

**JEANNE SCARDINI MARINHO PRADO**

**BIOATIVIDADE DE BERENIL, UM INIBIDOR DE PROTEASES DO TIPO  
BIS-BENZAMIDINA, SOBRE *Thyrintaina arnobia***

**Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Entomologia, para  
obtenção do título de *Doctor Scientiae*.**

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2010**

**JEANNE SCARDINI MARINHO PRADO**

**BIOATIVIDADE DE BERENIL, UM INIBIDOR DE PROTEASES DO TIPO  
BIS-BENZAMIDINA, SOBRE *Thyrintaina arnobia***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**APROVADA:** 31 de março de 2010.

---

Prof. Raul Narciso Carvalho Guedes  
(Coorientador)

---

Pesq. André Luiz Lourenção  
(Coorientador)

---

Prof. Eliseu José Guedes Pereira

---

Dr. Anderson Martins Pilon

---

Prof<sup>a</sup>. Maria Goreti de Almeida Oliveira  
(Orientador)

“Os céus declaram a glória de Deus; o firmamento proclama a obra das suas mãos. Um dia fala disso a outro dia; uma noite o revela a outra noite. Sem discurso nem palavras, não se ouve a sua voz. Mas a sua voz ressoa por toda a terra, e as suas palavras, até os confins do mundo.”

Salmo 19: 1 a 4

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Animal, pela oportunidade de realização do curso;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos;

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Programa INCT (Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia) – Interação Planta-Praga, pelo apoio financeiro;

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Entomologia, pelo ensino, pela disposição e pelas oportunidades;

À professora Maria Goreti Almeida de Oliveira, pela orientação ao trabalho, pela confiança em mim depositada, pelo incentivo e por ser também amiga e conselheira;

Ao professor Raul Narciso Carvalho Guedes, pela disposição, atenção e generosidade, pelas sugestões ao trabalho, pelo incentivo e amizade;

Ao pesquisador André Luiz Lourenção, pela oportunidade de realizar os experimentos no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC, Campinas - SP), pela confiança, pelo auxílio ao longo dos experimentos e pelas sugestões ao trabalho;

Ao professor Angelo Pallini, pela orientação durante a Iniciação Científica, período em que despertou em mim o gosto pela pesquisa, e pelas sugestões ao projeto de tese;

Ao professor Joel Antônio de Oliveira, pelas correções e sugestões ao projeto de tese;

Ao amigo e professor Anderson Matias Holtz, por ter me apresentado à entomologia, pela paciência e generosidade que sempre teve comigo. Seus conselhos e sua ajuda foram e têm sido essenciais para a minha caminhada;

Aos colegas do Programa de Pós-graduação em Entomologia com quem convivi, por tornarem as horas de estudo mais prazerosas, pela cooperação e amizade;

Aos amigos do laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos do BIOAGRO - Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária da UFV, que me ajudaram enquanto perto e ainda mais quando estive distante;

Aos amigos do IAC pela grande ajuda, companhia e amizade. Sem eles não teria sido possível realizar o experimento com todas as repetições de uma só vez, foram muitos os dias que ficaram trabalhando comigo, ajudando e incentivando;

Aos funcionários do IAC, do Programa de Pós-graduação em Entomologia e ao Eduardo, do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, pela disposição e ajuda;

Ao professor Carlos Frederico Wilcken, da Universidade Estadual Paulista (UNESP, Botucatu – SP), que gentilmente cedeu as posturas de *Thyrintina arnobia* utilizadas para os testes e para iniciar a criação no IAC;

Aos Professores Sinval Silveira Neto e Marinéia de Lara Haddad, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ, Piracicaba – SP) pelo auxílio na elaboração e análise da tabela de vida utilizada neste trabalho;

Aos pesquisadores da seção de irrigação do IAC, por disponibilizarem o medidor de área foliar, utilizado em um dos testes do presente trabalho;

Ao professor José Roberto Postali Parra, da ESALQ, por disponibilizar o estereoscópio com micrômetro digital para a medição das cápsulas cefálicas;

Aos professores Yongping Huang e Erjung Ling, do Shanghai Institute of Plant Physiology & Ecology (SIPPE, Chinese Academy of Sciences, Xangai - China), e aos colegas deste Instituto, pela estrutura que utilizei para a escrita da tese enquanto estive em Xangai, pela recepção e pelo carinho;

A todos os meus amigos, que certamente contribuíram em algum momento para a conclusão deste trabalho. Algumas vezes, indiretamente, demonstrando carinho, incentivando nos momentos de desânimo, etc. Outras, diretamente, como, por exemplo, transportando lagartas (obrigada, Patrícia!), ajudando a fazer leitura de experimento em pleno final de semana (Valéria e Júnio, muito obrigada!) ou me representando de diversas formas em Viçosa (obrigada, Mazinho!);

Aos meus pais queridos, por incentivarem meus estudos desde pequenininha, por investirem na minha educação, mesmo quando o investimento era sacrificante, por permitirem que eu fosse estudar longe de casa, por confiarem em mim, pelo apoio, pelas orações, pelos conselhos, pelo amor... enfim, por terem me fornecido a base para esta conquista;

Aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos, pelos conselhos, pelo apoio e momentos de alegria;

Aos meus queridos sogros, pelo amor, pelo apoio, pelas orações e pelo filho maravilhoso que eles criaram;

Ao meu amigo Fred, ao meu companheiro Fred, ao meu estagiário Fred, ao meu conselheiro Fred, ao meu esposo Fred,... Pelo ombro na hora da tristeza, pelo incentivo na hora do desânimo, pela vibração nas vitórias, pela calma no temporal, pelas palavras de esperança nos momentos incertos, pela doçura e bom humor do dia-a-dia, pela paciência a qualquer hora, pelos fins de semana gastos no laboratório (horas doadas com alegria) e pelo amor que posso sentir em tudo o que dele vem;

Pela paz que sinto, mesmo quando as coisas não vão bem, pela misericórdia que se renova a cada manhã, por cuidar de cada passo da minha caminhada, pela presença, pela graça e pelo amor, ao meu Deus, autor da minha fé, agradeço.

## BIOGRAFIA

Jeanne Scardini Marinho Prado, filha de Julinho Alves Marinho e Judismar Scardini Marinho, nasceu em Vitória, estado do Espírito Santo, no dia 07 de Junho de 1980. Em abril de 1999, iniciou o curso de Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa (UFV, Viçosa – MG), graduando-se em janeiro de 2004. Em Março de 2004, ingressou-se no mestrado do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Departamento de Biologia Animal da UFRV, obtendo o título de *Magister Scientiae* em Fevereiro de 2006. Em Março de 2006, iniciou o doutorado pelo mesmo Programa de Pós-Graduação em Entomologia da UFRV, defendendo tese em 31 de março de 2010.

## ÍNDICE

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	4
CAPÍTULO 1. Alteração no desenvolvimento de <i>Thyrinteina arnobia</i> por berenil.....	8
Resumo.....	9
Abstract.....	10
1. Introdução.....	11
2. Material e métodos.....	13
2.1. Insetos e materiais.....	13
2.2. Biologia comparada de <i>T. arnobia</i> em folhas de eucalipto contendo diferentes concentrações do inibidor de proteases berenil.....	14
2.3. Análises estatísticas.....	16
3. Resultados.....	18
4. Discussão.....	28
5. Referências bibliográficas.....	31
CAPÍTULO 2. Alteração comportamental de <i>Thyrinteina arnobia</i> induzida por berenil.....	37
Resumo.....	38
Abstract.....	39
1. Introdução.....	40
2. Material e métodos.....	42
2.1. Insetos e materiais.....	42
2.2. Teste de preferência de lagartas de <i>T. arnobia</i> com chance de escolha.....	43
2.3. Área foliar consumida por lagartas de <i>T. arnobia</i> sem chance de escolha.....	45
2.4. Teste de preferência de pouso e oviposição de fêmeas de <i>T. arnobia</i> com chance de escolha.....	46
2.5. Análise estatística.....	47



3. Resultados.....	48
4. Discussão.....	51
5. Referências bibliográficas.....	54
CAPÍTULO 3. Parâmetros bioquímicos da resposta de lagartas de <i>Thyrintaina arnobia</i> expostas a berenil.....	60
Resumo.....	61
Abstract.....	62
1. Introdução.....	63
2. Material e métodos.....	64
2.1. Insetos e materiais.....	64
2.2. Viabilidade larval de <i>T. arnobia</i> alimentada com concentrações crescentes de berenil em folhas de eucalipto.....	65
2.3. Análise da atividade enzimática no intestino de lagartas de <i>T. arnobia</i> alimentadas com concentrações crescentes de berenil em folhas de eucalipto....	66
2.3.1. Obtenção dos extratos enzimáticos dos intestinos médios de lagartas de <i>T. arnobia</i> .....	67
2.3.2. Determinação da concentração de proteína dos extratos enzimáticos de lagartas de <i>T. arnobia</i> .....	68
2.3.3. Determinação da atividade proteásica nos extratos enzimáticos de lagartas de <i>T. arnobia</i> .....	68
2.3.4. Determinação da atividade amidásica de proteases tripsina-like nos extratos enzimáticos de lagartas de <i>T. arnobia</i> .....	69
2.3.5. Determinação da atividade esterásica de proteases tripsina-like nos extratos enzimáticos de lagartas de <i>T. arnobia</i> .....	69
2.3.6. Determinação da atividade de cisteíno-proteases nos extratos enzimáticos de lagartas de <i>T. arnobia</i> .....	70
2.4. Análise estatística.....	70
3. Resultados.....	71
4. Discussão.....	75
5. Referências bibliográficas.....	79
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83

## RESUMO

PRADO, Jeanne Scardini Marinho, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Março de 2010. **Bioatividade de berenil, um inibidor de proteases do tipo bis-benzamidina, sobre *Thyrinteina arnobia***. Orientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-orientadores: Raul Narciso Carvalho Guedes, André Luiz Lourenção, Angelo Pallini e Joel Antônio de Oliveira.

Os inibidores de protease (IPs) têm sido reconhecidos como agentes potenciais de proteção a plantas na defesa contra insetos-praga, sendo sua utilização estudada como alternativa para o manejo integrado de pragas. Berenil é um exemplo de um inibidor sintético de tripsinas do tipo bis-benzamidina e seu potencial para uso como inseticida foi estudado contra *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae), um dos mais importantes desfolhadores de eucalipto no Brasil. Características biológicas do inseto tais como tempo de desenvolvimento, sobrevivência, peso de pupa e viabilidade, e os parâmetros da tabela de vida de *T. arnobia* foram avaliados nas larvas criadas em folhas de eucalipto com 0,00; 0,06; 0,12; 0,25; 0,50 e 0,75% (p/v) do IP berenil. Além disso, a preferência alimentar, o consumo foliar e a atividade proteolítica no intestino de lagartas de *T. arnobia* foram também avaliados em larvas criadas em folhas de eucalipto com 0,00; 0,03; 0,06; 0,09 e 0,12% (p/v) de berenil. Este IP do tipo bis-benzamidina causou atraso no desenvolvimento larval. A sobrevivência das larvas também foi severamente afetada por concentrações crescentes de berenil e concentrações sub-letais prejudicaram parâmetros da tabela de vida de *T. arnobia*. Todas as concentrações de berenil foram repelentes e deterrentes a *T. arnobia* e a ingestão deste IP não causou alimentação compensatória pelas lagartas. Berenil também inibiu a atividade das tripsinas no intestino das lagartas e impediu o aumento da atividade de cisteíno-proteases como resposta à inibição trípica. A eficácia do berenil como inseticida, repelente e deterrente contra *T. arnobia* sugere sua utilização potencial contra essa praga.

## ABSTRACT

PRADO, Jeanne Scardini Marinho, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2010.

**Bioactivity of berenil, a proteinase inhibitor bis-benzamidine, on *Thyriniteina arnobia*.** Adviser: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-advisers: Raul Narciso Carvalho Guedes, André Luiz Lourenção, Angelo Pallini and Joel Antônio de Oliveira.

Protease inhibitors (PIs) have been recognized as potential plant protection agents against pest insects and their use is an alternative for integrated pest management. Berenil is an example of a bis-benzamidine synthetic trypsin inhibitor and its potential for use as insecticide was studied against *Thyriniteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae), one of the most important eucalypt defoliators in Brazil. Life history traits such as developmental time, survival, pupal weight and viability, and life table parameters of *T. arnobia* were assessed in larvae reared on eucalyptus leaves containing 0.00, 0.06, 0.12, 0.25, 0.50 and 0.75% (w/v) of the synthetic trypsin inhibitor berenil. In addition, food preference, leaf consumption and gut proteolytic activity of *T. arnobia* caterpillars were also assessed in larvae reared on eucalyptus leaves containing 0.00, 0.03, 0.06, 0.09 and 0.12% (w/v) of berenil. Berenil delayed larval development. Larval survival was also severely affected by increasing berenil concentrations and sub-lethal concentrations compromised life table parameters of *T. arnobia*. All of the berenil concentrations were deterrent to *T. arnobia* and the ingestion of this PI did not cause compensatory feeding by larvae. Berenil also inhibited trypsin-like activity and prevented cysteine activity as a response to the tryptic inhibition. The efficacy of berenil as insecticide, repellent and deterrent against *T. arnobia* suggests its potential use against eucalyptus defoliating caterpillars such as *T. arnobia*.

## INTRODUÇÃO GERAL

A cultura de eucalipto é muito importante no Brasil e no mundo devido, principalmente, ao seu potencial no fornecimento de madeira destinada à produção de papel e celulose (Takahashi *et al.*, 2004). As plantas de eucalipto contêm alta concentração de compostos secundários como tanino, fenóis, óleos essenciais e inibidores de proteases que podem desenvolver o papel de defesa contra ataque de herbívoros (Anjos *et al.*, 1986; Bragança *et al.*, 1998; Marinho *et al.*, 2008). Entretanto, com os incentivos fiscais em meados do século XX, quando grandes áreas no Brasil foram cobertas com monocultivos de eucalipto (Dossa, 2003), muitos herbívoros-praga que antes ocorriam apenas em mirtáceas nativas passaram a causar sérios danos a essas plantas (Anjos *et al.*, 1987; Berti Filho *et al.* 1991; Holtz *et al.*, 2003).

A lagarta desfolhadora *Thyriniteina arnobia* tornou-se uma das principais pragas em plantações de eucalipto no Brasil (Zanuncio *et al.*, 1993, 1994, 1998; Holtz *et al.*, 2003). Este herbívoro tem sido favorecido pela abundância de alimento nos vastos povoamentos de eucalipto, onde passou também a desenvolver-se e atingir altos níveis populacionais, causando desfolha severa (Zanuncio *et al.*, 1993, 1994, 1998). Os inibidores de proteases (IPs) estão envolvidos no sistema de defesa de diversas plantas (Hilder *et al.*, 1987; Fortunato *et al.*, 2004, 2007), inclusive plantas de eucalipto (Marinho *et al.*, 2008).

Estudos têm sido realizados visando esclarecer e demonstrar o efeito dos IPs sobre herbívoros, mais especificamente os efeitos sobre os parâmetros biológicos e fisiológicos que culminam com um desempenho inferior destes herbívoros quando comparados ao seu desenvolvimento na ausência destes compostos (Lawrence &

Koundal, 2002; Pilon *et al.* 2006). Os IPs atuam no intestino dos herbívoros, inibindo a ação das proteases sobre as proteínas providas da alimentação, podendo resultar no atraso do crescimento e reprodução desses herbívoros e, conseqüentemente, à sua morte (Broadway, 1995; Broadway, 1996; Lawrence & Koundal, 2002; Oliveira *et al.*, 2005, Vila *et al.* 2005; Pilon *et al.*, 2006).

Entretanto, tanto as pragas quanto as plantas podem desenvolver novas formas de proteases e inibidores para neutralizar os mecanismos de defesa de cada um. Em um complexo estável hospedeiro-praga, insetos evoluíram e se adaptaram para superar o efeito de inibidores de proteases de suas plantas hospedeiras (Broadway *et al.*, 1996; Harsulkar *et al.*, 1999; Vila *et al.*, 2005). Portanto, é necessário utilizar IPs de plantas não hospedeiras ou sintéticos como fontes potenciais para a defesa das plantas contra os insetos-praga.

A benzamidina é uma amida aromática e um inibidor sintético competitivo da tripsina, apresentando  $K_i$  de 1,0 mM (Mares-Guia *et al.*, 1981). A benzamidina, quando presente no meio reacional em baixas concentrações, posiciona-se no sítio de especificidade (sítio S1) da tripsina, onde é estabilizada por interações hidrofóbicas no bolso hidrofóbico e por interações eletrostáticas entre seu grupamento amidina e um resíduo carboxílico pertencente a um ácido aspártico, localizado no fundo do bolso do sítio S1 (Mares-Guia e Shaw, 1965; Mares-Guia *et al.*, 1981, Oliveira *et al.*, 1993). Estudos realizados com benzamidina em dieta artificial de *Anticarsia gemmatalis* e sobre folhas de eucalipto oferecidas a *T. leucoceraea* indicaram rápida adaptação destas lagartas ao IP (Pilon *et al.*, 2006; Marinho, 2006). Existem inibidores que são capazes de ocupar outros sub-sítios do centro catalítico da tripsina, ao contrário da benzamidina que ocupa apenas o sub-sítio S1 (Mares-Guia *et al.*, 1981; Oliveira *et al.*, 1993), e

possivelmente esses IPs sejam mais promissores no controle de lagartas. A bis-benzamidina apresenta uma ligação diazo-amino entre dois anéis benzamidínicos e comporta-se como um inibidor competitivo parabólico da tripsina (Junqueira *et al.*, 1992; Oliveira *et al.*, 1993). O inibidor bis-benzamidina, além de se ligar ao centro ativo da tripsina como inibidor competitivo, liga-se ao sítio ativo secundário da enzima causando um comportamento parcialmente competitivo com o substrato (Oliveira *et al.*, 1993).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de berenil, um IP do tipo bis-benzamidina, no ataque de *T. arnobia*, em plantas de eucalipto. Para isso foram determinados parâmetros biológicos, bioquímicos e comportamentais de *T. arnobia* alimentadas com plantas de eucalipto contendo diferentes concentrações de berenil.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anjos, N., Santos, G.P., Zanuncio, J.C. 1986 Pragas do eucalipto e seu controle. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 12:50-58.
- Anjos, N., Santos, G.P., Zanuncio, J.C. 1987. A lagarta-parda, *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera, Geometridae) desfolhadora de eucaliptos. Boletim Técnico. Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Belo Horizonte 25, 1-56.
- Berti-Filho, E., Stape, J.L., Cerignoni, J.A. 1991. Surto de *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae) em *Eucalyptus citriodora* Hook. (Myrtaceae) no estado de São Paulo. Revista de Agricultura 66(1): 47.
- Bragança, M.A.L., Zanuncio, J.C., Picanço, M., Laranjeiro, A.J. 1998. Effects of environmental heterogeneity on Lepidoptera and Hymenoptera populations in *Eucalyptus* plantations in Brazil. Forest Ecological Management 103:287-292.
- Broadway, R.M. 1995. Are insects resistant to plant proteinase inhibitors? Insect Physiology 41:107-116.
- Broadway, R.M. 1996. Dietary proteinase inhibitors alter complement of midgut proteases. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 32:39-53.
- Dossa, D. 2003. Cultivo do eucalipto. Embrapa Florestas, Sistemas de Produção 4.
- Fortunato, F.S., Oliveira, M.G.A., Brumano, M.H.N., Silva, C.H.O., Guedes, R.N.C., Moreira, M.A.M., 2007. Lipoxygenase-induced defense of soybean varieties to the attack of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatilis* Hübner). Journal of Pest Science 80(4), 241-247.
- Fortunato, F.S., Oliveira, M.G.A., Brumano, M.H.N., Zanuncio, J.C., Oliveira, J.A., Almeida, F.T., Pilon, A.M., Sedyama, C.S., Moreira, M.A., 2004. Effect of the

- Anticarsia gemmatalis* injury on the lipoxygenases activity from soybean leaves. Bioscience Journal 20(2): 37-46.
- Harsulkar, A.M., Giri, A.P., Patankar, A.G., Gupta, V.S., Sainani, M.N., Ranjekar, P.K., Deshpande, V.V. 1999. Successive use of non-host plant proteinase inhibitors required for effective inhibition of *Helicoverpa armigera* gut proteinases and larval growth. Plant Physiology 121: 497–506.
- Hilder, V.A., Gatehouse, A.M.R., Sheerman, S.E., Barker, R.F., Boulter, D. 1987. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. Nature. 330, 160–163.
- Holtz, A.M., Oliveira, H.G., Pallini, A., Marinho, J.S., Zanuncio, J.C., Oliveira, C.L. 2003. Adaptação de *Thyriniteina arnobia* em novo hospedeiro e defesa induzida por herbívoros em eucalipto. Pesquisa Agropecuária Brasileira 38: 453-458.
- Junqueira. R.G., Silva, E., Mares-Guia, M. 1992. Competitive parabolic inhibition of bovine trypsin by bis-benzamidines. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 25(9): 873-887.
- Lawrence, P.K., Koundal, K.R. 2002. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. Electronic Journal of Biotechnology 5(1):93-109.
- Mares-Guia, M., Shaw, E., 1965. Studies on the active center of trypsin. The binding of amidines and guanidines as models of the substrate side chain. Journal of Biological Chemistry 240: 1579-1585.
- Mares-Guia, M., Rogana, E., Amorin, A.F., Magalhães-Rocha, N.M. 1981. Kinetic evidence for a two-state, hybrid model for the trypsin activation by modifiers. The Journal of Biological Chemistry 256: 1661-1668. Marinho, J.S. 2006. Resposta bioquímica de lagartas de *Thyriniteina leucoceraea* (Lepidoptera: Geometridae)



submetidas ao inibidor de serino-proteases benzamidina. 52p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

Marinho, J.S., Oliveira, M.G.A., Guedes, R.N.G., Pallini, A., Oliveira, C.L. 2008.

Inibidores de proteases de hospedeiros nativos e exóticos e sua ação em intestinos de lagartas de *Thyrinteina leucoceraea*. Revista Árvore 32(6): 1125-1132.

Oliveira, M.G.A., Rogana, E., Rosa, J.C., Reinhold, B.B., Andrade, M.H., Greene, L.J.,

Mares-Guia, M. 1993. Tyrosine 151 is part of the substrate activation binding site. Journal of Biological Chemistry. 268:26893-26903.

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 gemmatalis*. Comparative Biochemistry and Physiology. 140 (B):369-380.

Pilon, A.M., Oliveira, M.G.A., Guedes, R.N.C. 2006. Protein digestibility, protease

activity and post-embryonic development of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*) exposed to the trypsin-inhibitor benzamidine. Pesticide Biochemistry and Physiology 86:23-29.

Takahashi, T., Kokubo, R., Sakaino, M. 2004. Antimicrobial activities of eucalyptus

leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata*. Letters in Applied Microbiology 39:60-64.

Vila, L., Quilis, J., Meynard, D., Breitler, J.C., Marfà, V., Murillo, I., Vassal, J.M.,

Messeguer, J., Guiderdoni, E., Segundo, B.S. 2005 Expression of the maize proteinase inhibitor (mpi) gene in rice plants enhances resistance against the striped stem borer (*Chilo suppressalis*): effects on larval growth and insect gut proteinases. Plant Biotechnology Journal 3:187–202.

Zanuncio J.C. 1993. Manual de Pragas em Florestas: Lepidoptera Desfolhadores de Eucalipto (Biologia, Ecologia e Controle). Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais– Sociedade de Investigações Florestais, Viçosa, Brazil.

Zanuncio J.C., Nascimento E.C., Garcia J.F., Zanuncio T.V. 1994. Major lepidopterous defoliators of eucalypt in southeast Brazil. *Forest Ecology and Management* 65, 53–63.

Zanuncio T.V., Zanuncio J.C., Miranda M.M.M., Medeiros A.G.B. 1998. Effect of plantation age on diversity and population fluctuation of Lepidoptera collected in Eucalyptus plantations in Brazil. *Forest Ecology and Management* 108, 91–8.

## CAPÍTULO 1

**Alteração no desenvolvimento de *Thyrinteina arnobia* por berenil**

## **Resumo**

Os inibidores de proteases (IPs) são especialmente conhecidos no processo de defesa das plantas em resposta ao ataque de insetos por sua ação sobre as proteases digestivas dos mesmos. A utilização dos IPs como alternativa para o manejo integrado de pragas tem sido amplamente estudada. Berenil é um inibidor sintético de tripsinas do tipo bis-benzamidina e seu potencial para uso como inseticida foi estudado contra *Thyrinteina arnobia*, um dos mais importantes desfolhadores de eucalipto no Brasil. Características da história de vida como o tempo de desenvolvimento, sobrevivência, peso de pupa e viabilidade, e os parâmetros da tabela de vida de *T. arnobia* foram avaliados nas larvas criadas em folhas de eucalipto com 0,00; 0,06; 0,12; 0,25; 0,50 e 0,75% (p/v) do IP berenil. O IP bis-benzamidina causou alongamento do ciclo larval de *T. arnobia*. A sobrevivência das larvas também foi severamente afetada por concentrações crescentes de berenil, enquanto que concentrações sub-letais afetaram parâmetros da tabela de vida de *T. arnobia*. Este estudo destaca o IP berenil como uma possível alternativa no controle de lagartas de *T. arnobia* em plantas de eucalipto.

**Palavras-chave:** Berenil, Lepidoptera, Geometridae, tripsina, TL50, tabela de vida.

## **Abstract**

Protease inhibitors (PIs) are well known in the defense of plants against insect attack by their action on the insect digestive proteases. The use of PIs as an alternative to integrated pest management has been widely studied. Berenil is one example of a bis-benzamidine synthetic trypsin inhibitor and its potential for use as an insecticide was studied against *Thyrinteina arnobia*, one of the most important eucalypt defoliators in Brazil. Life history traits including developmental time, survival, pupal weight and viability, and life table parameters of *T. arnobia* were assessed in larvae reared on leaves of eucalyptus with 0.00, 0.06, 0.12, 0.25, 0.50 and 0.75% (w/ v) of IP berenil. Bis-benzamidine PI caused a delay in larval development. Larval survival was also severely affected by increasing berenil concentrations and sub-lethal concentrations affected life table parameters of *T. arnobia*. The efficacy of berenil as insecticide against these insects suggests its potential use against eucalypt defoliating caterpillars such as *T. arnobia*.

**Keywords:** Berenil, Lepidoptera, Geometridae, trypsin,  $LT_{50}$ , life table.

## 1. Introdução

Herbívoros da ordem Lepidoptera são pragas em uma extensa variedade de plantas de importância agrônômica em todo o mundo e o uso extensivo de pesticidas tem causado a seleção de insetos resistentes; assim, há a necessidade de buscar novas medidas de controle, de forma a integrar o manejo de pragas (Lawrence & Koundal, 2002; Srinivasan *et al.*, 2006).

Os inibidores de proteases (IPs) são especialmente conhecidos no processo de defesa das plantas em resposta ao ataque de insetos por sua ação sobre as proteases digestivas dos mesmos (Gatehouse & Gatehouse, 1998; Oliveira *et al.*, 2005). Ao serem ingeridos, os IPs inibem a atividade das enzimas proteolíticas no intestino médio, induzindo à hiperprodução das enzimas digestivas, o que resulta em comprometimento do desenvolvimento do inseto, pois grande parte dos aminoácidos essenciais deixa de ser utilizado na síntese protéica para ser gasto na produção de enzimas digestivas (Broadway & Duffey, 1986; Broadway, 1995; Oliveira *et al.*, 2005). Como consequência, os insetos podem se tornar fracos, com crescimento e desenvolvimento reduzidos (redução de fecundidade, decréscimo de peso, deformações) e chegar logo à morte (Carlini & Grossi-de-Sá, 2002; Lawrence & Koundal, 2002; Oliveira *et al.*, 2005).

Os efeitos dos inibidores de proteases nos insetos já foram comprovados de diversas maneiras: incorporados na dieta do inseto (Pompermayer *et al.*, 2003; Pilon *et al.*, 2006), pulverizados diretamente sobre a planta (Marinho, 2006) e expressos em plantas transgênicas (Ortego, *et al.*, 2001; Vila *et al.*, 2005; Maheswaran *et al.*, 2007; Steppuhn & Baldwin, 2007). Existem inibidores de proteases específicos para cada uma das quatro classes de enzimas proteolíticas (Lawrence & Koundal, 2002; Oliveira *et al.*, 2005) - serino, cisteíno, aspartato e metalo-proteases. Inibidores de serino-proteases têm

sido descritos em diversas espécies de plantas em todo o reino vegetal, sendo os inibidores de tripsina o tipo mais comum (Lawrence & Koundal, 2002; Oliveira *et al.*, 2005).

Benzamidina é um inibidor sintético de tripsinas que vem sendo utilizado para estudar a resposta de insetos a inibidores de protease na dieta, como realizado por Pilon *et al.* (2006) com a lagarta-da-soja e de Marinho (2006) com lagartas de *Thyriniteina leucoceraea*. Pilon *et al.* (2006) observaram que lagartas de *Anticarsia gemmatalis* tiveram a atividade proteolítica afetada pela ingestão de diferentes concentrações do inibidor, o que também foi observado em lagartas de *T. leucoceraea* (Marinho, 2006).

Berenil é uma bis-benzamidina, sendo também inibidor sintético das enzimas do tipo tripsina. O inibidor bis-benzamidina, além de se ligar ao centro ativo da tripsina como inibidor competitivo, liga-se ao sítio ativo secundário da enzima (Oliveira *et al.*, 1993). Moreira (2007) observou que berenil adicionado à dieta artificial de *A. gemmatalis* afetou negativamente diversos parâmetros de vida do inseto, sendo ele uma alternativa promissora para estudos que visam ao controle de herbívoros. Em estudos realizados utilizando dietas com diferentes composições nutricionais, Pompermayer *et al.* (2003) concluíram que a composição da dieta pode afetar a ação dos IPs e que, portanto, o efeito de proteínas anti-nutricionais seria melhor avaliado quando em dieta natural.

Lagartas de *T. arnobia* alimentam-se naturalmente de plantas de eucalipto no Brasil, nas quais são consideradas severas pragas desfolhadoras (Holtz *et al.*, 2003). O eucalipto é nativo da Austrália e o gênero *Eucalyptus* possui cerca de 600 espécies e variedades. Como a planta de eucalipto tem um rápido crescimento e é adequada para a manufatura de papel, florestas de eucalipto têm sido extensivamente cultivadas em diversas partes do mundo (Takahashi *et al.*, 2004). As árvores de eucalipto podem

também ser utilizadas como carvão vegetal na indústria siderúrgica e são importantes no trabalho de reflorestamento de áreas áridas e degradadas de diversas partes do mundo (Mendel *et al.*, 2004). As lagartas de *T. arnobia*, também conhecidas por “lagarta de cor parda”, “lagarta parda” e “lagarta mede-palmo”, ocorrem em quase toda a América do Sul e parte da América Central (Zanuncio *et al.*, 1993). Além de sofrerem perdas na taxa fotossintética devida à desfolha, as plantas de eucalipto podem ter o crescimento paralisado no caso de ataques sucessivos dessa lagarta (Pedrosa-Macedo *et al.*, 1998).

Visando estudar o potencial inseticida de berenil, um inibidor de proteases sintético do tipo bis-benzamidina, quando em dieta natural, sobre *T. arnobia*, realizou-se este estudo sobre a influência de diferentes concentrações deste inibidor sintético sobre parâmetros biológicos do ciclo de vida do inseto, a fim de verificar quais fases do inseto são mais afetadas e em qual concentração do inibidor isso ocorre.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Insetos e materiais**

Posturas de *T. arnobia* foram obtidas a partir da criação mantida na Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Botucatu, São Paulo, Brasil. Para a realização do experimento, foi selecionada a espécie *Eucalyptus grandis* devido ao seu interesse econômico, principalmente para a produção de papel e celulose, carvão vegetal e óleos essenciais. Além disso, as lagartas de *T. arnobia* têm preferência por *E. grandis* em comparação a outras espécies (Oliveira *et al.*, 1984; Lemos, 1996). As mudas de eucalipto foram adquiridas em um viveiro da região, livres de qualquer aplicação foliar, transplantadas para vasos (volume = 1,7 m<sup>3</sup>) e, quando utilizadas, apresentavam aproximadamente 60 cm de altura. O IP berenil (aceturato de diminazeno) foi obtido da



Sigma-Aldrich Química Brasil (São Paulo, Brasil). O espalhante adesivo Gotafix ( $C_{35}H_{64}N_{11}$ ) foi obtido do fabricante Milenia Agro Ciências S.A.

## 2.2. Biologia comparada de *T. arnobia* em folhas de eucalipto contendo diferentes concentrações do inibidor de proteases berenil

As concentrações de berenil utilizadas nos testes foram selecionadas a partir de testes preliminares realizados com este IP em lagartas de *T. leucoceraea* e considerando experimentos realizados utilizando o IP benzamidina em *Anticarsia gemmatalis* (Pilon *et al.*, 2008) e *T. leucoceraea* (Marinho *et al.*, 2008).

Para o experimento, foram montados três blocos, sendo cada bloco composto por seis tratamentos, caracterizados por diferentes concentrações de berenil. Para cada tratamento foram utilizadas 13 repetições, sendo cada uma composta por uma lagarta de *T. arnobia*.

Cada bloco foi formado por uma postura de *T. arnobia*, havendo uniformidade dentro dos blocos, entre os tratamentos, quanto à origem e idade dos indivíduos estudados. Foram testados seis tratamentos: lagartas alimentadas de folhas contendo solução controle de Gotafix a 0,06% (v/v) e de folhas com a solução de Gotafix a 0,06% (v/v) acrescentada de berenil nas concentrações de 0,06; 0,12; 0,25; 0,5 ou 0,75% (p/v), em água destilada. Uma mesma preparação de cada solução foi utilizada para os três blocos. A adição de Gotafix teve por finalidade apenas obter maior aderência do IP à folha.

Lagartas recém-eclodidas de *T. arnobia* foram individualizadas em placas de Petri plásticas (diâmetro = 9 cm). Cada tratamento foi composto por 39 indivíduos, sendo 13 em cada bloco. Quando coletada, cada folha de eucalipto teve o pecíolo envolto por algodão embebido em água e posteriormente coberto por papel alumínio, para manter a umidade. Cada folha de eucalipto foi, então, imersa por três vezes em um

frasco de Becker contendo a solução correspondente ao tratamento e colocada sobre papel toalha, à sombra, por aproximadamente cinco segundos, de forma que apenas a borda da folha tivesse contato com o papel, para retirar o excesso da solução. Em seguida, a folha foi colocada dentro da placa de Petri, sob a lagarta. As placas foram vistoriadas diariamente e as trocas de folhas realizadas conforme a necessidade, havendo sempre folha em bom estado e quantidade suficiente na placa. Quando as lagartas atingiram o quinto ínstar, devido ao tamanho, foram transferidas para copos plásticos (500 mL) tampados com organza e elástico. Foram acompanhadas as condições de temperatura, umidade e fotoperíodo (aproximada), sendo elas, respectivamente:  $26 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ,  $60 \pm 15\%$  e LD 12:12.

As pupas foram acondicionadas em copos plásticos forrados no fundo com papel toalha e nas laterais com papel filtro, umedecido diariamente (Wilcken, 1996). Os copos foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), umidade relativa ( $70 \pm 10\%$ ) e fotoperíodo (LD 12:12).

Os seguintes parâmetros foram avaliados: número de ínstars, duração de cada ínstar, tamanho das cápsulas cefálicas, ciclo larval, mortalidade total e em cada ínstar, período de pré-pupa, peso pupal, ciclo pupal, viabilidade da fase de pupa e razão sexual (número de fêmeas/ número total de adultos). As cápsulas cefálicas foram medidas com um micrômetro digital (Wild MMS 235 acoplado à ocular Wild Typ 325400, Wild Heerbrugg Ltd., Heerbrugg, Suíça). Para se obter pupas suficientes para estudos das fases pupal e adulta (devido à possível mortalidade), foi mantida, em mesmas condições ambientais e alimentares, uma criação paralela como criação estoque com 120 insetos para cada tratamento.

Para a formação dos casais, os adultos tiveram o sexo identificado, sendo as fêmeas com asas de coloração branca apresentando pontuações negras esparsas e

antenas filiformes e os machos menores, com asas de coloração castanha variável e antenas bipectinadas (Zanuncio *et al.*, 1993). Para análise da fase adulta, cada casal obtido de *T. arnobia* foi tido como uma repetição e foi acondicionado em uma gaiola cilíndrica de cartolina (diâmetro = 8,5 cm, altura = 19 cm), cujas extremidades foram fechadas por placas de Petri plásticas (diâmetro = 9 cm) e as laterais forradas com papel filtro para facilitar a retirada das posturas (Wilcken, 1996). Diariamente era colocado dentro da gaiola um chumaço de algodão embebido de uma solução de mel 10% (v/v). Foram observados os períodos de pré-oviposição e período de oviposição, número total de ovos/fêmea, período de incubação dos ovos, número de ovos eclodidos, longevidade dos adultos e o ciclo total (período de eclosão dos ovos até morte do adulto). Os casais foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ), umidade relativa ( $70 \pm 10\%$ ) e fotoperíodo (LD 12:12).

### 2.3. Análises estatísticas

Curvas de sobrevivência foram usadas para analisar as diferenças entre a mortalidade das lagartas submetidas a concentrações crescentes de berenil. Curvas Kaplan-Meier foram geradas com base na porcentagem de lagartas sobreviventes em função dos dias a partir do início do experimento. O tempo médio de sobrevivência ( $TL_{50}$ ) foi estimado e analisado através do protocolo PROC LIFETEST. As lagartas que sobreviveram até a emergência foram tratadas como dados censurados.

Os seguintes parâmetros da tabela de vida e fertilidade foram analisados para os tratamentos com 0%, 0,06% e 0,12% de berenil (nos demais não houve formação de casais devido à alta mortalidade causada pelo IP):  $n$  = número de fêmeas;  $R_0$  = taxa líquida de reprodução (fêmea/fêmea/geração);  $r_m$  = taxa intrínseca de crescimento (fêmea/fêmea/dia);  $T$  = tempo médio da geração (dias);  $TD$  = tempo de duplicação (dias). Tais parâmetros foram calculados utilizando as seguintes fórmulas (Carey, 1982;

Brodsgaard, 1994): probabilidade de sobrevivência ( $l_x = N_x/N_0$ ); número de posturas por intervalo de tempo ( $m_x$ ); expectativa de vida ( $e_x = T_x/l_x$ ); valor reprodutivo por idade ( $V_x = l_x \times m_x$ ); taxa líquida de reprodução ( $R_0 = \sum V_x$ ); taxa intrínseca de crescimento ( $r_m, l = \sum e^{(-r_m \times x)} \times V_x$ ); taxa finita de crescimento ( $\lambda = e^{r_m}$ ); tempo médio de uma geração ( $T = (l_n R_0)/r_m$ ) e tempo para duplicação da geração ( $DT = (\ln 2)/r_m$ ). Os parâmetros calculados foram submetidos ao teste t de Student (PROC GLM; SAS Institute, 2001)

Os demais parâmetros avaliados quando sujeitos à dieta com concentrações crescentes de berenil foram submetidos à análise de regressão testando modelos desde os mais simples (linear e quadrático), até os modelos alternativos de maior complexidade (modelos não-lineares de pico) (SPSS 2000). Cada escolha do modelo foi efetuada com base no coeficiente de determinação ajustado ( $R^2$  ajust.), no coeficiente de determinação ajustado relativo ( $R^2$  ajust. rel.), simplicidade e alto valor de F (e quadrado de média). O  $R^2$  ajustado relativo foi calculado dividindo-se o  $R^2$  ajustado do modelo selecionado pelo  $R^2$  ajustado máximo possível dentre as alternativas de modelos, para obter uma indicação da qualidade do ajuste do modelo selecionado em relação às demais opções.

Foram consideradas apenas as cápsulas cefálicas das lagartas que completaram todo o ciclo, chegando à fase adulta. As cápsulas foram medidas a partir do segundo ínstar, exceto para as lagartas dos tratamentos com 0% e 0,06% de berenil. As cápsulas do primeiro ínstar são muito pequenas e geralmente ingeridas pelas lagartas após a ecdise, o que dificultou a coleta.

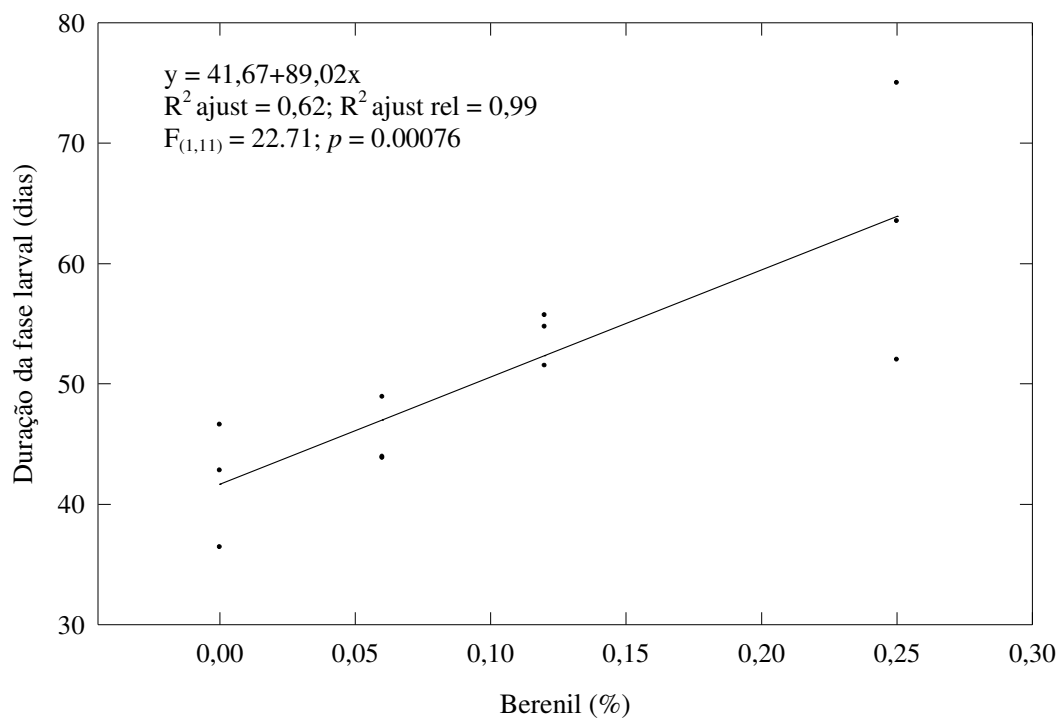
Para avaliar o número de ínstars larvais da maioria das lagartas de cada tratamento, a frequência do último ínstar larval foi submetida ao teste qui-quadrado ( $P \leq 0,05$ ) (SAEG, 2007). Análises com dados relacionados a pupas e adultos não

envolveram os tratamentos com as concentrações de 0,75%; 0,5% e, em alguns casos, também de 0,25% de berenil porque os indivíduos desses tratamentos não alcançaram essas fases, morrendo antes, durante a fase larval.

Análise de covariância (PROC GLM; SAS Institute 2001) foi realizada para avaliar a significância de concentração de berenil, sexo dos insetos e da interação de ambos para os seguintes parâmetros: duração larval, duração da fase de pupa, peso de pupas, longevidade de adultos e duração do ciclo total. Após análise de covariância, os parâmetros que apresentaram significância para efeito de concentração foram submetidos à regressão.

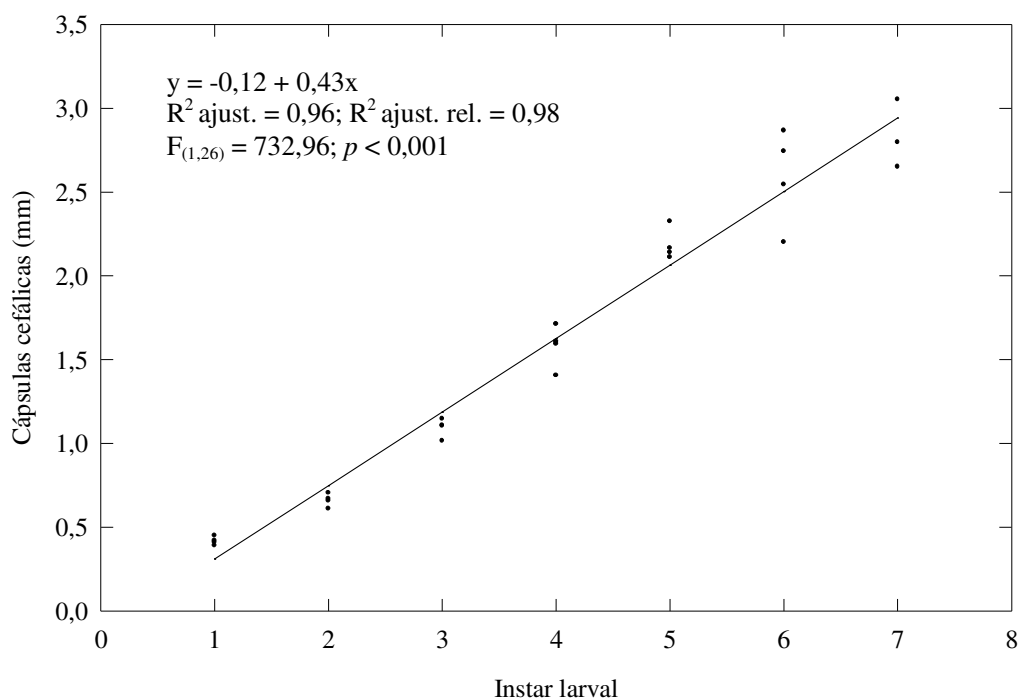
### 3. Resultados

A duração da fase larval sofreu efeito significativo de concentração de berenil (ANCOVA:  $F = 13,58$ ;  $gl = 1, 68$ ;  $p < 0,0001$ ), sendo que lagartas que originaram fêmeas tiveram duração maior comparadas àquelas que originaram machos (ANCOVA:  $F = 6,59$ ;  $gl = 1, 68$ ;  $p = 0,01$ ). Entretanto, não houve interação significativa entre concentração de berenil e sexo de *T. arnobia* (ANCOVA:  $F = 0,81$ ;  $gl = 1, 68$ ;  $p = 0,45$ ). A duração larval média acompanhada do erro padrão, em dias, para os tratamentos com 0,0; 0,06; 0,12 e 0,25% de berenil foram, respectivamente, para machos: 38,8 ( $\pm 4,19$ ); 40,1 ( $\pm 2,24$ ); 54 ( $\pm 0$ ) e 63,5 ( $\pm 6,63$ ); e para fêmeas: 45 ( $\pm 1,78$ ); 51 ( $\pm 3,21$ ) e 54 ( $\pm 2,54$ ) (não houve fêmeas no tratamento com 0,25% de berenil). Quanto maior a concentração de berenil oferecida às lagartas em folhas de eucalipto, maior foi a duração da fase larval de *T. arnobia* (Figura 1).



**Figura 1.** Duração da fase larval (dias) de lagartas de *T. arnobia* alimentadas com concentrações crescentes de Berenil em folhas de eucalipto. Cada ponto representa a média de um bloco.

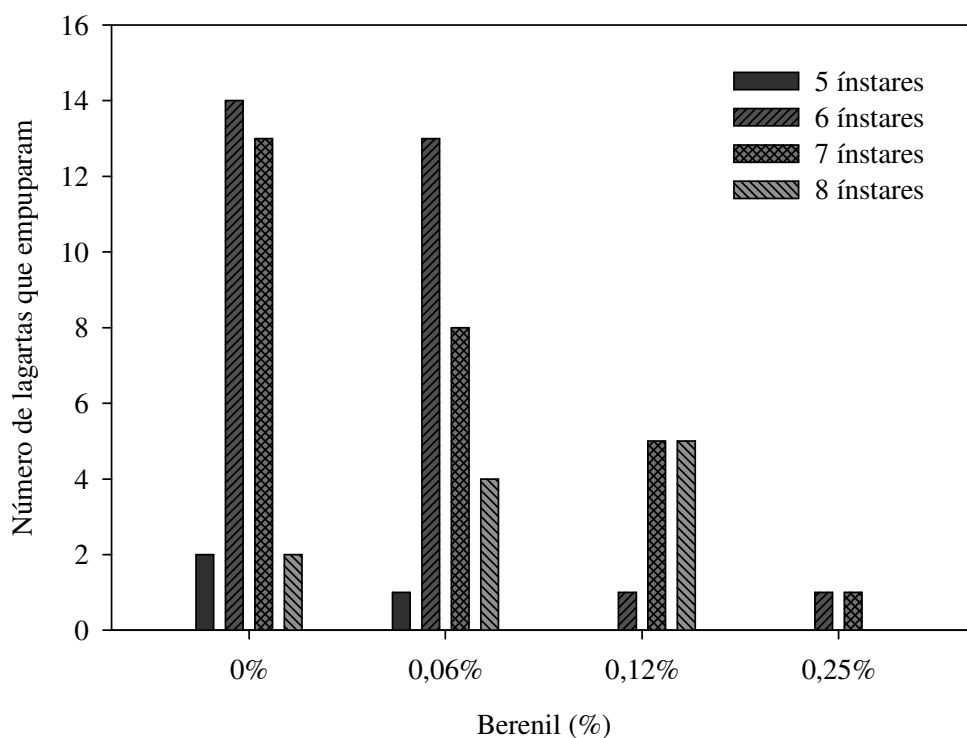
Uma mesma curva foi encontrada para as larguras das cápsulas cefálicas de lagartas de *T. arnobia* de todos os tratamentos (Figura 2). Dessa forma, as diferentes concentrações de berenil não afetaram a razão de crescimento em lagartas de *T. arnobia*.



**Figura 2.** Larguras de cápsulas cefálicas em cada ínstar larval de lagartas de *T. arnobia*.

Cada ponto representa a cápsula cefálica de um indivíduo.

A maioria das lagartas submetidas aos tratamentos sem o IP e com 0,06% do IP empupou nos ínstares 6 e 7 (Figura 3). Apenas lagartas desses dois tratamentos empuparam no quinto ínstar; as dos demais tratamentos empuparam a partir do sexto ínstar, tendo a maioria das lagartas do tratamento com 0,12% de IP chegado a pupa apenas nos sétimo e oitavo ínstares. Apenas duas lagartas submetidas ao tratamento com 0,25% chegaram à fase de pupa e não houve diferença entre os ínstares.

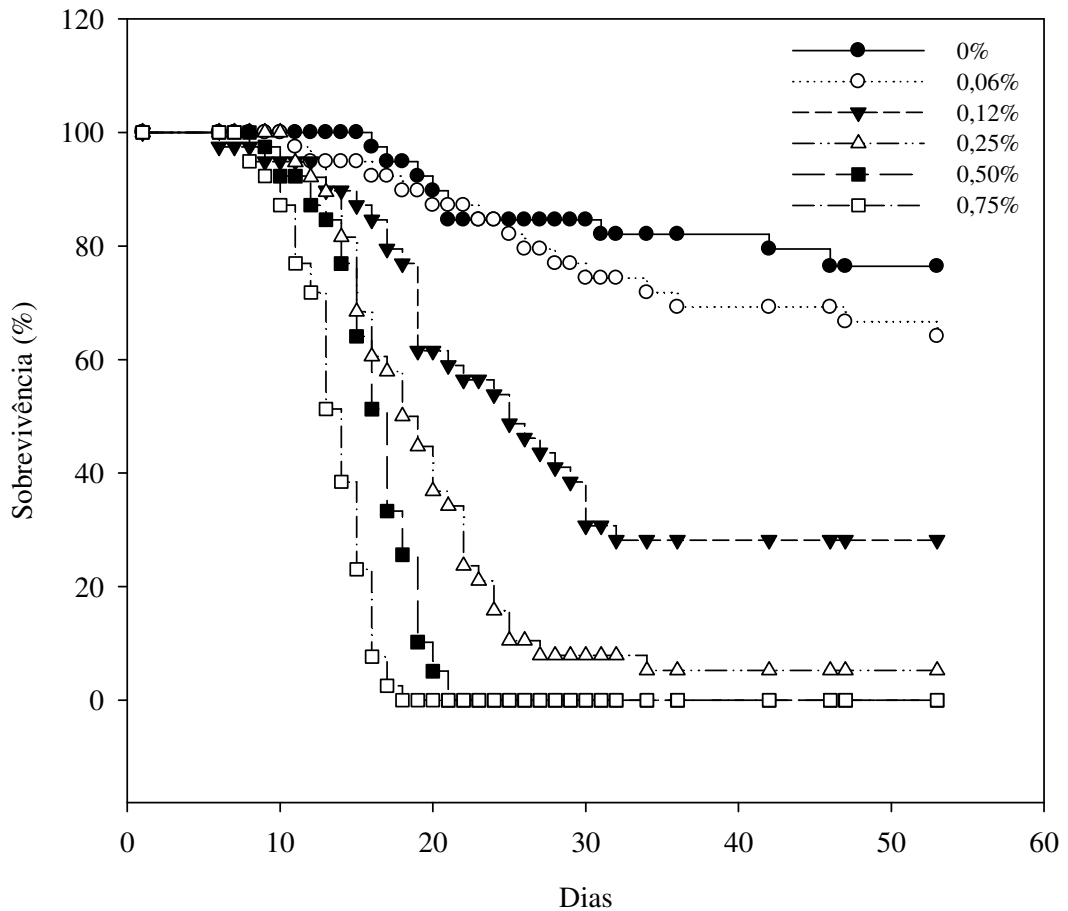


**Figura 3.** Influência de diferentes concentrações de berenil em folhas de eucalipto sobre a quantidade de ínstares apresentada na fase larval de *T. arnobia*. O teste qui-quadrado, comparando a distribuição dentro de cada concentração, foi significativo para os tratamentos com 0%, 0,06% e 0,12% de berenil ( $p \leq 0,05$ ).

A sobrevivência de larvas que foram alimentadas com folhas imersas na solução controle e nas soluções testes, com o IP, pode ser observada na Figura 4. No décimo oitavo dia foi atingida a mortalidade de 100% das lagartas alimentadas com 0,75% de berenil, sendo que 60,5% delas morreram ainda no primeiro ínstar e nenhuma alcançou o terceiro ínstar. As lagartas alimentadas com 0,5% de berenil sobreviveram até o vigésimo primeiro dia, sendo que 25,6% das lagartas morreram ainda no primeiro ínstar, apenas 10,2% chegaram ao terceiro ínstar e nenhuma delas alcançou o quarto ínstar. Chegaram à fase de pupa apenas 7,7% das lagartas alimentadas com 0,25% do IP e

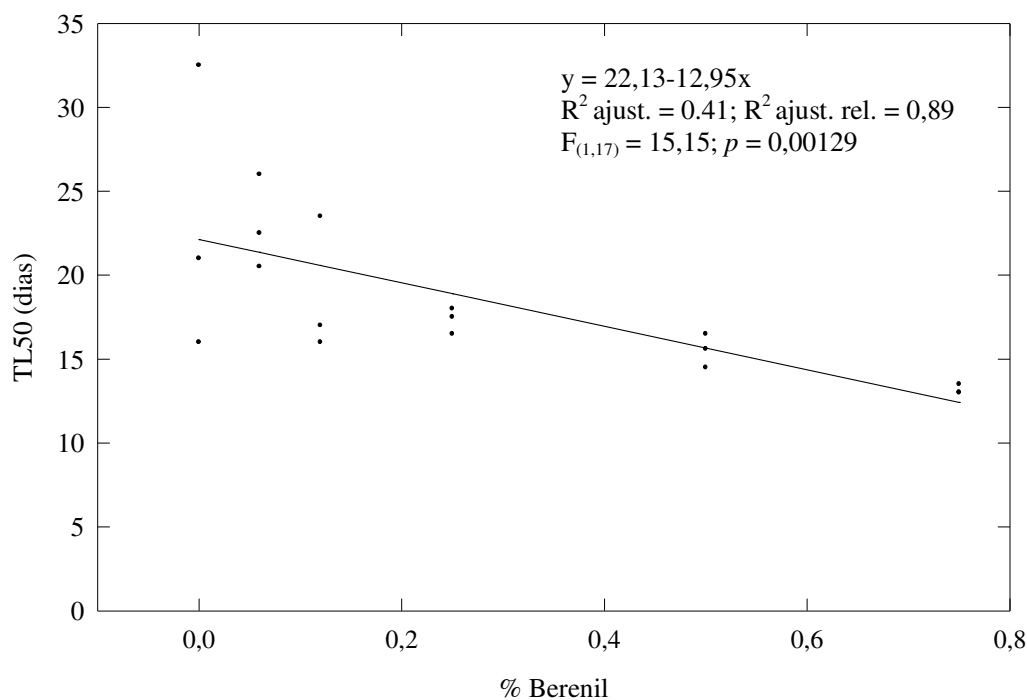


38,5% das alimentadas com 0,12% do IP na solução. Para estes tratamentos, com 0,12% e 0,25% de berenil, a mortalidade foi maior em lagartas do segundo ínstar (25,6% e 46,1%, respectivamente). No tratamento controle, 82,0% das lagartas alcançaram a fase de pupa, seguido por 66,7% de pupas para o tratamento com 0,06% de berenil.



**Figura 4.** Sobrevivência de lagartas de *T. arnobia* alimentadas com concentrações crescentes de berenil em folhas de eucalipto. O teste qui-quadrado foi significativo para as curvas de sobrevivência dos diferentes tratamentos ( $p < 0,0001$ ).

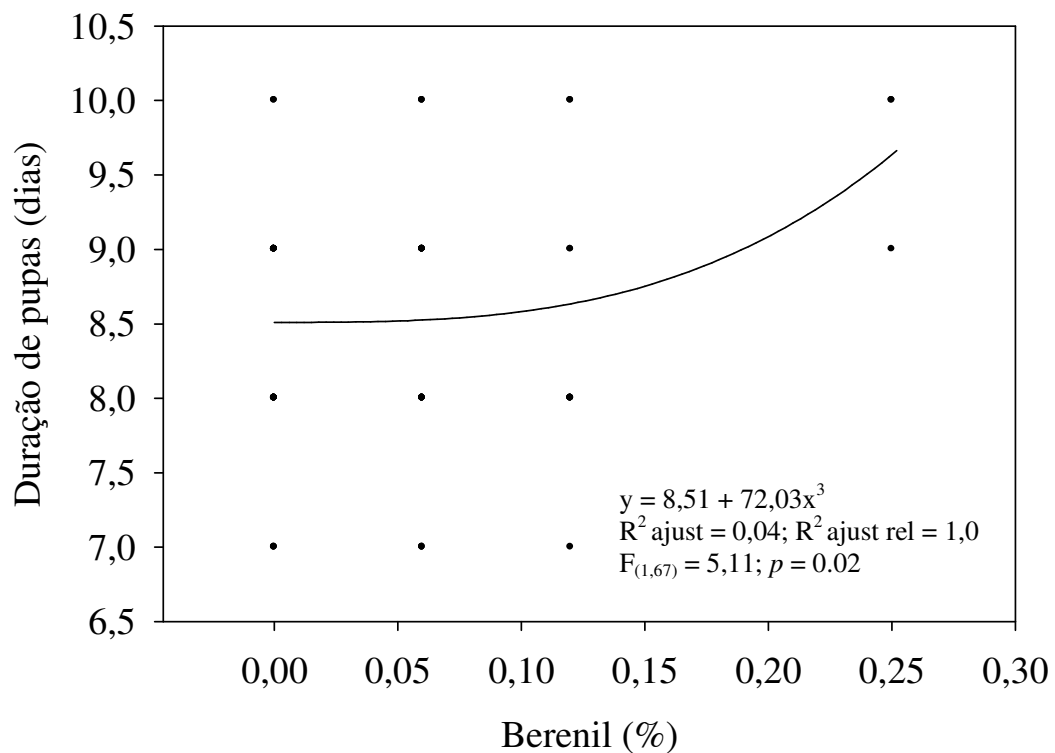
O tempo médio de sobrevivência (TL50) decresceu à medida que aumentou a concentração de berenil oferecida às lagartas em folhas de eucalipto (Figura 5).



**Figura 5.** Tempo necessário para causar a mortalidade de aproximadamente metade da população (TL50) de *T. arnobia* alimentadas com concentrações crescentes de berenil em folhas de eucalipto. Cada ponto representa a média de um bloco.

A duração da fase pupal de *T. arnobia* sofreu efeito significativo de concentração de berenil (ANCOVA:  $F = 2,96$ ; g.l. = 1, 68;  $p = 0,03$ ), sendo que pupas que deram origem a fêmeas tiveram duração maior em relação àquelas que originaram machos (ANCOVA:  $F = 60,10$ ; g.l. = 1, 68;  $p < 0,0001$ ). Entretanto, não houve interação entre concentração de berenil e sexo de pupas (ANCOVA:  $F = 2,17$ ; g.l. = 1, 68;  $p = 0,12$ ). A duração média da fase pupal, acompanhada do erro padrão, em dias,

para os tratamentos com 0,0; 0,06; 0,12 e 0,25% de berenil foram, respectivamente, para machos: 9,0 ( $\pm$  0,14); 9,0 ( $\pm$  0,18); 10,0 ( $\pm$  0) e 9,7 ( $\pm$  0,28); e para fêmeas: 8,0 ( $\pm$  0,18); 7,8 ( $\pm$  0,13) e 8,11 ( $\pm$  0,2) (não houve fêmeas no tratamento com 0,25% de berenil). Berenil em maiores concentrações prolongou a fase de pupa de *T. arnobia* (Figura 6).



**Figura 6.** Duração da fase pupal de lagartas de *T. arnobia* alimentadas com concentrações crescentes de berenil em folhas de eucalipto. Cada ponto representa a duração de uma pupa.

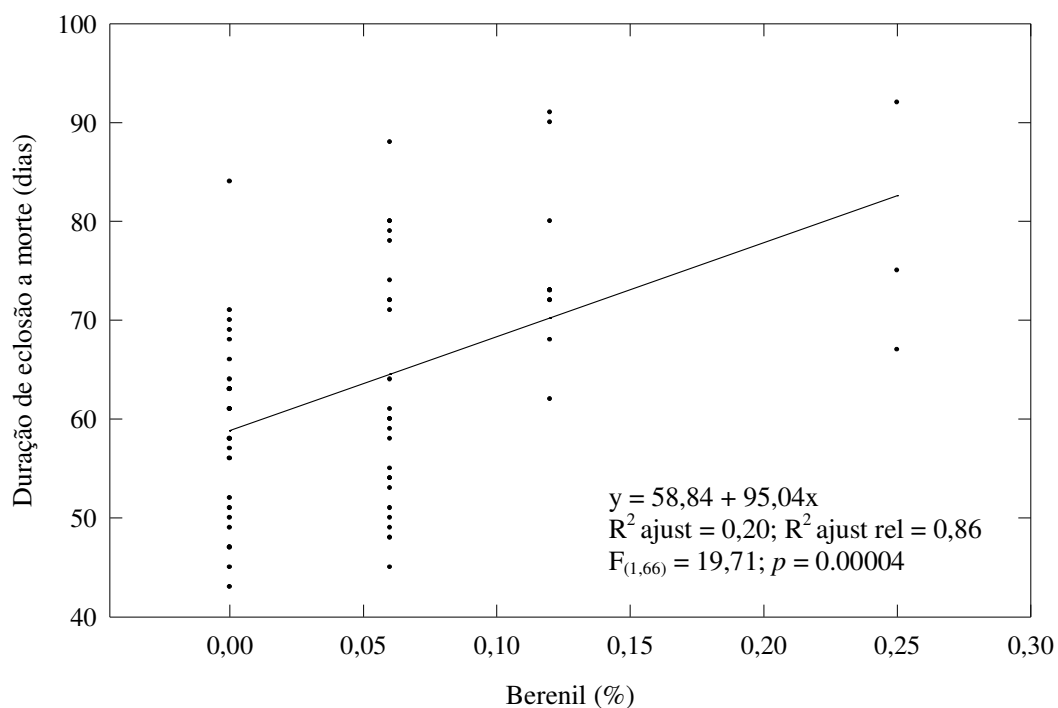
Nos tratamentos em que houve formação de pupas, a viabilidade observada para esta fase foi de 100%, não havendo influência do berenil sobre este parâmetro. Não houve também influência da concentração de berenil sobre o peso das pupas

(ANCOVA:  $F = 2,05$ ; g.l. = 1, 63;  $p = 0,11$ ), havendo efeito apenas do sexo sobre este parâmetro, sendo pupas de fêmeas mais pesadas que pupas de machos (ANCOVA:  $F = 184,58$ ; g.l. = 1, 63;  $p < 0,0001$ ), o que já era esperado para *T. arnobia* (Holtz *et al.*, 2003). As médias do peso de pupas de fêmeas (g) e machos (g), seguidas do erro padrão da média, foram, respectivamente:  $0,36 (\pm 0,010)$  e  $0,13 (\pm 0,007)$ .

A longevidade de adultos de *T. arnobia* não foi influenciada pelas diferentes concentrações de berenil nas folhas de eucalipto (ANCOVA:  $F = 0,62$ ; g.l. = 1, 69;  $p = 0,60$ ), havendo influência apenas do sexo, sendo que fêmeas apresentaram maior longevidade que machos (ANCOVA:  $F = 39,55$ ; g.l. = 1, 69;  $p < 0,0001$ ). As médias da longevidade de fêmeas (dias) e machos (dias), seguidas do erro padrão da média, foram, respectivamente:  $9,9 (\pm 0,51)$  e  $5,8 (\pm 0,25)$ .

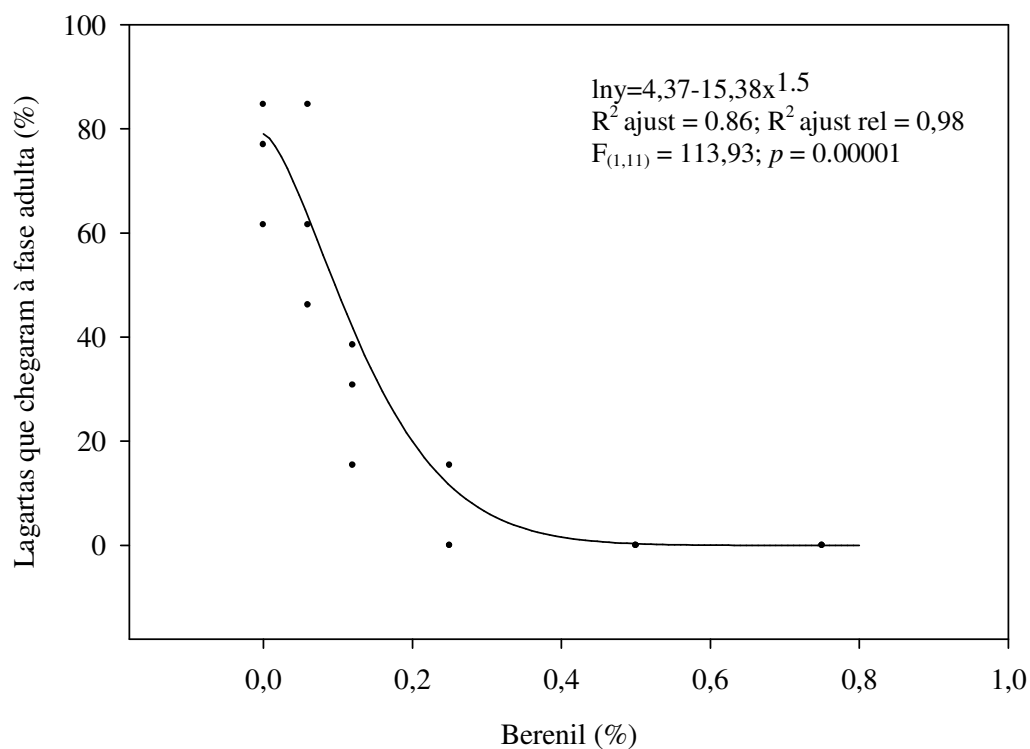
A duração e a viabilidade da fase embrionária não sofreram influência das diferentes concentrações de berenil sobre tais parâmetros. A média da duração dos ovos (dias), seguida do erro padrão da média, foi de  $8,7 (\pm 0,10)$ . A viabilidade média dos ovos, seguida do erro padrão da média, foi de  $60,0\% (\pm 5,22)$ .

A duração de toda a fase de *T. arnobia* sofreu efeito da concentração de berenil administrada às lagartas (ANCOVA:  $F = 11,81$ , g.l. = 1, 62;  $p < 0,0001$ ), sendo que fêmeas apresentaram maior duração total do ciclo em relação a machos (ANCOVA:  $F = 11,09$ ; g.l. = 1, 62;  $p = 0,0015$ ). Entretanto, não houve interação entre concentração de berenil e sexo de *T. arnobia* (ANCOVA:  $F = 0,76$ ; g.l. = 1, 62;  $p = 0,47$ ). O ciclo de vida de *T. arnobia* se prolongou à medida que aumentou a concentração de berenil em folhas de eucalipto oferecidas às lagartas (Figura 7).



**Figura 7.** Duração total do ciclo de indivíduos de *T. arnobia* alimentados com concentrações crescentes de berenil em folhas de eucalipto. Cada ponto representa a duração do ciclo de um indivíduo.

A viabilidade total de *T. arnobia* em função dos tratamentos com diferentes concentrações de berenil pode ser observada na Figura 8. A viabilidade decresceu à medida que aumentou a concentração de berenil administrada aos insetos.



**Figura 8.** Viabilidade de indivíduos de *T. arnobia* alimentados com concentrações crescentes de berenil em folhas de eucalipto. Cada ponto representa a média de um bloco.

Os parâmetros da tabela de vida e fertilidade (Tabela 1) indicaram que a taxa líquida reprodutiva ( $R_0$ ) foi significativamente menor para os insetos criados com o berenil na dieta em ambas as concentrações testadas. Os insetos tratados com 0,12% de berenil apresentaram também reduzida taxa intrínseca de crescimento ( $r_m$ ), tempo médio da geração (T) e tempo para duplicação da população (TD).

**Tabela 1.** Tabela de vida e fertilidade para *T. arnobia* alimentada com diferentes concentrações de berenil

Berenil	n	R <sub>0</sub>	r <sub>m</sub>	T	TD
0%	12	226,89 a	0,09 a	57,90 a	7,39 a
0,06%	8	154,48 bc	0,08 a	57,30 a	7,88 a
0,12%	7	107,73 c	0,06 b	66,93 b	9,91 b

n – número de fêmeas; R<sub>0</sub> – taxa líquida de reprodução (fêmea/fêmea/geração); r<sub>m</sub> – taxa intrínseca de crescimento (fêmea/fêmea/dia); T – tempo médio da geração (dias); e TD – tempo de duplicação (dias). Valores seguidos por letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste t de Student ( $P \leq 0,05$ ).

#### 4. Discussão

O potencial inseticida dos inibidores de proteases tem sido demonstrado em diversos estudos quando esses são ingeridos em dieta natural ou artificial, sugerindo que esses compostos podem ser efetivos no controle de insetos. Entretanto, o custo dos compostos naturais é elevado, o que motiva a busca por compostos sintéticos, miméticos, que sejam eficientes e menos onerosos. Além disso, estudos indicam que o efeito de proteínas anti-nutricionais, tais como os IPs, no controle de insetos não são adequadamente avaliados quando os bioensaios se baseiam na incorporação dos inibidores em dietas artificiais (Pompermayer *et al.*, 2003). Sendo assim, no presente trabalho foi utilizado o IP sintético de tripsinas-like berenil aplicado diretamente sobre as folhas de eucalipto, dieta natural de lagartas de *T. arnobia*.

A produção de inibidores de enzimas digestivas pode prejudicar o crescimento do inseto, bem como sua sobrevivência e fertilidade, através da inibição da atividade das proteases no intestino do inseto, a qual reduz a biodisponibilidade de aminoácidos

essenciais (Broadway, 1995; Koiwa *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 2005). No presente estudo, observou-se que lagartas de *T. arnobia* foram severamente afetadas pelo IP berenil em folhas de eucalipto. Tanto efeitos letais quanto efeitos sub-letais foram observados durante todo o ciclo de indivíduos de *T. arnobia* tratados com diferentes concentrações do IP.

Berenil reduziu a viabilidade de lagartas de *T. arnobia*, impossibilitando a fase adulta para as lagartas que se alimentaram das concentrações de 0,50% e 0,75% de berenil e causando mortalidade principalmente nos primeiros ínstaes larvais do inseto. Alta mortalidade também foi observada em lagartas de *Helicoverpa armigera* quando alimentadas com inibidores de tripsina (Telang *et al.*, 2009) e em indivíduos de *Leptinotarsa decemlineata* quando alimentados com o inibidor de cisteíno-proteases E-64 em dieta artificial (Lalitha *et al.*, 2005).

As concentrações acima de 0,25% de berenil reduziram severamente ou impediram a sobrevivência de lagartas de *T. arnobia*. Nos demais tratamentos houve formação de um expressivo número de adultos; entretanto, além dos efeitos letais, é muito importante verificar os efeitos não-letais de determinado produto sobre a população do inseto.

As lagartas que conseguiram sobreviver à ingestão do IP apresentaram maior duração do ciclo de vida total, devido ao prolongamento dos períodos larval e de pupas. O aumento no período larval pode estar associado à presença de um ínstar adicional, como observado na maioria das lagartas de *T. arnobia* tratadas com 0,12% de berenil, em relação às lagartas do tratamento controle. Pompermayer *et al.* (2001) observaram que lagartas de *Diatraea saccharalis* também apresentaram um ínstar adicional quando alimentadas com dieta contendo o IP da soja, o que prolongou o tempo de desenvolvimento das mesmas em relação às lagartas alimentadas com dieta sem o IP.



Em determinadas espécies, o número de ínstaes pode ser constante entre os indivíduos ou pode variar, especialmente se houver condições desfavoráveis, como no caso da ingestão dos IPs (Slansky & Scriber, 1985). O aumento da duração larval expõe o inseto por um período maior de tempo a intempéries, parasitóides, predadores e patógenos (Mochizuki et al., 1999), bem como ao risco de consumir níveis deletérios de toxinas (Raubenheimer, 1992). Todos esses fatores podem contribuir para o aumento da mortalidade de lagartas em condições naturais.

Para todos os tratamentos, os indivíduos de *T. arnobia* que sobreviveram à ingestão de berenil durante a fase larval não tiveram a taxa de crescimento reduzida e conseguiram concluir seu ciclo, chegando à fase adulta, pois não houve redução na viabilidade de pupa. Tais insetos sobreviventes sofreram aumento no tempo de desenvolvimento de pupas, mas não tiveram alteração na longevidade de adultos e nem na duração e viabilidade dos ovos.

Os parâmetros da tabela de vida e fertilidade são apropriados para medir o efeito dos IPs sobre a dinâmica populacional do inseto. No presente trabalho, verificou-se que berenil prejudicou o desenvolvimento da população de *T. arnobia*. As concentrações de 0,06% e 0,12% de berenil causaram redução na taxa líquida reprodutiva da população de *T. arnobia*, valor que estima a quantidade de fêmeas produzidas por cada fêmea em uma geração. Além disso, berenil causou redução da taxa intrínseca de crescimento da população de *T. arnobia*, elevou o tempo médio de cada geração e o tempo para a duplicação da geração, quando usada a concentração de 0,12%. O estudo da tabela de vida e fertilidade de *D. sacharalis* também apresentou prejuízo para todos os parâmetros populacionais quando as lagartas foram tratadas com 0,5% de inibidor de protease de soja (Pompermayer et al., 2001). No presente trabalho, resultados semelhantes foram observados com menor concentração do IP sintético.

Berenil causou efeitos letais e sub-letais a indivíduos de *T. arnobia* e afetou parâmetros populacionais desses insetos. A concentração de 0,12% do IP afetou diversos parâmetros biológicos do inseto, sem liquidar a população, mas reduzindo os parâmetros populacionais estimados. Essas características podem ser importantes a um composto com propriedades inseticidas, pois possivelmente afeta a população com reduzida pressão de seleção sobre a mesma. Sendo assim, neste estudo demonstrou-se que o inibidor sintético de tripsinas-*like* berenil destaca-se como uma alternativa para o controle de lagartas de *T. arnobia*, além de apresentar seu potencial como inseticida, o que o torna alvo de estudos com outras pragas.

## 5. Referências bibliográficas

- Broadway, R.M. 1995. Are insects resistant to plant proteinase inhibitors? *Insect Physiology* 41:107-116.
- Broadway, R.M. & Duffey, S.S. 1986. Plant proteinase inhibitors: Mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. *Journal of Insect Physiology*. 32(10): 827-833.
- Brodsgaard, H.F. 1994. Effect of photoperiod on the bionomics of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera, Thripidae). *Journal of Applied Entomology* 117: 498–507.
- Carey, J.R. 1982. Demography and population dynamics of the mediterranean fruit fly. *Ecological Modelling* 16: 125–150.
- Carlini, C.R. & Grossi-de-Sá, M.F. 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, 40:1515-1539.

- Gatehouse, A. M. R., Gatehouse, J. A. 1998. Identifying proteins with insecticidal activity: use of encoding genes to produce insect-resistant transgenic crops. *Pesticide Science* 52:165-175.
- Holtz, A.M., Oliveira, H.G., Pallini, A., Venzon, M., Zanuncio, J.C., Oliveira, C.L., Marinho, J.S., Rosado, M.C. 2003. Desempenho de *Thyrnteina arnobia* Stoll (Lepidoptera: Geometridae) em eucalipto e goiaba: o hospedeiro nativo não é um bom hospedeiro? *Neotropical Entomology* 32(3): 427-431.
- Koiwa, H., Shade, R.E., Zhu-Salzman, K., Subramanian, L., Murdock, L.L., Nielsen, S.S., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., 1998. Phage display can differentiate insecticidal activity of soybean cystatins. *Plant Journal*. 14, 371– 380.
- Lalitha, S.; Shade, R.E.; Murdock, L.L.; Bressan, R.A.; Hasegawa, P.M.; Nielsen, S.S. 2005. Effectiveness of recombinant soybean cysteine proteinase inhibitors against selected crop pests. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 140(C): 227–235.
- Lawrence, P.K., Koundal, K.R. 2002. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electronic Journal of Biotechnology* 5(1):93-109.
- Lemos, R.N.S. 1996. *Thyrnteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae). I. Consumo de área foliar e produção de excremento em *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus saligna*. II. Preferência alimentar e influência da idade foliar em seis espécies de *Eucalyptus* (Myrtaceae). 82 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Botucatu - SP.
- Maheswaran, G., Pridmore, L., Franz, P., Anderson, M.A. 2007 A proteinase inhibitor from *Nicotiana glauca* inhibits the normal development of light-brown apple moth, *Epiphyas postvittana* in transgenic apple plants. *Plant Cell Reports* 26:773–782.
- Marinho, J.S. 2006. Resposta bioquímica de lagartas de *Thyrnteina leucoceraea* (Lepidoptera: Geometridae) submetidas ao inibidor de serino-proteases benzamidina.

- 52p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- Marinho, J.S., Oliveira, M.G.A., Guedes, R.N.G., Pallini, A., Oliveira, C.L. 2008. Inibidores de proteases de hospedeiros nativos e exóticos e sua ação em intestinos de lagartas de *Thyriniteina leucoceraea*. Revista Árvore, 32(6): 1125-1132.
- Mendel, Z., Protasov, A., Fisher, N., Salle, J.L. 2004. Taxonomy and Biology of *Leptocybe invasa* gen. & sp. N. (Hymenoptera: Eulophidae), an invasive gall inducer on Eucalyptus. Australian Journal of Entomology 43:101-113.
- Mochizuki, A., Y. Nishizawa, H. Onodera, Y. Tabei, S. Toki, Y. Habu, M. Ugaki, Ohashi, Y. 1999. Transgenic rice plants expressing a trypsin inhibitor are resistant against rice stem borers, *Chilo suppressalis*. Entomologia Experimentalis et Applicata 93: 173–178.
- Moreira, L.F. 2007. Eficiência alimentar, atividade proteolítica e desenvolvimento pós-embrionário de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) exposta ao inibidor de serino-proteases, bis-benzamidina. 83p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- Oliveira, A.C., Fonseca, E.P., Anjos, N., Santos, G.P., Zanuncio, J.C. 1984. Resistência interespecífica de *Eucalyptus* spp. (Myrtaceae) à lagarta desfolhadora *Thyriniteina arnobia* Stoll, 1782 (Lepidoptera: Geometridae). Revista Árvore, 8(2): 93-103.
- Oliveira, M.G.A., Rogana, E., Rosa, J.C., Reinhold, B.B., Andrade, M.H., Greene, L.J., Mares-Guia, M. 1993. Tyrosine 151 is part of the substrate activation binding site. Journal of Biological Chemistry. 268:26893-26903.
- 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 gemmatalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 140(B):369-380.
- Ortego, F., Novillo, C., Sánchez-Serrano, J.J., Castañera, P. 2001. Physiological response of Colorado potato beetle and beet armyworm larvae to depletion of wound-inducible proteinase inhibitors in transgenic plants. *Journal of Insect Physiology* 47:1291-1300.
- Pedrosa-Macedo, J.H., Rosales, C.J., Sousa, J.L., Oliveira, E.P. 1998. Presencia de *Thyriniteina arnobia* (Stoll1782) (Lepidoptera:Geometridae) el “medidor pardo” en plantaciones de *Eucalyptus urophylla* (Myrtaceae) en San Carlos, Estado Cojedes, Venezuela. *Boletín de Entomología Venezolana*, Maracay, 13(1): 87-89.
- Pilon, A.M., Oliveira, M.G.A., Guedes, R.N.C. 2006. Protein digestibility, protease activity and post-embryonic development of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*) exposed to the trypsin-inhibitor benzamidine. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 86:23-29.
- Pompermayer, P., Lopes, A.R., Terra, W.R., Parra, J.R.P., Falco, M.C., Silva-Filho, M.C. 2001. Effects of soybean proteinase inhibitor on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 99: 79-85.
- Pompermayer, P.; Falco, M. C.; Parra, J. R. P.; Silva, M. C. 2003: Coupling diet quality and Bowman-Birk and Kunitz-type soybean proteinase inhibitor effectiveness to *Diatraea saccharalis* development and mortality. *Entomol. Exp. Appl.* 109, 217–224.
- Raubenheimer, D., 1992. Tannic acid, protein, and digestible carbohydrate: dietary imbalance and nutritional compensation in locusts. *Ecology* 73(3): 1012–1027.

- Shulke, R.H., Murdock, L.L. 1983. Lypoxigenase, trypsin inhibitor, and lectin from soybeans: effects on larval growth of *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae). *Environmental Entomology* 12:787-791.
- Slansky, F.Jr., Scriber, J.M. 1985. Food consumption and utilization. In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (eds), *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology* 4. Pergamon Press Ltd., New York, pp. 87–164.
- Srinivasan, A., Giri, A.P., Gupta, V.S. 2006. Structural and functional diversities in Lepidopteran serine proteases. *Cellular & Molecular Biology Letters* 11(1):132-154.
- Stephuhn, A., Baldwin, I.T. 2007. Resistance management in a native plant: nicotine prevents herbivores from compensating for plant protease inhibitors. *Ecology Letters* 10:499-511.
- Takahashi, T., Kokubo, R., Sakaino, M. 2004. Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata*. *Letters in Applied Microbiology* 39:60-64.
- Telang, M.A., Srinivasan, A., Patankar, A.G., Harsulkar, A.M., Joshi, V.V. Damle, A., Deshpande, V.V., Sainani, M.N., Ranjekar, P.K., Gupta, G.P., Birah, A., Rani, S., Kachole, M., Giri, A P., Gupta, V.S., 2003. Bitter gourd proteinase inhibitors: potential growth inhibitors of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. *Phytochemistry* 63: 643-652.
- Vila, L., Quilis, J., Meynard, D., Breitler, J.C., Marfà, V., Murillo, I., Vassal, J.M., Messeguer, J., Guiderdoni, E., Segundo, B.S. 2005. Expression of the maize proteinase inhibitor (mpi) gene in rice plants enhances resistance against the striped stem borer (*Chilo suppressalis*): effects on larval growth and insect gut proteinases. *Plant Biotechnology Journal* 3:187–202.

- Wilcken, C.F. 1996. Biologia de *Thyriniteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae) em espécies de *Eucalyptus* e em dieta artificial. 129p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.
- Zanuncio, J.C., Guedes, R.N.C., Zanuncio, T.V., Fabres, A.S. 2001. Species richness and abundance of defoliating Lepidoptera associated with *Eucalyptus grandis* in Brazil and their response to plant age. *Austral Ecology* 26: 582–589.
- Zanuncio, J.C., Santana, D.L., Nascimento, E.C., Santos, G.P., Alves, J.B., Sartório, R.C., Zanuncio, T.V. 1993. Lepidoptera desfolhadores de eucalipto: biologia, ecologia, e controle. Ed. Folha de Viçosa Ltda. 140 p.

## CAPÍTULO 2

### **Alteração comportamental em *Thyrinteina arnobia* induzida por berenil**



## Resumo

Durante sua evolução, pragas têm desenvolvido diversas estratégias para superar os efeitos deletérios dos inibidores de proteases (IPs). Uma delas seria através do aumento do consumo foliar pelos insetos, o que seria prejudicial à planta. Portanto, é fundamental que, ao investigar o potencial inseticida de um composto sobre herbívoros, sejam estudados também os efeitos do mesmo sobre o comportamento do inseto. Sendo assim, este trabalho foi realizado visando estudar o comportamento de *Thyrintea arnobia*, lagarta desfolhadora de eucalipto, quando exposta com e sem chance de escolha a folhas contendo o IP sintético berenil, do tipo bis-benzamidina, nas concentrações de 0,00; 0,03; 0,06; 0,09 e 0,12% (p/v). Todas as concentrações de berenil foram repelentes e deterrentes a *T. arnobia* e a ingestão deste IP não causou alimentação compensatória pelas lagartas; pelo contrário, o IP causou redução no consumo das lagartas nos testes com e sem chance de escolha. A identificação de compostos que, além de serem tóxicos, não causam o consumo compensatório em insetos pode ser de grande interesse no desenvolvimento de novos pesticidas. Deste modo, o berenil se apresenta como uma boa alternativa para estudos que visam o desenvolvimento de novas tecnologias no combate a insetos.

**Palavras-chave:** Lepidoptera, Geometridae, tripsina, comportamento, consumo foliar.

## **Abstract**

During evolution, insect pests have developed strategies to overcome deleterious effects of protease inhibitors (PIs). One of these would be increasing leaf consumption, which would be harmful to the plant. Therefore, it is essential that, when investigating the insecticide potential of a compound on herbivores, also be studied its effects on insect behavior. Thus, this work studied the behavior of *Thyrintea arnobia*, eucalypt defoliator caterpillars, exposed to leaves containing synthetic IP berenil at concentrations of 0.00, 0.03, 0.06, 0.09 and 0.12% (w/v). All concentrations of berenil were repellents and deterrents to *T. arnobia* and this PI didn't cause compensatory feeding by caterpillars; just the opposite, PI caused reduction in consumption of larvae in choice and no-choice tests. The identification of compounds that, besides toxic, do not cause compensatory consumption in insects, can be interesting in the development of new pesticides. Thus, berenil is seen as a good alternative for aiming the development of new technologies for insect control.

**Keywords:** Lepidoptera, Geometridae, trypsin, behavior, leaf consumption.

## 1. Introdução

As plantas podem desenvolver sofisticados mecanismos de defesa. Os tecidos podem acumular, constitutivamente ou após indução, muitos compostos de defesa que conferem resistência contra os fitófagos e infecções por viroses, bactéria, fungos, nematóides, etc. (Carlini & Grossi-de-Sá, 2002). As proteínas de plantas supostamente envolvidas em mecanismos de defesa mais conhecidas são as lectinas, as proteínas inativadoras de ribossomos dos tipos I e II, as glicohidrolases e os inibidores de enzimas proteolíticas (inibidores de proteases e de amilases) (Carlini & Grossi-de-Sá, 2002; Oliveira *et al.*, 2005). Os inibidores de proteases (IPs) têm função de proteger plantas contra danos causados por vários tipos de estresses bióticos (Silva *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2002, 2004; Fortunato *et al.*, 2004, 2007) e abióticos (Oliveira *et al.*, 2002; Batista *et al.*, 2002 a,b; Ferreira *et al.*, 2005; Lanna *et al.*, 2005). Entretanto esses compostos são especialmente conhecidos no processo de defesa das plantas contra o ataque de insetos por sua ação sobre as proteases digestivas dos mesmos (Gatehouse & Gatehouse, 1998; Oliveira *et al.*, 2005).

Durante sua evolução, as pragas têm estado em contato com uma variedade de inibidores de proteases produzidos naturalmente por seus hospedeiros e, conseqüentemente, têm desenvolvido estratégias para superar esse efeito inibitório (Pilon *et al.*, 2006; Bayés *et al.*, 2006). A degradação de inibidores por proteases não-alvo e o desenvolvimento de um complexo sistema proteolítico, através do qual os efeitos do inibidor são superados devido à liberação de proteases resistentes, são alguns exemplos de adaptação de pragas a inibidores de proteases de seus hospedeiros (Carlini & Grossi-de-Sá, 2002).

Esses mecanismos de adaptação ainda não estão completamente esclarecidos. Em lagartas de *Helicoverpa zea* foi verificado o surgimento da atividade de uma tripsina

induzida pela ingestão de SKTI (inibidor de tripsina), que foi produzida provavelmente como forma de suplantar o efeito inibidor desse composto (Volpicella *et al.*, 2006). Outro meio para conter o efeito dos inibidores de proteases pode ser o aumento do consumo foliar pelos insetos (Jongsma & Bolter, 1997). Desta forma, para completar seu desenvolvimento, os herbívoros se alimentariam de mais folhas, o que seria muito prejudicial à planta (Steppuhn & Baldwin, 2007).

Os efeitos de IPs sobre o desenvolvimento, a sobrevivência e a fecundidade dos insetos têm sido demonstrados em diversos estudos (Lawrence & Koundal, 2002). Entretanto, um número limitado de trabalhos tem reportado os efeitos dos IPs sobre o comportamento de insetos, e um número ainda menor o faz utilizando dieta natural. Já foi demonstrado que respostas induzidas por jasmonatos em plantas, as quais incluem o acúmulo de IPs, são associadas a mudanças na preferência alimentar de insetos. Entretanto, essa resposta não seria diretamente associada à presença específica do IP (Thaler *et al.*, 2001; van Dam *et al.*, 2000).

O eucalipto possui altas concentrações de compostos secundários em seus tecidos que poderiam servir de defesa contra o ataque de herbívoros, porém insetos pertencentes às ordens Lepidoptera, Coleoptera e Isoptera, tornaram-se sérias pragas à cultura do eucalipto no Brasil (Bragança *et al.*, 1998). Só da ordem Lepidoptera já foram encontradas mais de 280 espécies alimentando-se das folhas de eucalipto (Santos *et al.*, 1986), algumas das quais se tornaram pragas desta cultura. Dentre os lepidópteros pragas, estão as lagartas de *Thyriniteina arnobia*, que são severas desfolhadoras das plantas de eucalipto (Anjos *et al.*, 1986; Holtz *et al.*, 2003).

Os danos causados por *T. arnobia* em plantações de eucalipto podem até mesmo levar a uma paralisação do crescimento da planta, no caso de ataques sucessivos (Pedrosa-Macedo *et al.*, 1998), uma vez que as lagartas são ávidas comedoras das

folhas. O ataque se inicia da base para o ápice da copa das árvores e das margens para o interior dos talhões. Nos quatro primeiros estágios, uma lagarta consome em média 12,09 cm<sup>2</sup> de área foliar, enquanto que nos dois últimos, este consumo se eleva para 108,49 cm<sup>2</sup> (Zanuncio *et al.*, 1993). Portanto, é fundamental que, ao investigar o potencial inseticida de um composto sobre herbívoros, como essas lagartas desfolhadoras, sejam pesquisados seus efeitos sobre o comportamento do inseto, pois uma compensação alimentar poderia causar grandes perdas às plantas.

Sendo assim, este trabalho foi realizado visando estudar o comportamento de indivíduos de *T. arnobia* quando expostos, com e sem chance de escolha, a diferentes concentrações do IP sintético de tripsinas-*like* do tipo bis-benzamidina, berenil, em folhas de eucalipto.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Insetos e materiais**

A partir de posturas de quatro fêmeas de *T. arnobia* da criação mantida na Universidade Estadual Paulista (UNESP, campus de Botucatu, São Paulo), foi estabelecida uma criação no Instituto Agrônômico (IAC), onde as lagartas foram criadas sobre mudas de eucalipto, acondicionadas em gaiolas (1,0x1,0x1,0m) de estrutura e fundo em madeira e laterais e topo forrados com tecido organza. Na gaiola havia abertura frontal com fecho de velcro para possibilitar as trocas das mudas quando necessárias e para regar as plantas.

Para a realização do experimento foi selecionada a espécie *Eucalyptus grandis* devido ao seu interesse econômico, principalmente para a produção de papel e celulose, carvão vegetal e óleos essenciais. Além disso, as lagartas de *T. arnobia* têm preferência por *E. grandis* em comparação a outras espécies (Oliveira *et al.*, 1984; Lemos, 1996).

As mudas de eucalipto foram adquiridas em um viveiro da região, livres de qualquer aplicação foliar, transplantadas para vasos (volume = 1,7 m<sup>3</sup>) e, quando utilizadas, apresentavam aproximadamente 50cm de altura. Para os testes de preferência com chance de escolha, as mudas não foram transplantadas, sendo utilizadas ainda em tubetes, com aproximadamente 40cm de altura.

O IP berenil (aceturato de diminazeno) foi comprado da Sigma-Aldrich Química Brasil (São Paulo, Brasil). O espalhante adesivo Gotafix (C<sub>35</sub>H<sub>64</sub>N<sub>11</sub>) foi obtido do fabricante Milenia Agro Ciências S.A. e sua adição teve por finalidade obter maior aderência do IP à folha.

## 2.2. Teste de preferência de lagartas de *T. arnobia* com chance de escolha

Foram utilizadas lagartas de 4º. e 5º. ínstars da criação estoque de *T. arnobia*, uma vez que nestes ínstars a lagarta apresenta maior consumo (Zanuncio *et al.*, 1993). As lagartas foram privadas de alimentação por 12 horas antes do início do experimento, que foi realizado em condições controladas de temperatura (25 ± 1°C), umidade relativa (75 ± 10%) e fotoperíodo (LD 12:12).

As lagartas foram liberadas no centro de uma arena contendo cinco mudas de eucalipto equidistantes entre si, sendo cada uma delas de um tratamento diferente. A arena constituiu de uma cuba redonda de vidro (diâmetro = 26cm e altura = 9,5cm) coberta com um pedaço de isopor com furos equidistantes, onde foram encaixados os tubetes com as mudas de eucalipto. Após encaixadas as mudas de eucalipto, outra base de isopor coberta por papel filtro foi usada próxima às folhas, para facilitar a escolha das lagartas e evitar que folhas de mudas de tratamentos diferentes tivessem contato (Figura 1). As mudas foram pulverizadas, utilizando-se um pulverizador plástico de pressão manual, até o ponto de escoamento (aproximadamente 30 mL de solução por muda), cada uma com a solução de seu respectivo tratamento, deixadas secar à sombra

por aproximadamente 30 minutos e depois encaixadas na arena. Antes do teste de preferência, onde as lagartas ficaram por 24 horas nas plantas, as folhas sem injúria de cada planta foram contadas para se comparar com a quantidade após as 24 horas.

Os tratamentos aplicados foram: solução controle de Gotafix a 0,06% (v/v) e solução de Gotafix a 0,06% (v/v) acrescentada de berenil nas concentrações de 0,03%, 0,06%, 0,09% e 0,12% (p/v), todas em água destilada. As concentrações de berenil foram selecionadas a partir dos testes biológicos descritos no primeiro capítulo deste trabalho. Aquelas concentrações que não permitiram a formação de adultos foram descartadas dos testes comportamentais e concentrações intermediárias às demais foram acrescentadas. Cada lagarta liberada no centro da arena correspondeu a uma repetição, em um total de 36 repetições, liberadas em três grupos para facilitar a condução do experimento.

As lagartas foram liberadas no centro da arena e observações foram realizadas 5, 15, 30 e 60 minutos depois. A cada observação, a lagarta que estava sobre alguma planta tinha sua escolha registrada e era retirada da arena. Após registradas as escolhas de todas as lagartas e tendo sido todas retiradas das mudas, as mesmas foram devolvidas ao centro da arena para observar a escolha após a primeira prova, deixando-as na arena por 24 horas. Depois de 24 horas, as lagartas de cada tratamento foram contadas, bem como as folhas sem injúria.



**Figura 1.** Arena utilizada para o teste de livre escolha com lagartas: **(A)** Vista lateral e **(B)** Vista superior.

### 2.3. Área foliar consumida por lagartas de *T. arnobia* sem chance de escolha

Foram utilizadas lagartas de 5<sup>o</sup>. ínstar da criação estoque de *T. arnobia*, período em que se alimentam mais vorazmente. As lagartas foram privadas de alimentação por cinco horas antes do início do experimento, que foi realizado em condições controladas de temperatura ( $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), umidade relativa ( $75 \pm 10\%$ ) e fotoperíodo (LD 13:11). Cada lagarta foi considerada como uma repetição, sendo realizadas dez repetições para cada tratamento.

Para cada lagarta foi oferecida uma folha de eucalipto. Antes, as folhas foram devidamente identificadas, passaram pelo medidor de área foliar LI-COR (LI-3100A) e receberam o respectivo tratamento. Para tal, a folha de eucalipto foi imersa por três vezes em um frasco de Becker contendo a solução correspondente ao tratamento e



colocada sobre papel toalha, à sombra, por aproximadamente cinco segundos, de forma que apenas a borda da folha tivesse contato com o papel, para retirar o excesso da solução. Os tratamentos foram cinco no total: solução controle de Gotafix a 0,06% (v/v) e solução de Gotafix a 0,06% (v/v) acrescentada de berenil nas concentrações de 0,03%, 0,06%, 0,09% e 0,12% (p/v), todos em água destilada. As concentrações de berenil foram as mesmas utilizadas no teste anteriormente descrito, com livre escolha.

As lagartas foram pesadas antes dos testes para verificar a covariável peso sobre o consumo foliar. Após a pesagem, cada lagarta foi individualmente acondicionada em uma placa de Petri (diâmetro = 14 cm), onde recebeu uma folha de eucalipto, conforme o seu tratamento. Cada folha de eucalipto teve seu pecíolo envolto em algodão embebido em água e coberto por papel alumínio para manter a umidade. Vinte e quatro horas depois, as folhas foram retiradas e passaram novamente pelo medidor de área foliar. A partir das diferenças entre as medições das folhas anteriores e posteriores ao experimento, obteve-se o consumo foliar em  $\text{cm}^2$  de cada lagarta.

#### 2.4. Teste de preferência de pouso e oviposição de fêmeas de *T. arnobia* com chance de escolha

Para o teste, adultos de *T. arnobia* obtidos da criação controle, recém-emergidos, foram primeiramente identificados quanto ao sexo. As fêmeas com asas de coloração branca apresentando pontuações negras esparsas e com antenas filiformes, e os machos com menor tamanho em relação às fêmeas, asas de coloração castanha variável e antenas bipectinadas (Zanuncio *et al.*, 1993). Cada fêmea recém-emergida foi colocada com um macho em uma pequena gaiola cilíndrica de cartolina (diâmetro = 8,5 cm, altura = 19 cm), cujas extremidades foram fechadas por placas de Petri plásticas (diâmetro = 9 cm) e as laterais forradas com papel filtro. O casal foi deixado nessa pequena gaiola por 24 horas para que houvesse a cópula (Batista-Pereira *et al.*, 2004).

Após a cópula, as fêmeas foram liberadas em uma arena montada em outra gaiola (1,0 x 1,0 x 1,0m) de estrutura e fundo em madeira, laterais e topo forrados com tecido organza e abertura frontal com fecho de velcro.

Foram aplicados os mesmos cinco tratamentos utilizados nos demais testes comportamentais: solução controle de Gotafix a 0,06% (v/v) e solução de Gotafix a 0,06% (v/v) acrescentada de berenil nas concentrações de 0,03%, 0,06%, 0,09% e 0,12% (p/v), todas em água destilada. Mudanças de eucalipto de aproximadamente 80 cm de altura foram pulverizadas até o ponto de escorrimento (aproximadamente 100 mL por muda) de maneira uniforme, utilizando-se um borrifador plástico de pressão manual. Cada muda recebeu a solução de seu respectivo tratamento até o ponto de escorrimento (aproximadamente 100 mL), foi deixada secar por aproximadamente uma hora à sombra e todas foram colocadas dentro da gaiola de forma equidistante, compondo uma arena.

As fêmeas foram liberadas no centro da arena formada pelas mudas tratadas com as diferentes concentrações de berenil (uma muda para cada tratamento). As escolhas das fêmeas foram observadas diariamente em relação ao pouso e à oviposição. Foram liberadas cinco fêmeas, sendo cada uma correspondente a uma repetição.

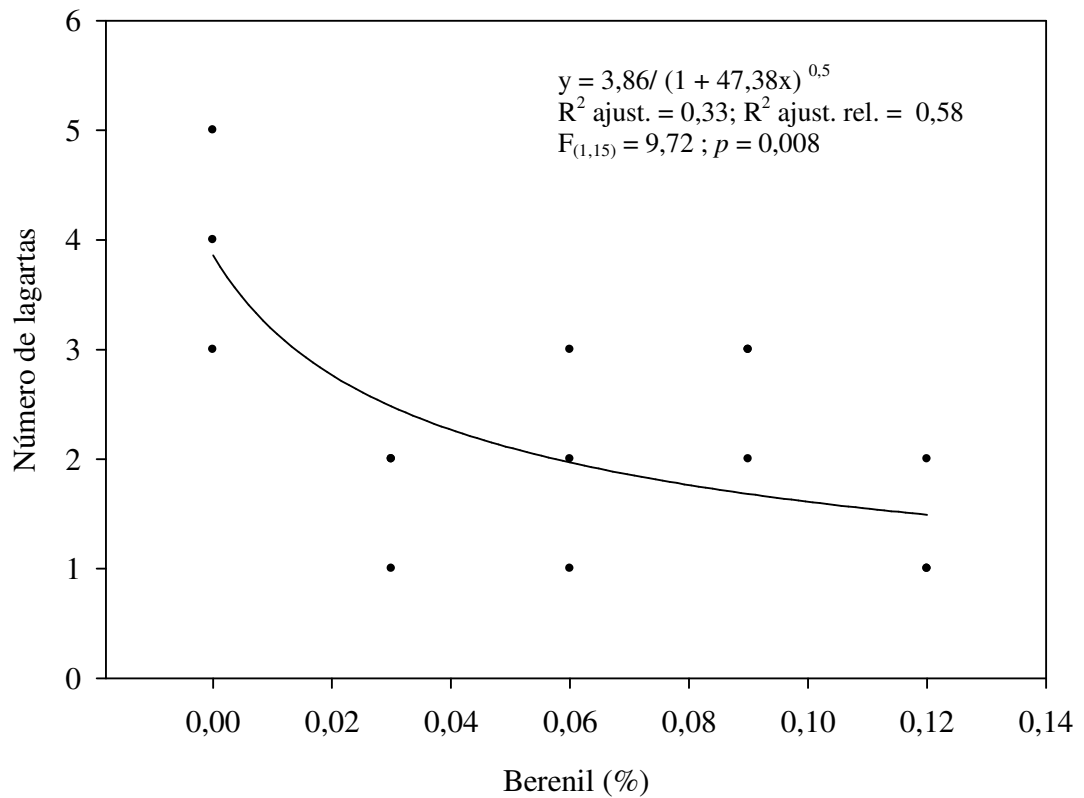
## 2.5. Análise estatística

Os modelos de regressão foram testados desde os mais simples (linear e quadrático) para os modelos alternativos de maior complexidade (modelos não-lineares de pico). Cada escolha do modelo foi efetuada com base no coeficiente de determinação ajustado ( $R^2$  ajust.), no coeficiente de determinação ajustado relativo ( $R^2$  ajust. rel.), simplicidade e alto valor de F (e quadrado de média). O  $R^2$  ajustado relativo foi calculado dividindo-se o  $R^2$  ajustado do modelo selecionado pelo  $R^2$  ajustado máximo possível dentre as alternativas de modelos, para obter uma indicação da qualidade do

ajuste do modelo selecionado em relação às demais opções. As figuras dos gráficos foram feitas com o auxílio do programa SigmaPlot (2006).

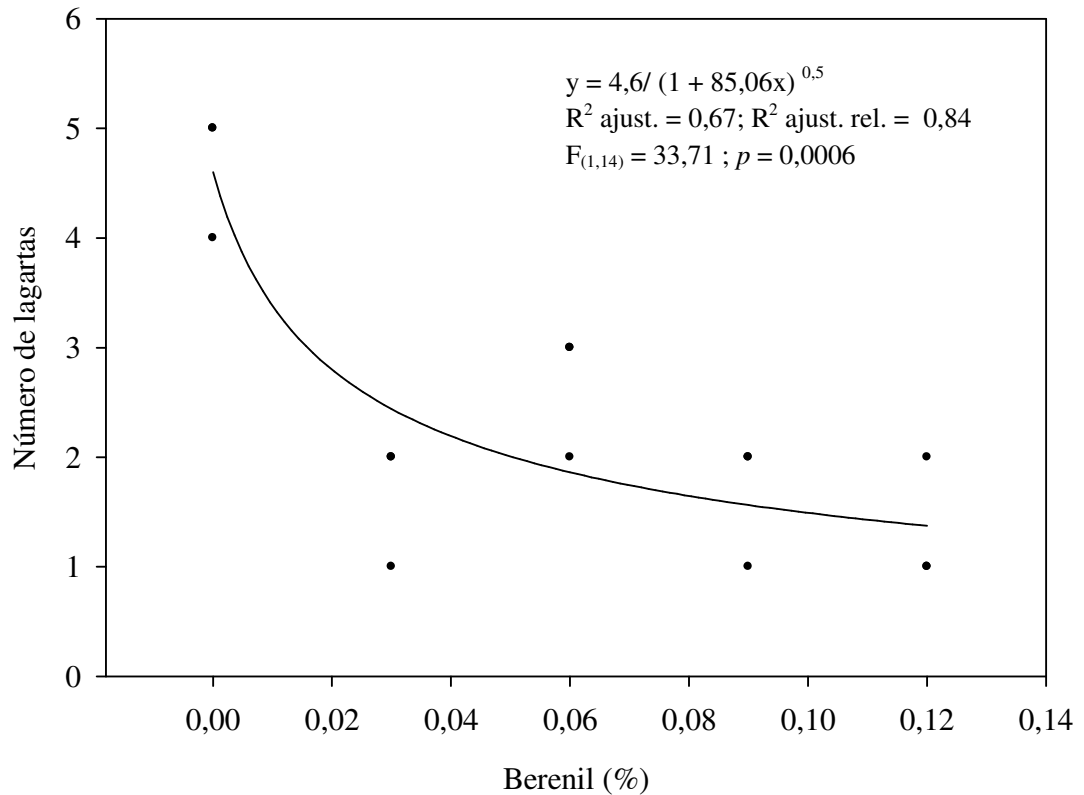
### 3. Resultados

No teste de livre escolha, as lagartas de *T. arnobia* fizeram suas opções na primeira hora do experimento e preferiram as plantas sem o IP. A preferência das lagartas decresceu conforme aumentou-se a concentração de berenil nas soluções pulverizadas sobre as plantas de eucalipto (Figura 2).



**Figura 2.** Primeira opção de lagartas de *T. arnobia* submetidas ao teste com livre escolha. Cada ponto representa o número de escolhas em um grupo de 12 lagartas.

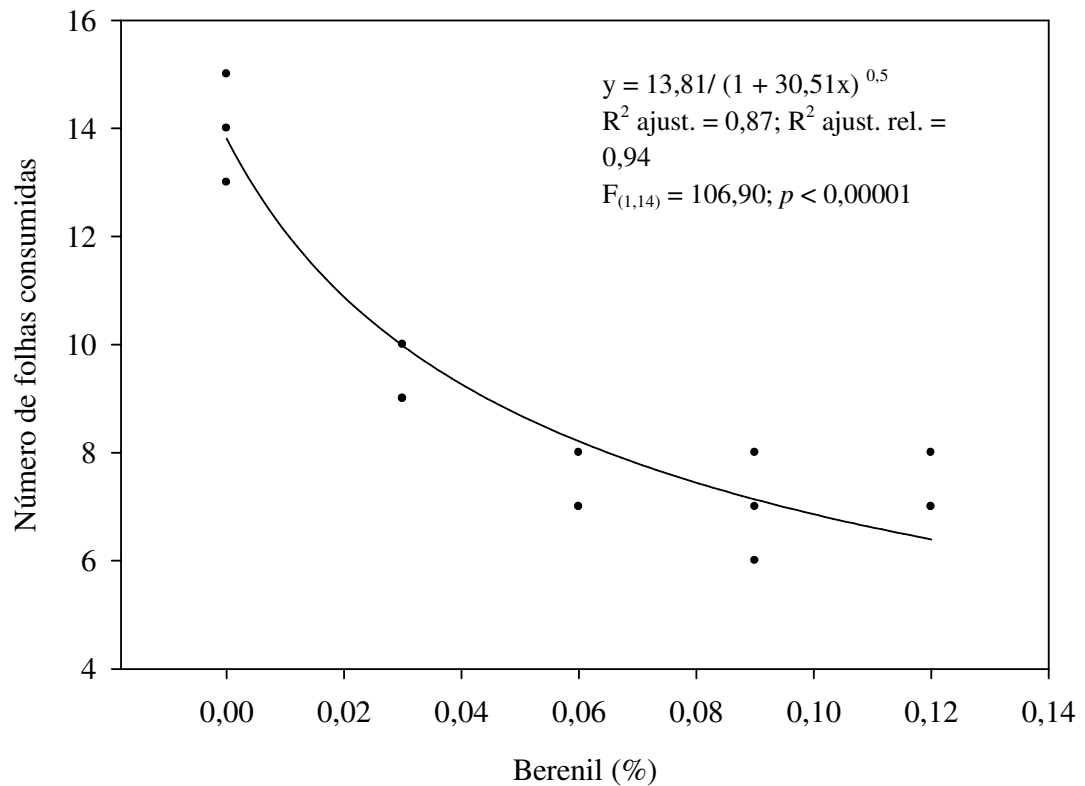
Quando deixadas 24 horas na arena, as lagartas apresentaram novamente preferência pela planta sem a adição do berenil (Figura 3). Quanto maior a concentração de berenil na planta, menor foi a preferência das lagartas.



**Figura 3.** Opção de lagartas de *T. arnobia* submetidas ao teste com livre escolha, 24 horas após o primeiro contato. Cada ponto representa o número de escolhas em um grupo de 12 lagartas.

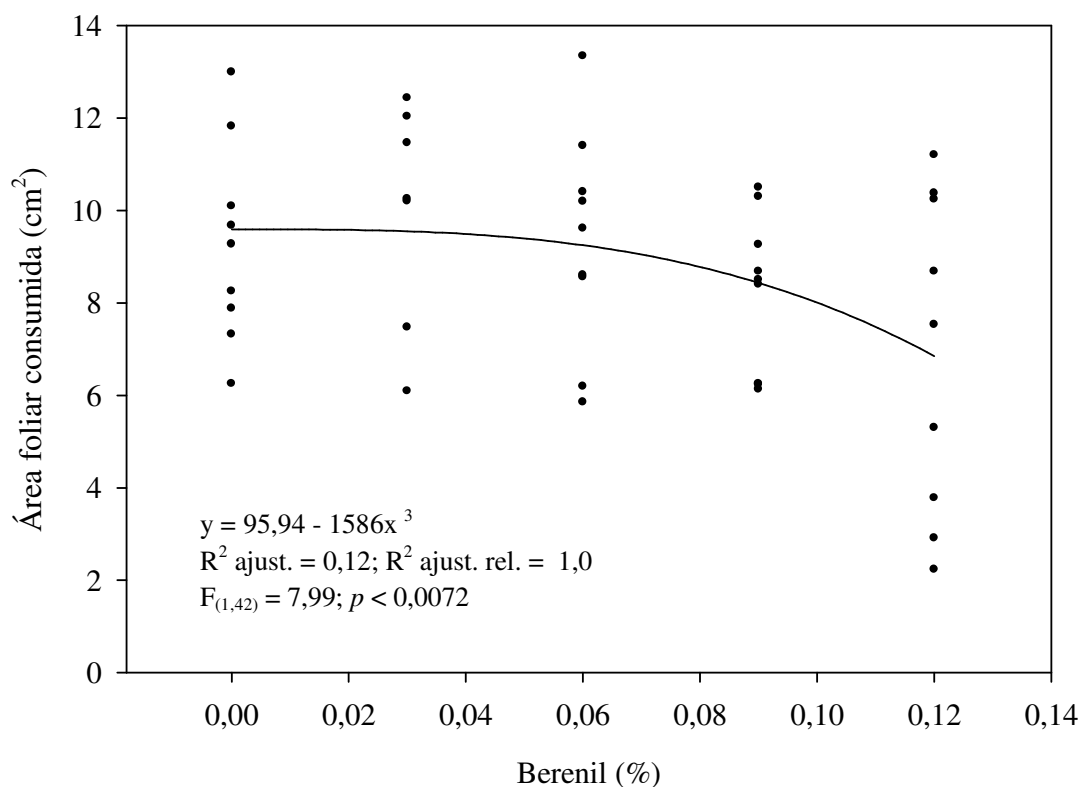
Vinte e quatro horas após o primeiro contato com plantas dos diferentes tratamentos, as lagartas de *T. arnobia* consumiram mais folhas da planta sem a aplicação do IP berenil (42 folhas no total) em relação ao consumo de folhas dos demais

tratamentos (Figura 4). O consumo de folhas decresceu conforme aumentou a concentração de berenil.



**Figura 4.** Folhas consumidas por lagartas de *T. arnobia* submetidas ao teste com livre escolha de plantas com diferentes concentrações de berenil e controle (sem o IP), 24 horas após o primeiro contato. Cada ponto representa o número de folhas consumidas por 12 lagartas.

No teste sem chance de escolha, as lagartas de *T. arnobia* apresentaram menor consumo das folhas dos tratamentos com as maiores concentrações de berenil (Figura 5).



**Figura 5.** Influência de diferentes concentrações de berenil sobre a área foliar de eucalipto consumida por lagartas de *T. arnobia*, quando submetidas ao teste sem livre escolha. Cada ponto representa o consumo de uma lagarta.

Em relação a pouso e oviposição, não houve preferência por nenhum dos tratamentos. As mariposas pousaram e ovipositaram apenas na estrutura da gaiola ou nas laterais de tecido.

#### 4. Discussão

As lagartas desfolhadoras *T. arnobia* são pragas severas de plantas de eucalipto. O inibidor sintético de tripsinas berenil possui bom potencial inseticida sobre essas

lagartas; entretanto, muitos estudos têm demonstrado que os IPs podem desencadear um aumento no consumo dos insetos em resposta a esses compostos, o que poderia ser muito prejudicial à planta de eucalipto, caso acontecesse às lagartas de *T. arnobia*. Além disso, é importante que se estude qual a forma de proteção que berenil poderia conferir à planta em relação ao comportamento do inseto.

A não-preferência é um tipo de resistência e ocorre quando uma planta é menos utilizada pelo inseto para alimentação, oviposição ou abrigo em relação a outra (Smith & Mittler, 1965; Gallo *et al.*, 2002). Em relação à localização da planta, um ou mais compostos podem agir como repelentes, orientando o inseto em direção contrária à mesma; em relação à manutenção da alimentação ou oviposição, a ação pode ser deterrente, impedindo que o inseto continue a se alimentar ou ovipositar (Smith & Mittler, 1965; Smith, 1989; Gallo *et al.*, 2002; Schoonhoven & van Loon, 2002). Nossos estudos revelaram que berenil, quando pulverizado sobre as plantas, pode causar alterações comportamentais em *T. arnobia* semelhantes aos observados em insetos em relação a tais de plantas resistentes.

Outchkourov *et al.* (2004) observaram que, quando oferecida a chance, indivíduos de *Frankliniella occidentalis* escolhiam plantas com baixos níveis de determinados inibidores de cisteíno-proteases, concluindo que os IPs testados são altamente repelentes a esses insetos quando expressos em plantas transgênicas de batata. De semelhante forma, o IP berenil mostrou ação repelente a *T. arnobia*. Quando oferecida a chance de escolha, as lagartas preferiram as plantas contendo menores concentrações de berenil ou sem o IP. Berenil também se mostrou deterrente a lagartas de *T. arnobia*. Em teste com chance de escolha, as lagartas consumiram mais folhas da planta de eucalipto sem o IP, evitando as plantas que possuíam berenil.

Adultos de *T. arnobia* não exibiram preferência por nenhuma das plantas, a despeito do hábito alimentar das lagartas e da ação repelente e deterrente do berenil sobre as mesmas. De forma semelhante, adultos de *Helicoverpa armigera* não conseguiram diferenciar entre plantas tóxicas e não tóxicas à prole ao ovipositarem (Cotter & Edwards, 2006). Entretanto, a falta de correlação entre preferência de oviposição e desenvolvimento da prole não é comum em outras espécies de Lepidoptera (Cotter & Edwards, 2006). Em campo, as posturas de *T. arnobia* podem ser encontradas em folhas e galhos de eucalipto (Zanuncio *et al.*, 2003), quando em criação massal, entretanto, as mariposas ovipositam em folhas de papel filtro e na estrutura das gaiolas. Portanto, o fato de essas mariposas serem originadas de criação massal pode ter influenciado a escolha desses insetos quanto à oviposição.

Quando sem chance de escolha, os insetos podem apresentar diferentes comportamentos, segundo a literatura. Lalitha *et al.* (2005) observaram que inibidores de cisteíno-proteases de soja em plantas de batata reduziram o consumo foliar por *Leptinotarsa decemlineata* (besouro-da-batata). Por outro lado, muitos estudos têm documentado o aumento do consumo por herbívoros em resposta a IPs presentes em diferentes plantas (Winterer & Bergelson 2001; Abdeen *et al.*, 2005). Por exemplo, lagartas de *Anticarsia gemmatalis* apresentaram um pico no consumo quando alimentadas com o IP sintético benzamidina em dieta artificial (Pilon *et al.*, 2006).

Como são antidigestivos e reduzem a atividade de proteases do intestino, os IPs podem também provocar a alimentação compensatória (Steppuhn & Baldwin, 2007). O mecanismo que regula o consumo compensatório de insetos ainda é desconhecido, mas pode estar relacionado a mudanças na expressão de proteases (Abdeen *et al.*, 2005) e à composição da dieta (Steppuhn & Baldwin, 2007). Lagartas de *T. anobia* não apresentaram alimentação compensatória quando ingeriram folhas de eucalipto



contendo berenil, mas tiveram o consumo reduzido conforme se elevou a concentração do IP na planta, confirmando o efeito deterrente de berenil sobre as lagartas.

Steppuhn & Baldwin (2007) demonstraram que nicotina impede que lagartas de *Spodoptera exigua* aumentem seu consumo foliar como compensação à ingestão de IPs. O eucalipto possui altas concentrações de compostos secundários em seus tecidos Bragança *et al.*, 1998). Assim, é possível que um ou mais desses compostos haja de forma a impedir a alimentação compensatória de *T. arnobia*.

Nossos dados mostraram que lagartas de *T. arnobia* escolhem se alimentar de plantas de eucalipto sem o berenil, mas não apresentam consumo compensatório quando se alimentam de folhas com o IP. A identificação de compostos que, além de serem tóxicos e antimetabólicos, não causam o consumo compensatório em insetos pode ser de grande interesse no desenvolvimento de novos pesticidas. Desse modo, o berenil se apresenta como uma boa alternativa para estudos que visam o desenvolvimento de novas tecnologias no combate a insetos.

## **5. Referências bibliográficas**

Abdeen, A., Virgos, A., Olivella, E., Villanueva, J., Aviles, X., Gabarra, R., Prat, S.

2005. Multiple insect resistance in transgenic tomato plants over-expressing two families of plant proteinase inhibitors. *Plant Molecular Biology* 57(2): 189–202.

Anjos, N., Santos, G.P., Zanuncio, J.C. 1986 Pragas do eucalipto e seu controle.

Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 12:50-58.

Batista, R.B., Oliveira, M.G.A., Pires, C.V., Gomes, M.R.A., José, I.C., Piovesan, N.D.,

Rezende, S.T., Moreira, M.A. 2002a. Efeito da aplicação foliar de ácidos graxos na via das lipoxigenases de plantas de soja. *Química Nova*, 25(6A): 914-920.

- Batista, R.B., Oliveira, M.G.A., Pires, C.V., Piovesan, N.D., Rezende, S.T., Moreira, M.A. 2002b. Caracterização bioquímica e cinética de lipoxigenases de plantas de soja submetidas à aplicação de ácidos graxos poliinsaturados. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 37(11): 1517-1524.
- Batista-Pereira, L.G., Wilcken, C.F., Neto, S.D.P., Marques, E.N. 2004. Comportamento de chamamento de *Thyriniteina arnobia* (Stoll) (Lepidoptera: Geometridae) em *Psidium guajava*, *Eucalyptus grandis* e em dieta artificial. *Neotropical Entomology*, 33(1):021-028.
- Bayés, A., Vega, M.R., Vendrell, J., Aviles, F.X., Jongmsa, M.A., Beekwilder, J. 2006. Response of the digestive system of *Helicoverpa zea* to ingestion of potato carboxypeptidase inhibitor and characterization of an uninhibited carboxypeptidase B. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 36:654-664.
- Bragança, M.A.L., Zanuncio, J.C., Picanço, M., Laranjeiro, A.J. 1998. Effects of environmental heterogeneity on Lepidoptera and Hymenoptera populations in *Eucalyptus* plantations in Brazil. *Forest Ecological Management* 103:287-292.
- Carlini, C.R., Grossi-de-Sá, M.F. 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 40:1515-1539.
- Cotter, S.C., Edwards, O.R. 2006. Quantitative genetics of preference and performance on chickpeas in the noctuid moth, *Helicoverpa armigera*. *Heredity* 96: 396-402.
- Ferreira, C.C.A., Oliveira, M.G.A., Brumano, M.H.N., Guedes, R.N.C., Almeida, F.T., Silva, C.H.O., Moreira, M.A., 2005. Lack of seed lipoxigenases does not affect soybean defense against removal of reproductive tissue. *Bioscience Journal* 21(1): 49-55.

- Fortunato, F.S., Oliveira, M.G.A., Brumano, M.H.N., Silva, C.H.O., Guedes, R.N.C.,  
Moreira, M.A.M., 2007. Lipoxygenase-induced defense of soybean varieties to the  
attack of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis* Hübner). *Journal of Pest  
Science* 80(4), 241-247.
- Fortunato, F.S., Oliveira, M.G.A., Brumano, M.H.N., Zanuncio, J.C., Oliveira, J.A.,  
Almeida, F.T., Pilon, A.M., Sedyama, C.S., Moreira, M.A., 2004. Effect of the  
*Anticarsia gemmatalis* injury on the lipoxygenases activity from soybean leaves.  
*Bioscience Journal* 20(2): 37-46.
- Gallo, D., Nakano, O., Neto, S.S., Carvalho, R.P.L., Baptista, G.C., Berti-Filho, E.,  
Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., Alves, S.B., Vendramim, J.D., Marchini, L.C., Lopes,  
J.R.S., Omoto, C. 2002. *Entomologia Agrícola*. Ed. FEALQ, Piracicaba, SP. 920 p.
- Gatehouse, A. M. R., Gatehouse, J. A. 1998. Identifying proteins with insecticidal  
activity: use of encoding genes to produce insect-resistant transgenic crops. *Pesticide  
Science* 52:165-175.
- Holtz, A.M., Oliveira, H.G., Pallini, A., Marinho, J.S., Zanuncio, J.C., Oliveira, C.L.  
2003. Adaptação de *Thyrinteina arnobia* em novo hospedeiro e defesa induzida por  
herbívoros em eucalipto. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 38: 453-458.
- Jongsma, M.A., Bolter, C. 1997. The adaptation os insects to plant protease inhibitors.  
*Journal of Insect Physiology* 43(10): 885-895.
- Lalitha, S.; Shade, R.E.; Murdock, L.L.; Bressan, R.A.; Hasegawa, P.M.; Nielsen, S.S.  
2005. Effectiveness of recombinant soybean cysteine proteinase inhibitors against  
selected crop pests. *Comparative Biochemistry and Physiology* 140(C): 227–235.

- Lawrence, P.K., Koundal, K.R. 2002. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electronic Journal of Biotechnology* 5(1):93-109.
- Lemos, R.N.S. 1996. *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae). I. Consumo de área foliar e produção de excremento em *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus saligna*. II. Preferência alimentar e influência da idade foliar em seis espécies de *Eucalyptus* (Myrtaceae). 82 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Botucatu - SP.
- Oliveira, A.C., Fonseca, E.P., Anjos, N., Santos, G.P., Zanuncio, J.C. 1984. Resistência interespecífica de *Eucalyptus* spp. (Myrtaceae) à lagarta desfolhadora *Thyrinteina arnobia* Stoll, 1782 (Lepidoptera: Geometridae). *Revista Árvore* 8(2): 93-103.
- Outchkourov, N.S., Kogel, W.J.D., Bruin, A.S., Abrahamson, M., Jongsma, M.A. 2004. Specific cysteine protease inhibitors act as deterrents of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande), in transgenic potato. *Plant Biotechnology Journal* 2: 439–448.
- Pedrosa-Macedo, J.H., Rosales, C.J., Sousa, J.L., Oliveira, E.P. 1998. Presencia de *Thyrinteina arnobia* (Stoll1782) (Lepidoptera:Geometridae) el “medidor pardo” en plantaciones de *Eucalyptus urophylla* (Myrtaceae) en San Carlos, Estado Cojedes, Venezuela. *Boletin de Entomologia Venezolana*, Maracay, 13(1): 87-89.
- Pilon, A.M., Oliveira, M.G.A., Guedes, R.N.C. 2006. Protein digestibility, protease activity and post-embryonic development of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatilis*) exposed to the trypsin-inhibitor benzamidine. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 86:23-29.
- Santos, C.D., Ribeiro, A.F., Terra W.R., 1986. Differential centrifugation, calcium precipitation and ultrasonic disruption of midgut cells of *Erinnyis ello* caterpillars.

- Purification of cell microvilli and interferences concerning secretory mechanisms. *Canadian Journal of Zoology* 64(2): 490-500.
- Schoonhoven, L.M., van Loon, J.J.A. 2002. An inventory of taste in caterpillars: each species its own key. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 48(1): 215–263.
- Silva, C.P., Terra, W.R., Xavier-Filho, J., Grossi-De-Sá, M.F., Isejima, E.M., Da Matta, R.A., Miguens, F.C., Bifano, T.D., 2001. Digestion of legume starch granules by larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) and the induction of  $\alpha$ -amylases in response to different diets. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31: 41–50.
- Silva, F.B., Oliveira, M.G.A., Batista, R.B, Pires, C.V., Xavier, L.P., Piovesan, N.D., Oliveira, J.A., Jose, I.C., Moreira, M.A., 2002. Função fisiológica de lipoxigenases de folhas de soja submetidas ao ataque de lagarta (*Anticarsia gemmatalis* Hübner). *Arquivos do Instituto Biológico* 69(1): 67-74.
- Silva, F.B., Oliveira, M.G.A., Brumano, M.H.N., Pires, C.V., Oliveira, J.A., Pilon, A.M., Piovesan, N.D., Moreira, M.A. 2004. Função bioquímica da via das lipoxigenases em plantas de soja submetidas ao ataque de mosca branca (*Bemisia argentifolli*). *Ciência e Agrotecnologia* 28(2): 409-416.
- Smith, M.C. 1989. Plant resistance to insects. Ed. Wiley-Interscience publication, Toronto, Canadá. 286 p.
- Smith, R.F., Mittler, T.E. 1965. Annual review of entomology. Ed. Annual Reviews, Palo Alto, Califórnia. 425 p.

- Stephoun, A., Baldwin, I.T. 2007. Resistance management in a native plant: nicotine prevents herbivores from compensating for plant protease inhibitors. *Ecology Letters* 10(6): 499-511.
- Thaler, J.S., Stout, M.J., Karban, R. and Duffey, S.S. 2001. Jasmonate-mediated induced plant resistance affects a community of herbivores. *Ecological Entomology* 26, 312–324.
- van Dam, N.M., Hadwich, K., Baldwin, I.T. 2000. Induced responses in *Nicotiana attenuata* affect behavior and growth of the specialist herbivore *Manduca sexta*. *Oecologia*, 122, 371–379.
- Volpicella, M., Cordewener, J., Jongsma, M.A., Gallerani, R., Ceci, L.R., Beekwilder, J. 2006. Identification and characterization of digestive serine proteases from inhibitor-resistant *Helicoverpa zea* larval midgut. *Journal of Chromatography* 833(B):26–32.
- Winterer, J., Bergelson, J. 2001. Diamondback moth compensatory consumption of protease inhibitor-transformed plants. *Molecular Ecology* 10: 1069–1074.
- Zanuncio, J.C., Santana, D.L., Nascimento, E.C., Santos, G.P., Alves, J.B., Sartório, R.C., Zanuncio, T.V. 1993. *Lepidoptera desfolhadores de eucalipto: biologia, ecologia, e controle*. Ed. Folha de Viçosa Ltda, Viçosa, MG. 140 p.

## CAPÍTULO 3

### **Parâmetros bioquímicos da resposta de lagartas de *Thyrinteina arnobia* expostas a berenil**

## Resumo

A ingestão de inibidores de proteases (IPs) leva os insetos a utilizarem a sua reserva de aminoácidos para a síntese de mais proteases. Entretanto, estudos têm revelado que o efeito dos IPs sobre as enzimas digestivas pode levar a uma resposta adaptativa do inseto. Este trabalho teve por objetivo estudar a resposta bioquímica das proteases presentes no intestino de lagartas de *Thyrinteina arnobia*, desfolhadora de eucalipto, a concentrações crescentes de um IP do tipo bis-benzamidina, berenil. Para tal, foram oferecidas às lagartas folhas de eucalipto contendo 0,00; 0,03; 0,06; 0,09 e 0,12% (p/v) do IP sintético berenil. As lagartas conseguiram suplantar os efeitos de berenil nas menores concentrações testadas através da elevação da atividade de tripsinas-*like*, sem sofrer danos ao desenvolvimento biológico. Com o aumento da concentração, houve perda crescente de viabilidade da população. A concentração mais alta testada provocou hiperprodução de tripsinas-*like* e prejuízo no desenvolvimento do inseto. Berenil também impediu o aumento da atividade de cisteíno-proteases como resposta à inibição trípica. Estudos adicionais devem ser realizados para, futuramente, permitir a síntese de peptídeos miméticos para serem aplicados no campo, como estratégia para aumentar a resistência das plantas a insetos-praga.

**Palavras-chave:** berenil, Lepidoptera, Geometridae, tripsina, inibidor sintético.



## **Abstract**

Ingestion of proteinase inhibitors (PIs) leads to the use of amino acids reserves by insects for additional protease synthesis. However, studies have shown that the effect of PIs on digestive enzymes can lead to an adaptive response by the insect. This work aimed to study the biochemical response of proteases from the midgut of eucalypt defoliator caterpillar *Thyrintea arnobia*, to different concentrations of a bis-benzamidine PI, berenil. Larvae were fed on leaves of eucalyptus containing 0.00, 0.03, 0.06, 0.09 and 0.12% (w/v) of berenil. *T. arnobia* larvae were able to overcome the effects of the lowest concentrations of berenil by increasing their trypsin-like activity, without impairing their development. With increasing concentration, there was increasing loss of population viability. The higher concentration resulted in overproduction of trypsin-like proteases and impaired the insect development. Berenil also prevented the increasing activity of cysteine-proteinases in response to trypsin inhibition. Further studies should be performed allow the synthesis of mimetic peptides for field use, as a strategy to increase plant resistance to insect pests.

**Keywords:** berenil, Lepidoptera, Geometridae, trypsin, synthetic inhibitor.

## 1. Introdução

As plantas podem produzir inibidores de proteases (IPs) como compostos de defesa contra danos causados por vários tipos de estresses bióticos e abióticos (Silva *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2005; Fortunato *et al.*, 2004, 2007). Em geral, os IPs são proteínas pequenas, estáveis e abundantes que podem ser encontradas em tecidos de reserva das plantas, tais como sementes, tubérculos, folhas e frutos (Bayés *et al.*, 2006; Fortunato *et al.*, 2004, 2007; Marinho *et al.*, 2008).

A ingestão de inibidores de proteases leva os insetos a utilizarem sua reserva de aminoácidos para a síntese de mais proteases, visto que estas enzimas se tornam indisponíveis à catálise por estarem na forma do complexo Enzima-Inibidor (Broadway, 1995; Oliveira *et al.*, 2005). Conseqüentemente, em vez de o inseto utilizar os aminoácidos biodisponíveis para a síntese de proteínas necessárias ao seu crescimento, desenvolvimento, manutenção e reprodução, ele poderá utilizar sua reserva aminoacídica para a biossíntese de novas proteases, para realizar a hidrólise de sua dieta protéica. Este mecanismo de defesa pode comprometer a fisiologia do inseto, levando-o à morte (Broadway, 1995; Oliveira *et al.*, 2005). Entretanto, estudos têm revelado que o efeito dos inibidores sobre as enzimas digestivas pode levar a uma resposta adaptativa do inseto (Bayés *et al.*, 2006; Pilon *et al.*, 2006).

Proteases digestivas de diferentes espécies podem se comportar de forma particular em relação aos inibidores de proteases. Por isso há a necessidade de conhecer as proteases existentes no intestino do inseto-alvo e a forma como estas interagem com o IP (Ortego *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 2005). Atividade de serino-proteases tem sido encontrada em uma grande variedade de pragas da ordem Lepidoptera (Oliveira *et al.*, 2005; Pilon *et al.*, 2006), incluindo *Thyrinteina leucoceraea* (Marinho *et al.*, 2008),

lagarta do mesmo gênero que *T. arnobia*, um dos principais desfolhadores de eucalipto do Brasil (Holtz *et al.*, 2003).

Lagartas de *T. arnobia*, também conhecidas como lagartas-pardas, são bem adaptadas a plantas de eucalipto no Brasil (Holtz *et al.*, 2003). Os danos causados por essas pragas desfolhadoras em plantações de eucalipto podem causar prejuízo na fotossíntese e levar à paralisação do crescimento da planta, no caso de ataques sucessivos (Pedrosa-Macedo *et al.*, 1998).

Para que se tenha entendimento da ação do IP sobre um inseto é necessário verificar a atividade das enzimas na presença destas moléculas, bem como a ação do IP sobre a biologia do inseto, para elucidar possíveis estratégias de adaptação do mesmo. Berenil é um exemplo de inibidor sintético de serino-proteases (Oliveira *et al.*, 1993) e seu potencial inseticida foi investigado neste trabalho, bem como a sua interação com enzimas proteolíticas da lagarta-parda do eucalipto *T. arnobia*. O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade de lagartas de *T. arnobia* submetidas a concentrações crescentes de berenil sobre folhas de eucalipto, bem como a resposta enzimática destas lagartas ao IP em concentrações crescentes. Desta forma, buscou-se um maior entendimento dos mecanismos de adaptação utilizados pelas lagartas em resposta à ingestão de berenil.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Insetos e materiais**

Posturas de *T. arnobia* foram obtidas a partir da criação mantida na Universidade Estadual Paulista (UNESP, campus de Botucatu, São Paulo, Brasil). A partir dessas posturas foi estabelecida uma criação no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), onde as lagartas foram criadas sobre mudas de eucalipto acondicionadas em gaiolas (1,0 x 1,0 x 1,0m) de estrutura e fundo em madeira e laterais

e topo forrados com tecido organza. Na gaiola havia uma abertura frontal com fecho de velcro para possibilitar as trocas das mudas quando necessárias e para regar as plantas.

Para a realização do experimento foi selecionada a espécie *Eucalyptus grandis*, devido ao seu interesse econômico, principalmente para a produção de papel, celulose, carvão vegetal e óleos essenciais. Além disso, as lagartas de *T. arnobia* têm preferência por *E. grandis* em comparação a outras espécies (Oliveira *et al.*, 1984; Lemos, 1996). As mudas de eucalipto foram adquiridas em um viveiro da região, livres de qualquer aplicação foliar, transplantadas para vasos (volume = 1,7 m<sup>3</sup>) e, quando utilizadas, apresentavam aproximadamente 80 cm de altura. O IP berenil (aceturato de diminazeno) foi obtido da Sigma-Aldrich Química Brasil (São Paulo, Brasil). O espalhante adesivo Gotafix (C<sub>35</sub>H<sub>64</sub>N<sub>11</sub>) foi obtido do fabricante Milenia Agro Ciências S.A. e a sua adição teve por finalidade apenas obter maior aderência do IP à folha.

## 2.2. Viabilidade larval de *T. arnobia* alimentada com concentrações crescentes de berenil em folhas de eucalipto

As concentrações do inibidor de proteases berenil utilizadas nos testes foram selecionadas a partir de testes preliminares realizados com este IP em lagartas de *T. leucoceraea* e considerando experimentos realizados utilizando o IP benzamidina em *Anticarsia gemmatalis* (Pilon *et al.*, 2006) e *T. leucoceraea* (Marinho *et al.*, 2008).

Para o experimento, foram montados três blocos, sendo cada bloco composto por seis tratamentos, caracterizados por diferentes concentrações de berenil. Para cada tratamento foram utilizadas 13 repetições, sendo cada uma composta por uma lagarta de *T. arnobia*.

Cada bloco foi formado por uma postura de *T. arnobia*, havendo uniformidade dentro dos blocos entre os tratamentos quanto à origem e idade dos indivíduos estudados. Foram testados seis tratamentos: lagartas alimentadas de folhas imersas em

uma solução controle de Gotafix a 0,06% (v/v) e de folhas com a solução de Gotafix a 0,06% (v/v) acrescentada de berenil nas concentrações de 0,06; 0,12; 0,25; 0,5 ou 0,75% (p/v), conforme o tratamento.

Lagartas recém-eclodidas de *T. arnobia* foram individualizadas em placas de Petri plásticas (diâmetro = 9 cm). Cada tratamento foi composto por 39 indivíduos, sendo 13 em cada bloco. Quando coletada, cada folha de eucalipto teve o pecíolo envolto por algodão embebido em água e posteriormente coberto por papel alumínio, para manter a umidade. Cada folha de eucalipto foi, então, brevemente imersa por três vezes em um frasco de Becker contendo a solução correspondente ao tratamento e colocada sobre papel toalha, à sombra, por aproximadamente cinco segundos, de forma que apenas a borda da folha tivesse contato com o papel, para retirar o excesso da solução. Em seguida, a folha foi colocada dentro da placa de Petri, sob a lagarta.

As placas foram vistoriadas diariamente e as trocas de folhas realizadas conforme a necessidade, havendo sempre folha em bom estado e quantidade suficiente na placa. Quando as lagartas atingiram o quinto ínstar, devido ao tamanho, foram transferidas para copos plásticos (500 mL) tampados com organza e elástico. Foram acompanhadas as condições de temperatura, umidade e fotoperíodo (aproximada), sendo elas, respectivamente:  $26 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ,  $60 \pm 15\%$  e LD 12:12. Houve observação diária do experimento para avaliação da mortalidade das lagartas.

### 2.3. Análise da atividade enzimática no intestino de lagartas de *T. arnobia* alimentadas com concentrações crescentes de berenil em folhas de eucalipto

Para o teste foram utilizadas mudas de eucalipto pulverizadas com diferentes concentrações do inibidor de proteases berenil. Foram testados seis tratamentos: solução controle de Gotafix a 0,06% (v/v) e solução de Gotafix a 0,06% (v/v) acrescentada de berenil nas concentrações de 0,03%, 0,06%, 0,09% e 0,12% (p/v), todas preparadas com

água destilada. As concentrações de berenil foram selecionadas a partir do resultado obtido do teste biológico anteriormente descrito. Aquelas concentrações que causaram viabilidade de lagartas de *T. arnobia* próxima a zero foram descartadas dos testes bioquímicos e concentrações intermediárias às demais foram acrescentadas.

Para cada tratamento foram realizadas três repetições, sendo cada repetição composta por três lagartas de *T. arnobia* em 5º ínstar. Este é o ínstar no qual a lagarta se alimenta mais vorazmente e tem um maior tamanho, facilitando o processo de extração do intestino. O experimento foi conduzido em gaiolas como as anteriormente descritas para o acondicionamento da criação, sendo que cada gaiola abrigou apenas as mudas referentes a um tratamento por vez.

A solução de cada tratamento foi aplicada sobre a muda utilizando-se de um pulverizador plástico de pressão manual. A aplicação foi uniforme e até o ponto de escorrimento (aproximadamente 100 mL de solução por muda). Posteriormente as mudas foram deixadas secando à sombra por uma hora e levadas a seguir para as gaiolas. Em cada muda foram colocadas três lagartas de *T. arnobia*, alimentadas até então com folhas de eucalipto livres da aplicação de inibidores. Foram acompanhadas as condições de temperatura, umidade e fotoperíodo (aproximado), sendo elas, respectivamente:  $26 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ,  $60 \pm 15\%$  e LD 12:12. Após o período de 48 horas, as lagartas foram retiradas e tiveram seus intestinos extraídos para obtenção do extrato enzimático.

### 2.3.1. Obtenção dos extratos enzimáticos dos intestinos médios de lagartas de *T. arnobia*

Os intestinos médios foram extraídos após dissecação das larvas em presença de HCl  $10^{-3}$  M a  $4^{\circ}\text{C}$ . O extrato enzimático foi obtido através do rompimento celular resultante de nove ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em

banho-maria a 37°C, conforme a metodologia de Oliveira *et al.* (2005). Após os ciclos, frações do extrato (na concentração de 150mg de intestino por 1,0 mL de HCl 10<sup>-3</sup> M) foram centrifugadas em tubos plásticos de 2,0 mL com tampas a 100.000 g por 30 min a 4°C.

O sobrenadante contendo o material solúvel foi retirado e mantido a -20°C para análises posteriores.

### 2.3.2. Determinação da concentração de proteína nos extratos enzimáticos de lagartas de *T. arnobia*

A concentração de proteína foi obtida pelo método descrito por Bradford (1976), utilizando como padrão uma solução 0,2 mg/mL de soroalbumina bovina (BSA). A leitura foi realizada em triplicata.

### 2.3.3. Determinação da atividade proteásica nos extratos enzimáticos de lagartas de *T. arnobia*

A atividade proteolítica foi determinada utilizando-se o substrato azocaseína 2% (p/v) em tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,0 a 37°C. A mistura de reação consistiu de 25µL de substrato e 30µL de extrato enzimático e sofreu incubação de 30 minutos a 37°C, sendo em seguida paralisada com 120µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (v/v) e deixada em repouso por 15 minutos em gelo. Antes de ser monitorada espectrofotometricamente a 440 nm, a mistura foi centrifugada a 8000 g por cinco minutos e 120 µL do sobrenadante foram adicionados a 140µL de NaOH 1,0M (Tomarelli *et al.*, 1949). Para o branco a incubação inicial consistiu de 25µL de substrato e 30µL de tampão; para o controle da enzima a incubação inicial consistiu de 25µL do tampão e 30µL da enzima; os demais procedimentos seguiram de igual forma à reação teste. A leitura foi realizada em triplicata.

#### 2.3.4. Determinação da atividade amidásica de proteases tripsina-*like* nos extratos enzimáticos de lagartas de *T. arnobia*

A atividade amidásica foi determinada pelo método descrito por Erlanger *et al.* (1961), utilizando-se o substrato cromogênico N-benzoil-L-arginil-*p*-nitroanilida (L-BApNA, substrato para enzimas tripsina-*like*) 1,2mM a 25°C em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo 20 mM de CaCl<sub>2</sub>. A mistura de reação consistiu de 0,5mL do substrato, 0,49mL do tampão e 10μL do extrato enzimático. O branco era composto de 0,5mL do substrato e 0,49mL do tampão.

As velocidades enzimáticas foram determinadas pela formação do produto *p*-nitroanilida, através da medida da absorbância a 410 nm em função do tempo (2,5 minutos), utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de 8800 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> para o produto. O experimento foi realizado em uma série de três repetições.

#### 2.3.5. Determinação da atividade esterásica de proteases tripsina-*like* nos extratos enzimáticos de *T. arnobia*

A atividade esterásica foi realizada pelo método descrito por Hummel (1959), utilizando-se o substrato Nα-*p*-tosil-L-arginina metil éster (L-TAME) 0,1 mM a 25°C em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo 20 mM CaCl<sub>2</sub>. A mistura de reação consistiu de 0,5mL do substrato, 0,49mL do tampão e 10μL do extrato enzimático. O branco era composto de 0,5mL do substrato e 0,49mL do tampão.

As velocidades foram determinadas medindo-se a absorbância a 247 nm em função do tempo (2,5 minutos), utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de 540 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> para o produto. O experimento foi realizado em triplicata.



### 2.3.6. Determinação da atividade de cisteíno-proteases nos extratos enzimáticos de lagartas de *T.arnobia*

A determinação da atividade de cisteíno proteases foi realizada adaptando-se o método de Erlanger *et al.* (1961). Foram misturados 0,59 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M contendo ditioneitol (DTT) a 5mM (agente redutor de ligações de enxofre), pH 8,0, 10  $\mu$ L do extrato enzimático do intestino médio da lagarta e 0,1 mL de benzamidina 10 mM (inibidor de serino proteases). Essa mistura foi incubada por 15 minutos à temperatura ambiente. A seguir, foi adicionado 0,5 mL do substrato L-BApNA 1,2mM (Marinho *et al.*, 2008).

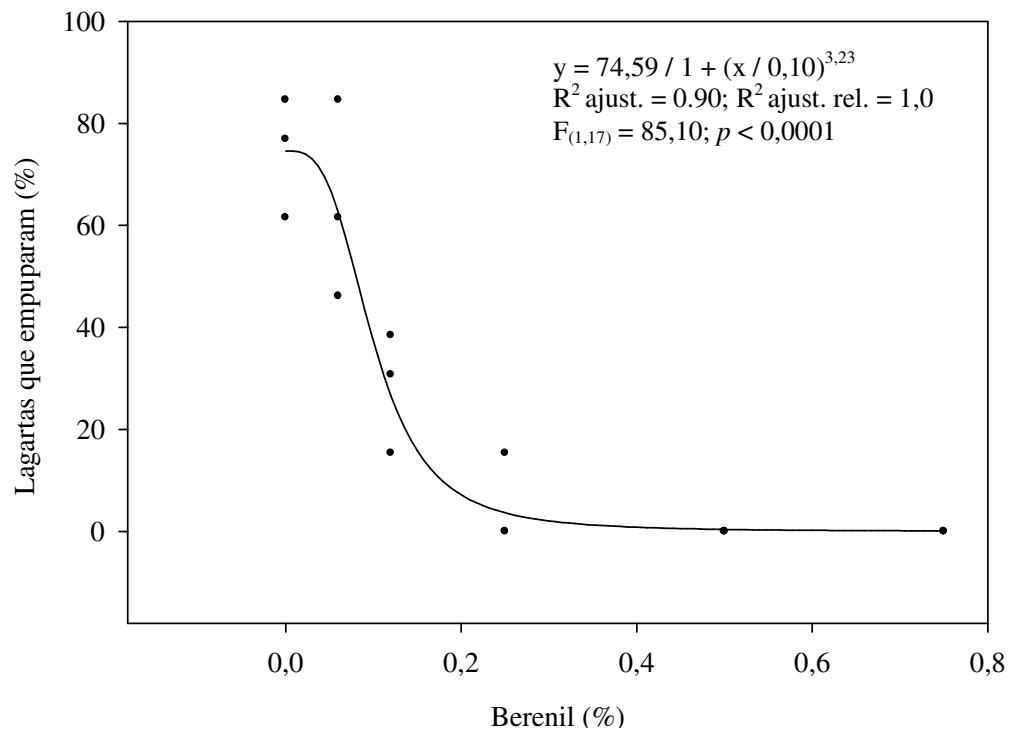
As velocidades foram determinadas através da medida da absorbância a 410nm em função do tempo (2,5 minutos), utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de 8800  $M^{-1}.cm^{-1}$  para o produto. O experimento foi realizado em uma série de três repetições.

### 2.4. Análise estatística

Os parâmetros avaliados quando sujeitos à dieta com concentrações crescentes de berenil foram submetidos à análise de regressão testando modelos desde os mais simples (linear e quadrático), até os modelos alternativos de maior complexidade (modelos não-lineares de pico) (SPSS 2000). Cada escolha do modelo foi efetuada com base no coeficiente de determinação ajustado ( $R^2$  ajust.), no coeficiente de determinação ajustado relativo ( $R^2$  ajust. rel.), simplicidade e alto valor de F (e quadrado de média). O  $R^2$  ajustado relativo foi calculado dividindo-se o  $R^2$  ajustado do modelo selecionado pelo  $R^2$  ajustado máximo possível dentre as alternativas de modelos, para obter uma indicação da qualidade do ajuste do modelo selecionado em relação às demais opções.

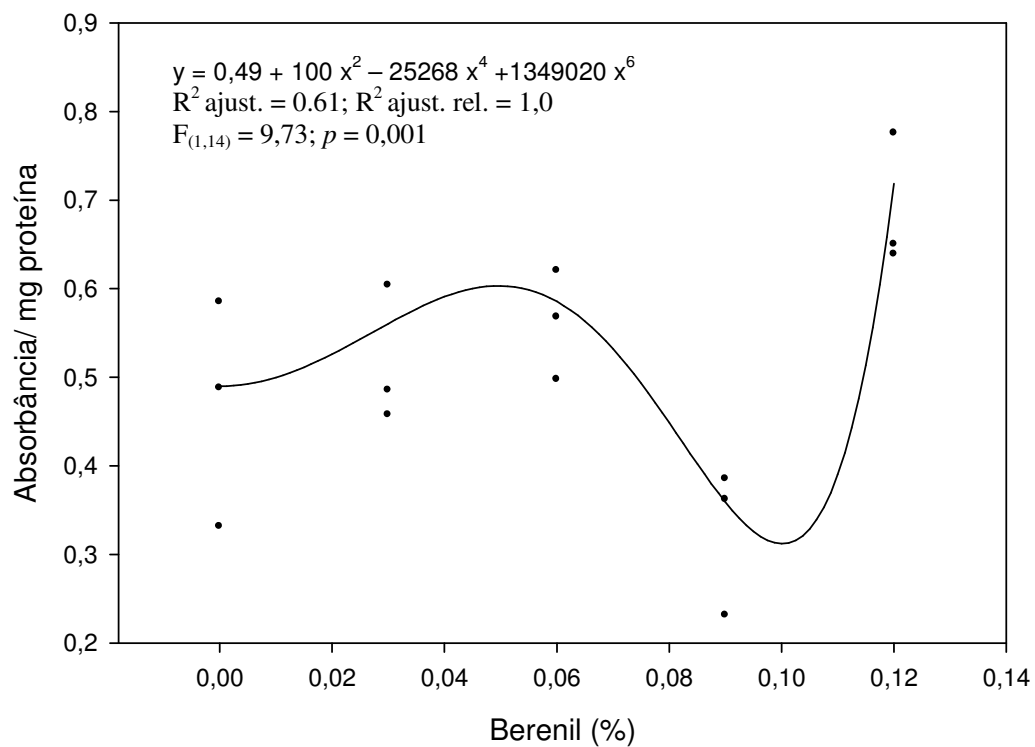
### 3. Resultados

A porcentagem de lagartas que alcançaram a fase de pupa decresceu à medida que aumentou a concentração do IP oferecido a *T. arnobia* (Figura 1). Em lagartas que se alimentaram de folhas de eucalipto sem berenil, houve viabilidade de 74,6% da população estudada. Dentre as lagartas que ingeriram as concentrações de 0,06% e 0,12% as porcentagens das que alcançaram a fase de pupa foram, respectivamente, 62,6% e 26,6%. Para os demais tratamentos, com as maiores concentrações de berenil, a viabilidade foi próxima a zero.



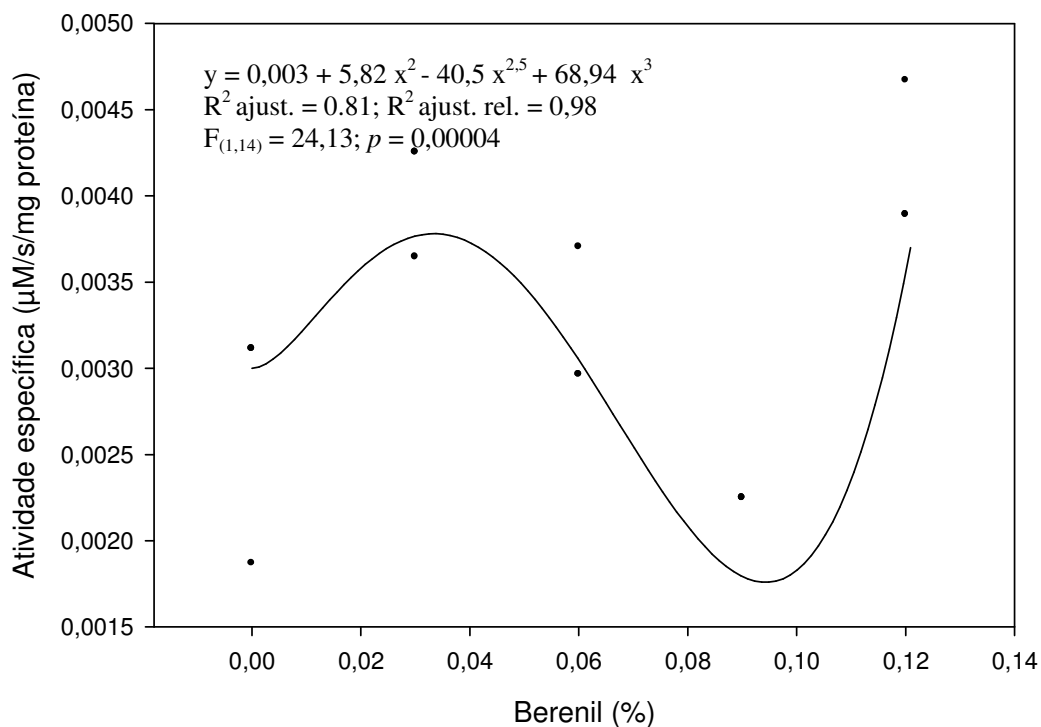
**Figura 1.** Viabilidade da fase larval de *T. arnobia* alimentada com concentrações crescentes de Berenil em folhas de eucalipto. Cada ponto corresponde à média de um bloco (13 lagartas).

A curva para atividade proteásica total no intestino de lagartas de *T. arnobia* que ingeriram diferentes concentrações de berenil está apresentada na Figura 2. A princípio, pode-se observar um pequeno pico, que compreende os valores de atividade encontrados para lagartas que ingeriram berenil nas concentrações de 0,03% e 0,06%. Este pico é seguido de um declínio da curva, que compreende o resultado de lagartas que ingeriram a concentração de 0,09% de berenil. Em seguida a curva se eleva e valor maior de atividade proteásica total é apresentado por lagartas que se alimentaram de folhas com 0,12% de berenil.



**Figura 2.** Atividade proteásica total no extrato de intestinos de lagartas de *T. arnobia* alimentadas por 48 horas sobre folhas de eucalipto contendo concentrações crescentes de berenil. Os pontos representam as médias das triplicatas de cada tratamento.

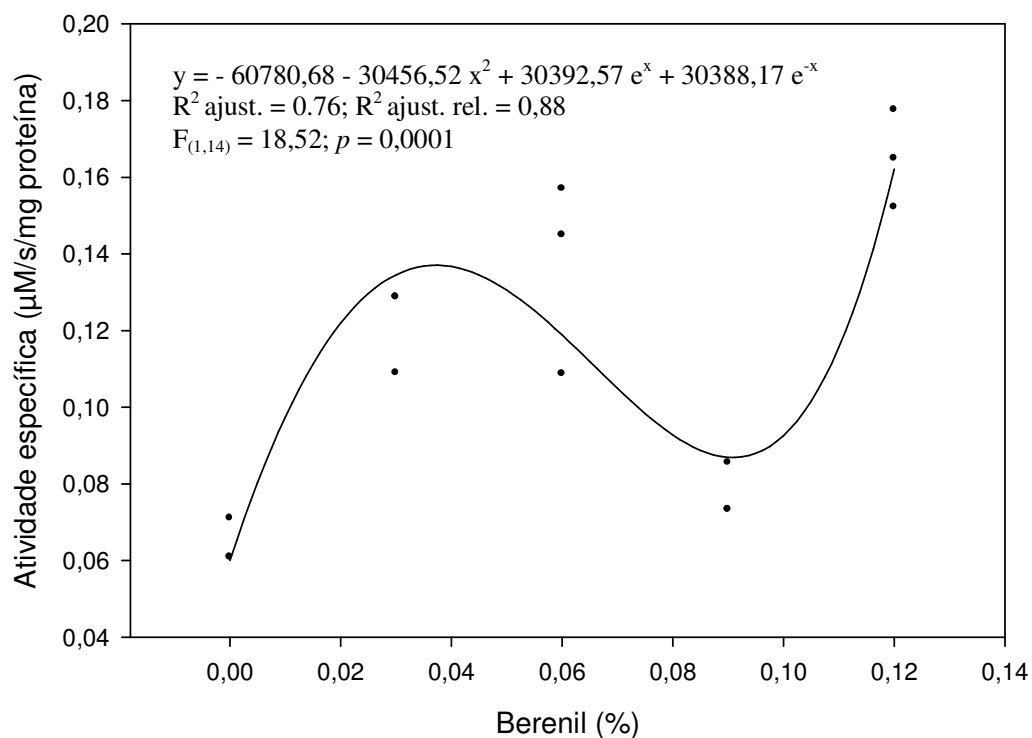
Na curva para atividade amidásica das tripsina-like (Figura 3) também se pode observar um pico de elevação, que compreendeu lagartas dos tratamentos com 0,03% e 0,06% de berenil. Ao pico segue-se um declínio, correspondente à atividade amidásica de lagartas do tratamento com 0,09% de berenil. Em seguida a curva se eleva novamente a atividades maiores do que as apresentadas pelo primeiro pico de elevação, onde se encontra o valor obtido para lagartas que ingeriram 0,12% de berenil.



**Figura 3.** Efeito de berenil sobre a atividade amidásica de tripsinas-like no extrato de intestinos de lagartas de *T. arnobia*. Os pontos representam as médias das triplicatas de cada tratamento.

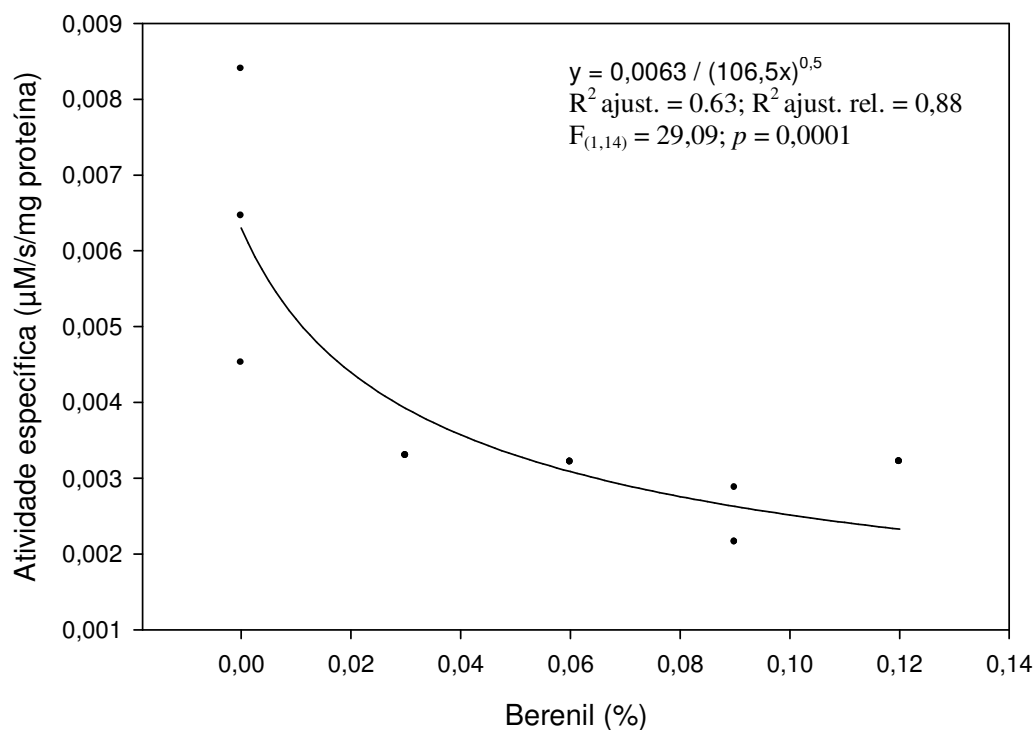
A curva para atividade esterásica (Figura 4) acompanhou tendência semelhante às apresentadas pelas curvas de atividade amidásica e de concentração total de

proteases. Existe um primeiro pico, que compreende as atividades esterásicas das lagartas tratadas com 0,03% e 0,06% de berenil. Em seguida, a curva apresenta um declínio, onde se pode encontrar a atividade esterásica das lagartas que ingeriram 0,09% do IP. Por fim, a atividade se eleva a valores mais altos do que os apresentados no primeiro pico, onde se encontra a atividade das lagartas do tratamento com 0,12% de berenil.



**Figura 4.** Efeito de berenil sobre a atividade esterásica de tripsinas-like no extrato de intestinos de lagartas de *T. arnobia*. Os pontos representam as médias das triplicatas de cada tratamento.

A atividade específica de cisteíno-proteases foi reduzida na presença de berenil (Figura 5). Os valores desta atividade tendem a decrescer quanto maior a concentração de berenil ingerida pelas lagartas de *T. arnobia* em folhas de eucalipto.



**Figura 5.** Efeito de berenil sobre a atividade específica de cisteíno-proteases no extrato de intestinos de lagartas de *T. arnobia*. Os pontos representam as médias das triplicatas de cada tratamento.

#### 4. Discussão

Berenil demonstrou relação concentração-dependente na inibição de proteases intestinais de lagartas de *T. arnobia*. As lagartas que ingeriram berenil nas menores concentrações conseguiram suplantar os efeitos do IP através de pequeno aumento da atividade trípica. A concentração de 0,09%, que provavelmente causaria prejuízo ao desenvolvimento larval de *T. arnobia*, de fato reduziu a atividade enzimática nas lagartas. Houve tentativa de superar a inibição das proteases através do aumento da atividade de tripsinas-like quando as lagartas ingeriram berenil a 0,12%, concentração que afetou de forma severa o desenvolvimento larval de *T. arnobia*.

Para suplantar a ação dos IPs no intestino, os insetos podem se adaptar à presença dos mesmos através da expressão de novas proteases que sejam resistentes ao inibidor, podendo estas pertencerem à mesma classe ou não das proteases-alvo (Jongsma & Bolter, 1997). Os dados indicam que expressão de cisteíno-proteases não consiste em estratégia de adaptação de *T. arnobia* à ingestão de berenil, inibidor de proteases do tipo benzamidina, pois houve redução da atividade dessas enzimas para todas as concentrações testadas. Provavelmente houve redução na expressão de cisteíno-proteases para que outras enzimas fossem produzidas em resposta à ingestão do IP.

Segundo os dados de viabilidade, as lagartas de *T. arnobia* são capazes de suplantar a ação do IP berenil quando este é oferecido em concentrações menores a 0,06% em solução sobre as folhas de eucalipto. O berenil é um inibidor parcialmente competitivo da tripsina, podendo formar complexos binários EI (Enzima-Inibidor) e ternários IEI e IES (Inibidor-Enzima-Substrato). O complexo ternário IES não impede a enzima de produzir produto, mas somente o complexo IEI. O complexo EI, por sua vez, pode causar o fenômeno de ativação enzimática, aumentando a eficiência da enzima (Oliveira *et al*, 1993). As lagartas de *T. arnobia* que ingeriram berenil nas concentrações de 0,03% e 0,06% em folhas apresentaram maior atividade trípica (amidásica e esterásica) e maior concentração total de proteases no intestino em relação às que não se alimentaram do IP.

A secreção de proteases pode ser atribuída a dois mecanismos, envolvendo tanto um efeito direto de componentes alimentares (proteínas) nas células epiteliais do intestino médio (Baker *et al.*, 1984), quanto um efeito hormonal provocado pelo consumo de alimentos (Applebaum, 1985). Dessa forma, possivelmente houve aumento da expressão de tripsinas-*like* em razão do aumento da concentração de berenil na dieta. Provavelmente as quantidades do IP ingerido, apesar de terem causado apenas pequenas

perdas à viabilidade larval, tenham sido suficientes para estimular a secreção de mais tripsinas no intestino, que possivelmente agiram na forma do complexo ternário IES. Alternativamente, pode ter ocorrido o fenômeno de ativação enzimática, o qual faz aumentar a atividade da enzima. Oliveira *et al.* (1993) mostraram que o sítio S<sub>2</sub> da enzima estava ocupado quando a mesma aumentou sua atividade por volta de três vezes.

A concentração de 0,09% de berenil em folhas de eucalipto causaria morte de mais da metade da população das lagartas de *T. arnobia*, segundo a curva obtida para viabilidade. As lagartas que ingeriram esta concentração do IP tiveram de fato a atividade trípica reduzida, bem como a concentração total de proteases. A quantidade maior do IP berenil pode ter provocado a formação do complexo ternário IEI com as enzimas de tripsina, impedindo, assim, a ligação destas com as proteínas do intestino. É conhecido que, ao serem ingeridos, os inibidores de proteases inibem a atividade das enzimas proteolíticas no intestino médio, reduzindo assim a quantidade de proteína digerida, e induzindo à hiperprodução das enzimas digestivas, o que resulta em deficiência de aminoácidos no organismo (Shulke & Murdock, 1983, Oliveira *et al.*, 2005). A concentração de 0,09% provavelmente foi suficiente para inibir a atividade proteolítica sem provocar hiperprodução das enzimas digestivas. Este último evento possivelmente ocorreu com as lagartas que ingeriram a concentração de 0,12% de berenil.

Com a ingestão de folhas de eucalipto contendo o berenil na concentração de 0,12% em solução, a atividade de tripsinas-like (amidásica e esterásica) no intestino médio de lagartas de *T. arnobia* se elevou, bem como a atividade proteásica total no intestino. Essa mesma concentração do berenil afetou severamente a viabilidade de lagartas de *T. arnobia*. De forma semelhante, Pilon *et al.* (2006) observaram aumento da atividade trípica em lagartas de *A. gemmatalis* quando estas ingeriram altas



concentrações do IP benzamidina. O aumento de atividade de tripsinas-*like* em lagartas de *T. arnobia* indica uma tentativa de adaptação desses insetos à ingestão do IP através da superprodução de enzimas presentes no intestino do inseto.

Dessa forma, os dados indicam que lagartas de *T. arnobia* conseguem suplantar os efeitos de berenil, um IP do tipo bis-benzamidina, nas menores concentrações testadas através da elevação da atividade de tripsinas-*like*, sem sofrer danos ao desenvolvimento biológico. Com o aumento da concentração, as lagartas não conseguiram manter a estratégia de defesa, havendo perda crescente de viabilidade da população. Ao ingerirem a concentração mais alta, com 0,12% de berenil, as lagartas apresentaram aumento da atividade proteásica, entretanto, a mortalidade observada foi superior a 60%, o que demonstra que o mecanismo de defesa utilizado não foi eficiente para suplantar os efeitos do berenil.

Assim, o inibidor de proteases do tipo bis-benzamidina, berenil, surge como alternativa promissora para o controle da lagarta-parda do eucalipto, *T. arnobia*, e sugere pesquisas de sua ação em demais lepidópteros. Este composto, além de inibir tripsinas-*like*, inibe a ação de cisteíno-proteases que possam ser produzidas como estratégia de defesa do inseto, uma vez que serino e cisteíno-proteases são as enzimas mais importantes na digestão de Lepidoptera (Srinivasan *et al.*, 2006). Estudos adicionais devem ser realizados para, futuramente, permitir a síntese de peptídeos miméticos para serem aplicados no campo, como estratégia para aumentar a defesa das plantas a insetos-praga.

## 5. Referências bibliográficas

- Applebaum, S.W. 1985. Biochemistry of digestion. In: Comparative Physiology and Pharmacology of Insects (Edited by Kerkut G..A. and Gilbert, L.I.), Pergamon, Toronto, 5:279-311.
- Baker, J.E., Woo, S.M., Mullen, M.A. 1984. Distribution of proteinases and carbohydrates in the midgut of the larvae of the sweet potato weevil *Cyrtolobos formicarius* and response of proteinase to inhibitors from sweet potato. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 36: 97-105.
- Bayés, A., Vega, M.R., Vendrell, J., Aviles, F.X., Jongmsa, M.A., Beekwilder, J. 2006. Response of the digestive system of *Helicoverpa zea* to ingestion of potato carboxypeptidase inhibitor and characterization of an uninhibited carboxypeptidase B. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 36:654-664.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Broadway, R.M. 1995. Are insects resistant to plant proteinase inhibitors? *Insect Physiology* 41:107-116.
- Carlini, C.R., Grossi-de-Sá, M.F. 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, 40:1515-1539.
- 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.

- Ferreira, C.C.A., Oliveira, M.G.A., Brumano, M.H.N., Guedes, R.N.C., Almeida, F.T., Silva, C.H.O., Moreira, M.A., 2005. Lack of seed lipoxigenases does not affect soybean defense against removal of reproductive tissue. *Bioscience Journal (UFU)* 21(1): 49-55.
- Fortunato, F.S., Oliveira, M.G.A., Brumano, M.H.N., Silva, C.H.O., Guedes, R.N.C., Moreira, M.A.M., 2007. Lipoxygenase-induced defense of soybean varieties to the attack of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis* Hübner). *Journal of Pest Science* 80(4), 241-247.
- Fortunato, F.S., Oliveira, M.G.A., Brumano, M.H.N., Zanuncio, J.C., Oliveira, J.A., Almeida, F.T., Pilon, A.M., Sedyama, C.S., Moreira, M.A., 2004. Effect of the *Anticarsia gemmatalis* injury on the lipoxygenases activity from soybean leaves. *Bioscience Journal* 20(2): 37-46.
- Hilder, V.A., Gatehouse, A.M.R., Sheerman, S.E., Barker, R.F., Boulter, D. 1987. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature*. 330, 160–163.
- Holtz, A.M., Oliveira, H.G., Pallini, A., Marinho, J.S., Zanuncio, J.C., Oliveira, C.L. 2003. Adaptação de *Thyrntaina arnobia* em novo hospedeiro e defesa induzida por herbívoros em eucalipto. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 38: 453-458.
- Hummel, B.C.W. 1959. A modified spectrophotometric determination of chymiotrypsin, trypsin and trombin. *Canadian Journal of Biochemistry Physiology* 37: 1393-1399.
- Jongsma, M.A., Bolter, C., 1997. The adaptation os insects to plant protease inhibitors. *Journal of Insect Physiology* 43(10): 885-895.
- Lawrence, P.K., Koundal, K.R. 2002. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electronic Journal of Biotechnology* 5(1):93-109.

- Lemos, R.N.S. 1996. *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae). I. Consumo de área foliar e produção de excremento em *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus saligna*. II. Preferência alimentar e influência da idade foliar em seis espécies de *Eucalyptus* (Myrtaceae). 82 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Botucatu - SP.
- Marinho, J.S., Oliveira, M.G.A., Guedes, R.N.G., Pallini, A., Oliveira, C.L. 2008. Inibidores de proteases de hospedeiros nativos e exóticos e sua ação em intestinos de lagartas de *Thyrinteina leucoceraea*. Revista *Árvore*, 32(6): 1125-1132.
- Oliveira, A.C., Fonseca, E.P., Anjos, N., Santos, G.P., Zanuncio, J.C. 1984. Resistência interespecífica de *Eucalyptus* spp. (Myrtaceae) à lagarta desfolhadora *Thyrinteina arnobia* Stoll, 1782 (Lepidoptera: Geometridae). Revista *Árvore*, 8(2): 93-103.
- Oliveira, M.G.A., Rogana, E., Rosa, J.C., Reinhold, B.B., Andrade, M.H., Greene, L.J., Mares-Guia, M. 1993. Tyrosine 151 is part of the substrate activation binding site. *Journal of Biological Chemistry*. 268:26893-26903.
- 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 gemmatalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 140(B):369-380.
- Ortego, F., Farinós, G.P., Ruiz, M., Marco, V., Castañera, P., 1998. Characterization of digestive proteases in the weevil *Aubeonymus mariaefranciscae* and effects of proteinase inhibitors on larval development and survival. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 88(3): 265-274.

- Pedrosa-Macedo, J.H., Rosales, C.J., Sousa, J.L., Oliveira, E.P. 1998. Presencia de *Thyriniteina arnobia* (Stoll1782) (Lepidoptera:Geometridae) el “medidor pardo” en plantaciones de *Eucalyptus urophylla* (Myrtaceae) en San Carlos, Estado Cojedes, Venezuela. Boletín de Entomología Venezolana, Maracay, 13(1): 87-89.
- Pilon, A.M., Oliveira, M.G.A., Guedes, R.N.C. 2006. Protein digestibility, protease activity and post-embryonic development of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*) exposed to the trypsin-inhibitor benzamidine. Pesticide Biochemistry and Physiology 86:23-29.
- Shulke, R.H., Murdock, L.L. 1983. Lypoxigenase, trypsin inhibitor, and lectin from soybeans: effects on larval growth of *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae). Environmental Entomology 12:787-791.
- Silva, F.B., Oliveira, M.G.A., Batista, R.B, Pires, C.V., Xavier, L.P., Piovesan, N.D., Oliveira, J.A., Jose, I.C., Moreira, M.A., 2002. Função fisiológica de lipoxigenases de folhas de soja submetidas ao ataque de lagarta (*Anticarsia gemmatalis* Hübner). Arquivos do Instituto Biológico 69(1): 67-74.
- Srinivasan, A., Giri, A.P., Gupta, V.S. 2006. Structural and functional diversities in Lepidopteran serine proteases. Cellular & Molecular Biology Letters 11(1):132-154.
- Tomarelli, R.M., Charney, J., Harding, M.L. 1949. The use of azoalbumin as a substrate in the colorimetric determination of peptic and tryptic activity. Journal of Laboratory and Clinical Medicine. 34:428-433.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o objetivo de estudar a interação entre o inibidor de proteases (IP) sintético do tipo bis-benzamidina, berenil, e *Thyrinteina arnobia*, foram determinados parâmetros biológicos, bioquímicos e comportamentais de *T. arnobia* alimentadas com plantas de eucalipto contendo diferentes concentrações do IP.

Berenil causa efeitos letais e sub-letais a *T. arnobia* e afeta parâmetros populacionais desses insetos. Em doses crescentes, este IP afeta severamente a sobrevivência das larvas, enquanto que concentrações sub-letais causa alongamento do ciclo larval e afeta parâmetros da tabela de vida do inseto.

Berenil exibe ação repelente e deterrente a *T. arnobia*. Quando oferecida a chance de escolha, as lagartas preferem as plantas contendo menores concentrações de berenil ou sem o IP e consomem mais folhas da planta de eucalipto sem o IP, evitando as plantas que possuem berenil. Lagartas de *T. arnobia* não apresentam alimentação compensatória quando ingerem folhas de eucalipto contendo berenil, pelo contrário, o consumo diminui conforme se eleva a concentração do IP na planta, confirmando o efeito deterrente de berenil sobre as lagartas.

Os dados bioquímicos indicam que lagartas de *T. arnobia* conseguem suplantar os efeitos de berenil nas menores concentrações testadas através da elevação da atividade de tripsinas-*like*, sem sofrer danos ao desenvolvimento biológico. Com o aumento da concentração, as lagartas não conseguem manter a estratégia de defesa, havendo perda crescente de viabilidade da população. Ao ingerirem a concentração mais alta testada, as lagartas apresentam aumento da atividade proteásica, entretanto, a mortalidade observada é superior a 60%, o que demonstra que o mecanismo de defesa

utilizado não é eficiente para suplantare os efeitos do berenil. Berenil também impede o aumento da atividade de cisteíno-proteases como resposta à inibição trípica.

Assim, o inibidor de proteases do tipo bis-benzamidina, berenil, surge como alternativa promissora para o controle da lagarta-parda do eucalipto, *T. arnobia*, e sugere pesquisas de sua ação em demais lepidópteros. Estudos adicionais devem ser realizados para, futuramente, permitir a síntese de peptídeos miméticos para serem aplicados no campo, como estratégia para aumentar a defesa das plantas a insetos-praga.