortalidade média (\pm EP) de ninfas de *Diaphorina citri* alimentadas com plantas pulverizadas com diferentes inibidores de protease. Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

A partir do número de ninfas colocadas em cada planta e do número de insetos que atingiram a fase adulta, foi calculada a porcentagem de emergência para cada tratamento. Houve redução significativa em relação ao controle na porcentagem de emergência dos insetos para todos os tratamentos com exceção do inibidor BBI (Figura 2). Os inibidores que causaram maior redução significativa na emergência foram Aprotinina, Berenil, E64 e Quimostatina.

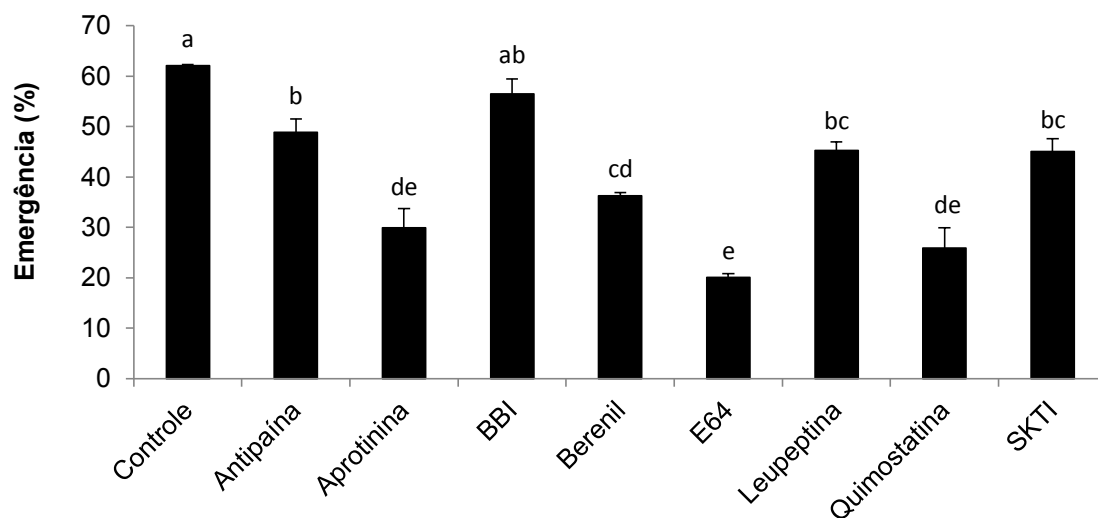


Figura 2. Emergência de adultos (\pm EP) de *Diaphorina citri* alimentados com plantas pulverizadas com diferentes inibidores de protease. Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

3.2. Efeito subletal dos IPs em *D. citri*

Para avaliação do efeito subletal foram selecionados três inibidores que afetaram de forma significativa o desenvolvimento de *D. citri*: Aprotinina, Berenil e E64. Observou-se redução do total de ovos e adultos para os inibidores Berenil e E64 (Tabela 2). Apesar do total de ovos para a Aprotinina ter sido semelhante ao controle, esses ovos tiveram sua viabilidade severamente reduzida.

Tabela 2. Efeito residual dos diferentes inibidores de protease no número de ovos depositados e viabilidade destes.

Inibidor	Total de ovos	Total de Adultos (F1)
Controle	56	37
Aprotinina	57	7
Berenil	36	15
E64	3	0

3.3. Atividade das proteases totais

Em relação a atividade específica de proteases totais de *D. citri* submetida a tratamentos com os IPs, observou-se que os adultos alimentados com plantas

pulverizadas com Berenil, tiveram uma maior atividade em relação ao tratamentos controle (Figura 3).

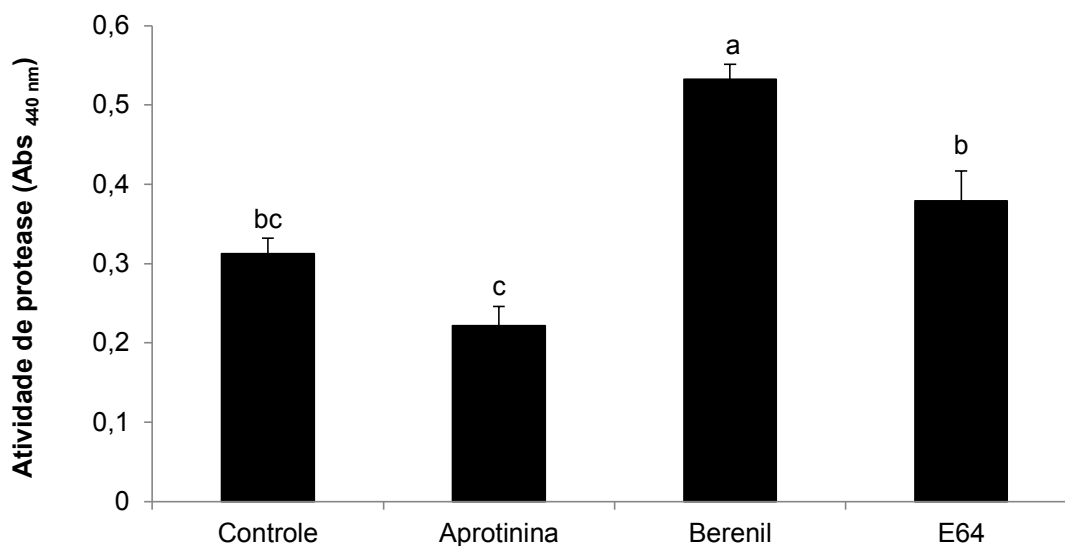


Figura 3. Atividade das proteases totais em adultos (\pm EP) de *Diaphorina citri* alimentados com plantas pulverizadas com diferentes inibidores de protease. Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

3.4. Caracterização dos parâmetros bioquímicos-cinéticos de cisteíno protease

3.4.1. Efeito do pH sobre a atividade enzimática de cisteíno protease

Na figura 4 está representado a atividade de cisteíno protease em pH variando de 4,0 a 10,0. Pode-se observar que o maior pico de atividade ocorreu ao utilizar-se tampão pH 6,0.

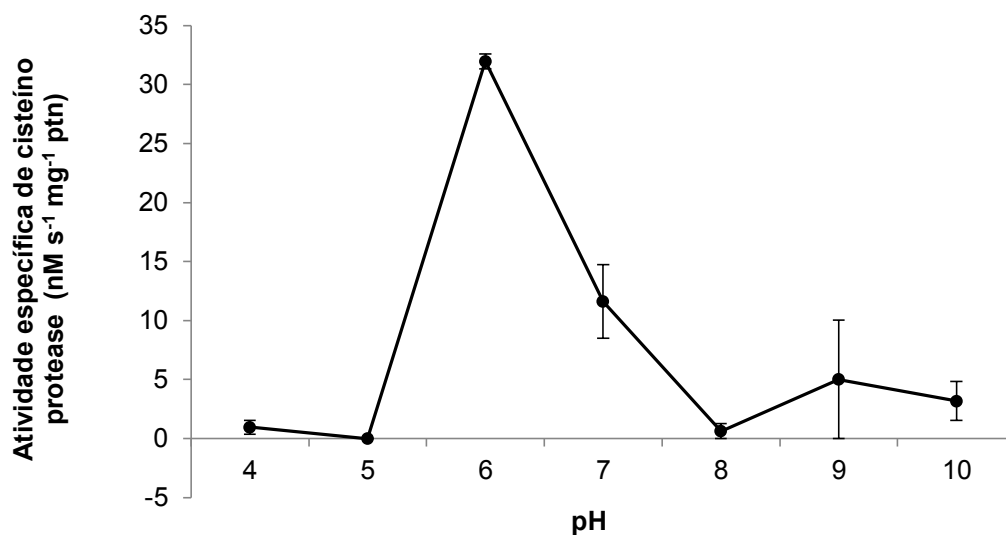


Figura 4. Atividade (\pm EP) de cisteíno proteases de *Diaphorina citri* em diferentes valores de pH

3.4.2. Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática de cisteíno protease

Pode-se observar na figura 5, que o pico de atividade de cisteíno proteases ocorreu na temperatura de 25°C, e as temperaturas superiores acarretaram uma redução da atividade dessa protease.

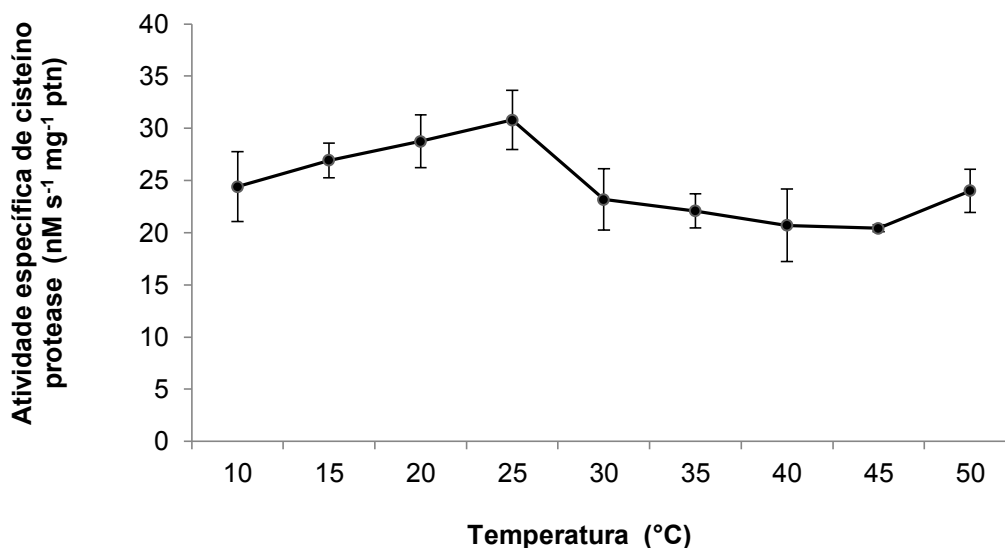


Figura 5. Atividade (\pm DP) de cisteíno proteases de *Diaphorina citri* em diferentes temperaturas (°C).

3.4.3. Determinação da $K_{M\text{ app}}$ e $V_{\text{max app}}$

Para avaliar os parâmetros cinéticos da cisteíno protease em pH 6,0, foram utilizadas diferentes concentrações do substrato L-BApNA na velocidade da reação, de acordo com Lineweaver-Burk. Observou-se que a enzima apresentou curva hiperbólica seguindo o modelo cinético de Michaelis-Menten na faixa de concentração de substrato analisada (Figura 6). Os valores de $K_{M\text{ app}}$ (constante de Michaelis-Menten aparente) e $V_{\text{max app}}$ (velocidade máxima aparente) foram determinados, sendo 0,028 mM e 31,15 nM s^{-1} , respectivamente.

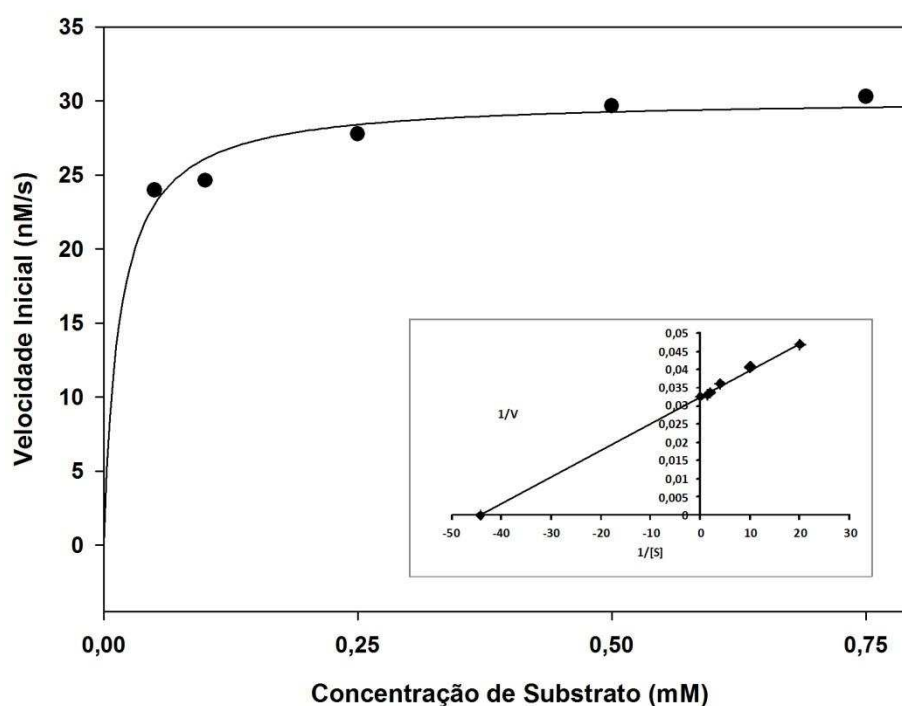


Figura 6. Gráfico de Michaelis-Menten da atividade de cisteíno proteases do extrato enzimático de *D. citri*. Inserção: gráfico de Lineweaver-Burk da atividade do extrato sobre L-BApNA. Os pontos são experimentais. A linha contínua traçada foi baseada em dados teóricos, utilizando-se a equação de Michaelis-Menten para a obtenção dos valores de $K_{M\text{ app}}$ e $V_{\text{Máx app}}$.

3.5. Avaliação do efeito dos inibidores de protease na atividade de cisteíno protease

O inibidor Aprotinina ocasionou um aumento significativo da atividade enzimática apenas na concentração de 0,5 μM , enquanto as outras concentrações analisadas a atividade não diferiu do controle (Figura 7).

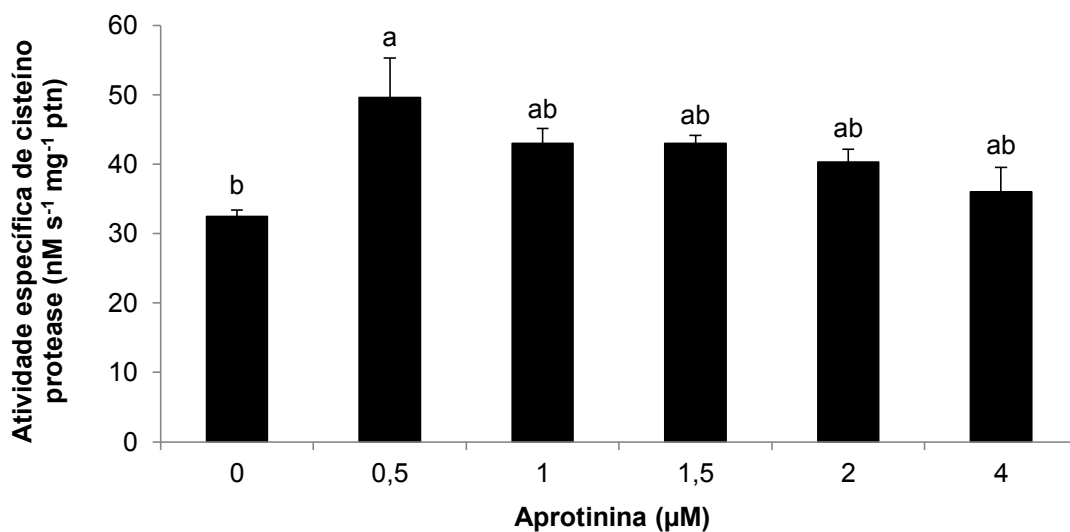


Figura 7. Atividade específica de cisteína protease ($\pm\text{DP}$) de *Diaphorina citri* em diferentes concentrações do inibidor Aprotinina. Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

O inibidor Berenil ocasionou redução significativa da atividade enzimática apenas na concentração de 15 mg/L . As demais concentrações não afetaram significativamente a atividade da enzima quando comparada ao controle (Figura 8).

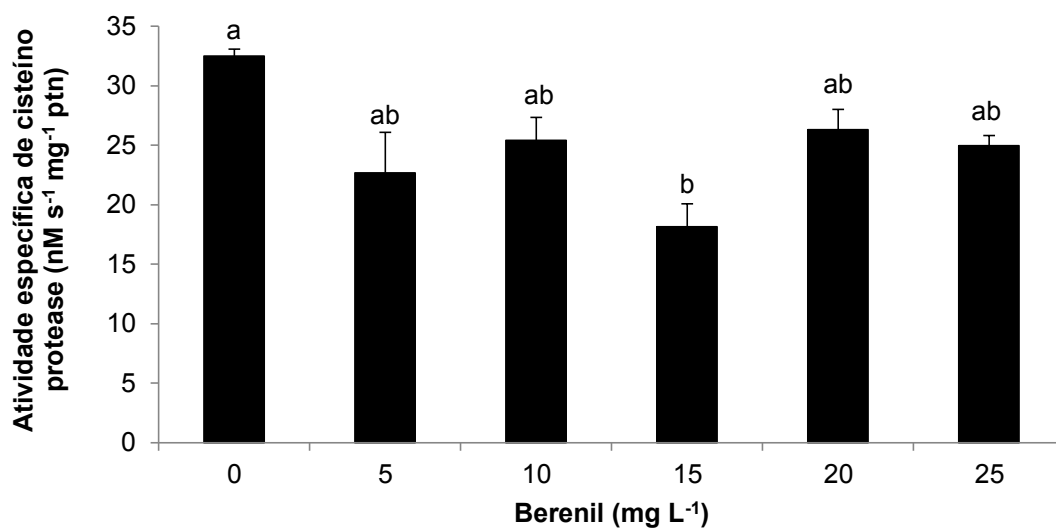


Figura 8. Atividade específica de cisteíno protease (\pm DP) de *Diaphorina citri* em diferentes concentrações do inibidor Berenil. Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Os resultados indicam que o inibidor de cisteíno proteases E64 reduziu significativamente a atividade na maior concentração testada, 50 μ M (Figura 9).

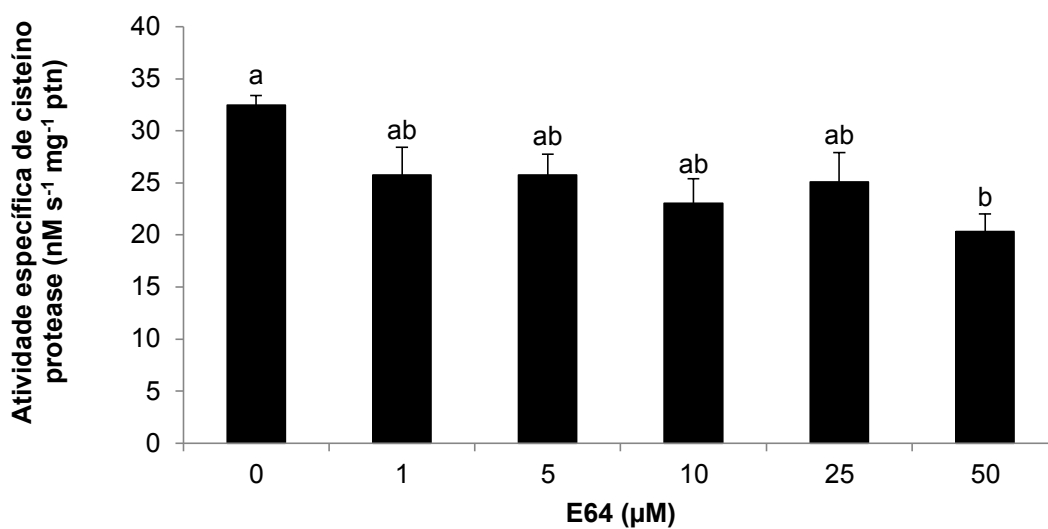


Figura 9. Atividade específica de cisteíno protease (\pm DP) de *Diaphorina citri* em diferentes concentrações do inibidor E64. Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

4. DISCUSSÃO

Os inibidores enzimáticos são naturalmente produzidos pelas plantas e estão intimamente relacionados ao mecanismo de defesa contra insetos e patógenos. Essas moléculas têm sido amplamente estudadas na inibição de enzimas digestivas, como proteases (Burgess et al., 2002; Oppert et al., 2003; Pilon et al., 2006; Paixão et al., 2016). O presente estudo fornece uma análise do potencial uso de inibidores de proteases no controle de *D. citri*. Ao avaliar a mortalidade das ninfas do psilídeo, verificou-se que todos os inibidores provocaram mortalidade superior ao controle, sendo os mais efetivos a antipaína, aprotinina, berenil, E-64 e quimostatina. O E-64, um inibidor irreversível de cisteína protease, além de provocar alta mortalidade de ninfas, também reduziu drasticamente a porcentagem de emergência, o número de ovos depositados e a viabilidade dos ovos. Resultados semelhantes foram relatados por Alvarez-Alfageme et al. (2011) que, avaliando o efeito do inibidor AtSerp1 em ninfas de *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae), observaram que na maior concentração testada (10 µM) a mortalidade atingiu 77,4% e também inibiu a atividade de cisteína proteases *in vitro*. No trabalho de Zhao et al. (2018), também ocorreu redução na fecundidade de adultos de *Apolygus lucorum* (Hemiptera: Miridae) ao analisarem E64 nas concentrações de 2 e 8 µg/g de dieta.

Adultos de *D. citri* submetidos a plantas pulverizadas com Berenil, um inibidor sintético parcialmente competitivo da tripsina (serino protease) apresentaram um aumento na atividade proteolítica total. Esse resultado corrobora com evidências de que, a ingestão crônica de inibidores de proteases pelos insetos não elimina a digestão protéica, mas acarreta a hiperprodução de proteases (mesma ou diferentes classes) afim de mitigar a limitação de aminoácidos essenciais para a síntese de proteínas, crescimento e reprodução (Pilon et al., 2006). Os detalhes dos mecanismos de mitigação, por meio dos quais os insetos reconhecem a presença dos inibidores no trato intestinal, ainda não estão bem esclarecidos. Alguns trabalhos têm demonstrado que a indução de tripsinas em lepidópteros se dá no nível de transcrição gênica (Mazumdar-Leighton & Broadway, 2001), o mesmo ocorre com a indução de protease tipo catepsina B em larvas de coleópteros, *Callosobruchus maculatus* (Moon et al., 2004). Nossos resultados são diferentes aos encontrados por Colebatch et al. (2001), que verificaram redução da atividade proteolítica do inseto *Creontiades dilutus* (Hemiptera: Miridae) submetido a tratamento com Aprotinina e Berenil, nas concentrações de 0,3 µM e 0,14 µM respectivamente.

Há inúmeros estudos que comprovam que a principal classe de enzima proteolítica presente em hemípteros é a cisteíno protease (Gooding, 1969; Houseman & Downe, 1980; Terra et al, 1988). Esse fato pode ser decorrente de dois eventos evolucionários. O primeiro considera que a perda da serino protease digestiva foi decorrente a mudança de hábito alimentar e a adaptação desses insetos ao consumo de seiva. O segundo evento leva em conta o uso de proteases lisossomais por alguns hemípteros sugadores de seiva, que retornaram a um hábito alimentar protéico (Terra & Ferreira, 1994). O fato é que serino proteases são encontradas apenas nas secreções salivares em insetos Hemipteras, nunca no intestino; além disso, estudos citoquímicos e de biologia molecular confirmam a origem lisossomal das proteases cisteínicas luminiais (Billingsley & Downe, 1988; Terra & Ferreira, 1994; Kollien et al., 2004). A caracterização de cisteíno protease de *D. citri*, realizada no presente trabalho foi fundamentada nesse princípio. Além do mais, não há até o momento relatos sobre características bioquímicas e cinéticas de proteases atuantes na digestão de *D. citri*.

A maior atividade de cisteíno-proteases obtida nesse estudo foi em pH 6,0. A maioria das cisteíno proteases têm um pH ótimo próximo a neutralidade, embora algumas delas, por exemplo, cisteíno proteases lisossomais, sejam maximamente ativas em pH ácido (Rao, 1998). Esse resultado está de acordo com os encontrados por Bigham & Hosseinaveh (2010) em estudo de caracterização de cisteíno protease presente no intestino médio do percevejo, *Brachynema germari* (Hemiptera: Pentatomidae), no qual o pH ótimo encontrado foi igual a 5. Darvishzadeh et al. (2015), trabalhando com cisteíno protease em *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae) encontraram valor de maior atividade em pH 6. No presente trabalho, verificou-se que o pico de atividade de cisteíno protease ocorreu a 25°C, temperaturas superiores ocasionaram a redução da atividade enzimática, provavelmente devido à desnaturação proteica. Com base nesses resultados, os ensaios bioquímico-cinéticos posteriores foram realizados em pH 6,0 e 25°C, a fim de caracterizar cisteíno(s) protease(s) atuante(s) em pH ácido.

Os parâmetros cinéticos, $V_{\max \text{ app}}$ e $K_{m \text{ app}}$ encontrados nesse trabalho foram diferentes aos obtidos por Zibae et al. (2011) estudando cisteíno protease de *Eurygaster intergriceps* (Hemiptera: Scutelleridae). Os valores encontrados de $V_{\max \text{ app}}$ foi de 11,11 U/mg de proteína e 10 mM de $K_{m \text{ app}}$. Isso pode ser justificado devido a especificidade dos diferentes substratos testados, o substrato usado por Zibae et al. (2011) foi L-di-hidroxifenilalanina (L-DOPA) enquanto o utilizado no presente estudo foi L-BApNA. Outros autores utilizando o mesmo substrato (L-BApNA) do presente

trabalho, encontraram valores próximos aos obtidos para *D. citri*, como é o caso de Mohamed et al. (2005) que determinaram um K_m de 0,6 mM para cisteíno protease do parasita *Fasciola gigantica* (Echinostomida: Fasciolidae) e Mendonça et al (2011) que obtiveram um $K_{m\ app}$ de 0,63 e 0,04 mM para cisteíno protease presente na fração solúvel e insolúvel do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis*, respectivamente.

Os inibidores de protease têm efeitos indesejados ao organismo por bloquear a atividade de proteases no intestino do inseto-alvo (Jin et al., 2014). Geralmente, a atuação desses inibidores sobre uma classe específica de protease é avaliada *in vitro*, por meio da determinação da atividade enzimática (Prasad et al., 2010). No nosso estudo, a cisteíno protease também foi caracterizada usando inibidores específicos.

Um dos inibidores mais utilizados para a caracterização de cisteíno proteases é o E64, por ser um inibidor irreversível, não competitivo de tiol proteases. Assim, observou-se que apenas a maior concentração de E64, 50 μM foi capaz de inibir a atividade enzimática. Um resultado semelhante foi obtido para cisteíno proteases da fração insolúvel de *A. gemmatalis*, onde somente a maior concentração de E64, 100 μM inibiu significativamente a enzima (Mendonça et al., 2011). Da mesma forma, o berenil na concentração de 15 mg L^{-1} inibiu a atividade da enzima. O contrário foi observado quando o inibidor de serino protease, Aprotinina foi avaliado. A aprotinina é um polipeptídeo de cadeia simples, constituído por 58 resíduos de aminoácidos e é um inibidor das enzimas proteolíticas, quimiotripsina, calicreína, plasmina e tripsina (Mendonça et al., 2011). Houve aumento significativo da atividade apenas na menor concentração testada, 0,5 μM .

No trabalho de Colebatch et al. (2001), ao avaliarem o efeito de inibidores sobre as proteases de *Creontidaes dilutus* (Hemiptera: Miridae) *in vitro*, verificaram que a Aprotinina e o E64 inibiram a atividade de protease sugerindo a presença de serino e cisteíno proteases em seu intestino médio. Semelhante aconteceu neste trabalho onde foi verificada a inibição da atividade de cisteíno proteases em *D. citri*, o que até então era desconhecido. Ao analisar no geral os inibidores de protease como uma alternativa de controle de *D. citri*, o inibidor mostrou ter potencial, devido a quantidade de variáveis as quais demonstrou ser eficiente.

5. CONCLUSÕES

Este trabalho avaliou os efeitos dos inibidores de protease sob *D. citri*. Os resultados demonstram que dentre os inibidores avaliados, o inibidor E64 ocasiona mais prejuízos ao desenvolvimento do inseto, como aumento mortalidade, redução na fecundidade, no número de ovos e inviabilização dos ovos, além de na concentração maior testada inibir a atividade específica de cisteíno protease.

Foi demonstrada pela primeira vez a atividade de cisteíno protease acídicas no psilídeo-dos-citros, essas são responsáveis por auxiliar no processo de digestão proteica do inseto e podem ser então um alvo para o controle de *D. citri*.

6. REFERÊNCIAS

ALVAREZ-ALFAGEME, F.; MAHARRAMOV, J.; CARRILLO, L.; VANDENABEELE, S.; VERCAMMEN, D.; BREUSEGEM, F.V.; SMAGGHE, G. Potential Use of a Serpin from *Arabidopsis* for Pest Control. **PLoS ONE**, v.6, n.5, e20278, 2011.

ASHOURI, S.; ABAD, R.F.P.; ZIHNIOGLU, F.; KOCADAG, E. Extraction and purification of protease inhibitor(s) from seeds of *Helianthus annuus* with effects on *Leptinotarsa decemlineata* digestive cysteine protease. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.9, p.113-119, 2017.

BIGHAM, M.; HOSSEININAVEH, V. Digestive proteolytic activity in the pistachio green stink bug, *Brachynema germari* Kolenati (Hemiptera: Pentatomidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v.13, p.221–227, 2010.

BILLINGSLEY, P.F.; DOWNE, A.E.R. Ultrastructural localization of cathepsin B in the midgut of *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae) during blood digestion. **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v.17, p.295-302, 1988.

BRADFORD, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BOVÉ, J.M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, v.88, n.1, p.7-37, 2006.

BOWN, D.P.; WILKINSON, H.S.; GATEHOUSE, J.A. Differentially Regulated Inhibitor-Sensitive and Insensitive Protease Genes from the Phytophagous Insect Pest, *Helicoverpa armigera*, are Members of Complex Multigene Families. **Insect Biochemistry Molecular Biology**, v.27, n.7, p.625-638, 1997.

BURGESS, E.P.J.; LÖVEI, G.L.; MALONE, L.A.; NIELSEN, I.W.; GATEHOUSE, H.S.; CHRISTELLER, J.T. Prey-mediated effects of the protease inhibitor aprotinin on

the predatory carabid beetle *Nebria brevicollis*. **Journal of Insect Physiology**, v.48, p.1093-1101, 2002.

CAPOOR, S.P.; RAO, D.G.; VISWANATH, S.M. *Diaphorina citri* Kuway, a vector of the greening disease of citrus in India. **Indian Journal of Agricultural Science**, v.37, n.6, p.572-576, 1967.

CHEN, X.D.; SEO, M.; STELINSKI, L.L. Behavioral and hormetic effects of the butenolide insecticide, flupyradifurone, on Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. **Crop Protection**, v.96, p.102-107, 2017.

COLEBATCH, G.; EAST, P.; COOPER, P. Preliminary characterisation of digestive proteases of the green mirid, *Creontiades dilutus* (Hemiptera: Miridae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.31, p.415-423, 2001.

COSTA LIMA, A.M. **Insetos do Brasil: Homópteros**. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia, v.3, 327p., 1942.

DA GRAÇA, J.V. Citrus greening disease. **Annual Review Phytopathology**, v.29, p.109-136, 1991.

DARVISHZADEH, A.; BANDANI, A.; AMIRI, A.; MOUSAVI, S.Q. Serine and cysteine proteases of *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae) larvae raised on date palms (*Phoenix dactylifera*). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v.18, p.547-552, 2015.

DINIZ, A.J.F. Otimização da criação de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Liviidae) e de *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae), visando a produção em larga escala do parasitoide e avaliação do seu estabelecimento em campo. Dissertação de Doutorado (USP), p.66, 2013.

ERLANGER, B.F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The Preparation and Properties of Two New Chromogenic Substrates of Trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.95, p.271-278, 1961.

FUNDECITRUS. Doenças e Pragas (Greening/HLB) Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/doencas/greening/10>. Acesso em 24 janeiro 2018.

GOODING, R.H. Studies on proteinases from some blood-sucking insects. **Proceedings of the Entomological Society of Ontario**, v.100, p.139-145, 1969.

GOTTWALD, T.R.; DA GRAÇA, J.V.; BASSANEZI, R.B. Citrus Huanglongbing: The Pathogen and Its Impact. **Plant Management**, 2007. Disponível em: <https://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/HuanglongbingImpact.aspx>. Acesso em 06 de março 2017.

HALBERT, S.E.; MANJUNATH, K.L. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. **Florida Entomologist**, v.87, n.3, p.330-353, 2004.

HALL, D.G.; SÉTAMOU, M.; MIZELL III, R.F. A comparison of sticky traps for monitoring Asian citrus psyllid (*Diaphorina citri* Kuwayama). **Crop Protection**, v.29, p.1341-1346, 2010.

HOUSEMAN, J.G.; DOWNE, A.E.R. Endoproteinase activity in the posterior midgut of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). **Insect Biochemistry**, v. 10, p. 363-366, 1980.

JADHAV, A.R.; WAR, A.R.; NIKAM, A.N.; ADHAV, A.S.; GUPTA, V.S.; SHARMA, H.C.; GIRI, A.P.; TAMHANE, V.A. *Capsicum annuum* proteinase inhibitor ingestion negatively impacts the growth of sorghum pest *Chilo partellus* and promotes differential protease expression. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v.8, p.302-309, 2016.

JAYACHANDRAN, B.; HUSSAIN, M.; ASGARI, S. An insect trypsin-like serine protease as a target of microRNA: Utilization of microRNA mimics and inhibitors by oral feeding. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.43, p.398-406, 2013.

JIN, D.; ZENG, F.; DONG, S.; ZHANG, H. Effects of a protease inhibitor protein from *Xenorhabdus bovienii* on physiology of pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.108, p.86-91, 2014.

KOLLIEN, A.H.; WANIEK, P.J.; NISBET, A.J.; BILLINGSLEY, P.F.; SCHAUB, G.A. Activity and sequence characterization of two cysteine proteases in the digestive tract of the reduviid bug *Triatoma infestans*. **Insect Molecular Biology**, v.13, n.6, p.569-579, 2004.

KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor: II – General properties. **Journal of General Physiology**, v.30, n.4, p.291-310, 1947.

LAWRENCE, P.K.; KOUNDAL, K.R. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.5, n.1, p.1-17, 2002.

MAZUMDAR-LEIGHTON, S.; BROADWAY, R.M. Transcriptional induction of digestive midgut trypsin in larval *Agrotis ipsilon* and *Helicoverpa zea* feeding on the soybean trypsin inhibitor. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.31, p.645-657, 2001.

MARATHE, K.; KASAR, S.; CHAUDHARI, A.; MAHESHWARI, V. Purification and characterization of a novel heterodimer protease inhibitor from *Streptomyces* spp. VL J2 with potential biopesticidal activity against *H. armigera*. **Process Biochemistry**, v.51, p.1650-1663, 2016.

MEAD, F.W. The Asiatic citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae). **Entomology Circular**, n.180, Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry, 4p., 1977.

MENDONÇA, E.G.; VISÔTTO, L.E.; COSTA, N.C.S.; RIBEIRO, F.R.; OLIVEIRA, J.A.; OLIVEIRA, M.G.A. Caracterização enzimática de isoformas de cisteíno protease de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818). **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.3, p.446-454, 2011.

MOHAMED, S.A.; FAHMY, A.S.; MOHAMED, T.M.; HAMDY, S.M. Proteases in egg, miracidium and adult of *Fasciola gigantica*. Characterization of serine and cysteine proteases from adult. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.142 (B), p.192-200, 2005.

MOON, J., SALZMAN, R.A., AHN, J.E., KOIWA, H., ZHU-SALZMAN, K. Transcriptional regulation in cowpea bruchid guts during adaptation to a plant defence inhibitor. **Insect Molecular Biology**, v.13, n.3, p.283-291, 2004.

OLIVEIRA, M.G.A.; DE SIMONE, S.G.; XAVIER, L.P.; GUEDES, R.N.C. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.140 (B), p.369-380, 2005.

OPPERT, B.; MORGAN, T.D.; HARTZER, K.; LENARCIC, B.; GALESA, K.; BRZIN, J.; TURK, V.; YOZA, K.; OHTSUBO, K.; KRAMER, K.J. Effects of proteinase inhibitors on digestive proteinases and growth of the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.134 (C), p.481-490, 2003.

PAIXÃO, G.P.; LOURENÇÃO, A.L.; SILVA, C.R.; CORDEIRO, G.; BARROS, R.A.; OLIVEIRA, J.A.; VISÔTTO, L.E.; OLIVEIRA, M.G.A. Active response of soybean to defoliator *Anticarsia gemmatalis* Hubner: strategies to overcome protease inhibitor production. **Idesia**, v.34, n.2, p.69-75, 2016.

PATIL, C.D.; BORASE, H.P.; SURYAWANSHI, R.K.; PATIL, S.V. Trypsin inactivation by latex fabricated gold nanoparticles: A new strategy towards insect control. **Enzyme and Microbial Technology**, v.92, p.18-25, 2016.

PILON, A.M.; OLIVEIRA, M.G.A.; GUEDES, R.N.C. Protein digestibility, protease activity, and post-embryonic development of the caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*) exposed to the trypsin-inhibitor benzamidine. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.86, p.23-29, 2006.

PRASAD, E.R.; DUTTA-GUPTA, A.; PADMASREE, K. Insecticidal potential of Bowman–Birk proteinase inhibitors from red gram (*Cajanus cajan*) and black gram (*Vigna mungo*) against lepidopteran insect pests. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.98, p.80-88, 2010.

QURESHI, J.A.; STANSLY, P.A. Rate, placement, and timing of aldicarb applications to control Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), in oranges. **Pest Management Science**, v.64, p.1159-1169, 2008.

RAO, M.B.; TANKSALE, A.M.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, n.3, p.597-635, 1998.

RIBEIRO, L.P.; SANTOS, M.S.; GONÇALVES, G.L.P.; VENDRAMIM, J.D. Toxicity of an acetogenin-based bioinsecticide against *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) and its parasitoid *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae). **Florida Entomologist**, v.98, n.3, p.835-842, 2015.

SILVA, R.B., CRUZ, I., FIGUEIREDO, M.L.C., BORTONI, M.A., PEREIRA, A.G., MELO, I.F., CAMARGO, L.F., PENTEADO-DIAS, A.M. Record of new species of parasitoids on larvae of *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) and *Dichomeris famulata* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae) in maize (*Zea mays* L.) in Brazil. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.11. n.1, p.115-119, 2012.

SOUZA, V.C. Manejo da *Diaphorina citri* (psilídeo-dos-citros) por meio do uso de inibidores de proteases. Trabalho de conclusão de curso (Universidade Paulista), p.17, 2015.

TEIXEIRA, D.C.; SAILLARD, C.; EVEILLARD, S.; DANET, J.L.; DA COSTA, P.I.; AYRES, A.J.; BOVÉ, J. ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’, associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p.1857-1862, 2005.

TERRA, W.R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.109 (B), n.1, p.1-62, 1994.

TERRA, W.R.; FERREIRA, C.; GARCIA, E.S. Origin, distribution, properties and functions of the major *Rhodnius prolixus* midgut hidrolases. **Insect Biochemistry**, v.18, n.5, p.423-434, 1988.

USSUF, K.K.; LAXMI, N.H.; MITRA, R. Proteinase inhibitors: Plant-derived genes of insecticidal protein for developing insect-resistant transgenic plants. **Current Science**, v.80, n.7, p.847-853, 2001.

ZHAO, M.; LI, Y.; YUAN, X.; LIANG, G.; WANG, B.; LIU, C.; KHAING, M.M. Establishment of a dietary exposure assay for evaluating the toxicity of insecticidal compounds to *Apolygus lucorum* (Hemiptera: Miridae). **Environmental Pollution**, v.237, p.414-423, 2018.

ZIBAE, A.; BANDANI, A.R.; MALAGOLI, D. Purification and characterization of phenoloxidase from the hemocytes of *Eurygaster integriceps* (Hemiptera: Scutelleridae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B, v.158, p.117–123, 2011.

CONCLUSÕES GERAIS

Os extratos etanólicos de galhos e frutos *C. canjerana* sobre *A. gemmatalis* é mais eficiente que os de sementes, folhas e do que os triterpenos, afetando os parâmetros biológicos, índices nutricionais e atividade enzimática.

O inibidor de proteases E64 sobre *D. citri* mostrou ser uma possíveis alternativa de controle do inseto, pois afetou sua biologia e atividade de cisteíno proteases.