



INIBIDOR DE PROTEASES (BERENIL) AFETANDO BIOLOGIA E COMPORTAMENTO DE LAGARTAS DE *Helicoverpa armigera*

Jullian Jacira da Silva **Lemes**¹; Jeanne Scardini **Marinho-Prado**²; Renan Richard de **Souza**³; Bruna Caroliny Passadore **Dias**⁴

Nº 15405

RESUMO - *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) é uma espécie polífaga e de ampla distribuição geográfica, cujas lagartas foram registradas em mais de 180 espécies de plantas cultivadas e nativas, em cerca de 67 famílias hospedeiras. Até o início de 2013, não havia sido registrada no continente americano, sendo até então considerada praga quarentenária A1 no Brasil. Desde então, *H. armigera* vem causando danos em diversas culturas em todo o País. Essa espécie desenvolve resistência com muita facilidade, tem-se buscado novas alternativas de controle. O objetivo deste trabalho foi explorar o potencial do inibidor de proteases berenil (aceturato de diminazena) como inibidor de proteases para o controle de lagartas. Berenil foi aplicado em folhas de soja, que foram oferecidas a lagartas de *H. armigera*, na concentração de 0,12%. Acompanhou-se o peso e o desenvolvimento de lagartas que ingeriram folhas com e sem o berenil desde o segundo instar larval até a morte do inseto. Realizou-se também a medição da área foliar consumida pelas lagartas de ambos os tratamentos durante 24h. O inibidor de proteases causou redução na porcentagem de ganho de peso de lagartas e causou deterrência alimentar a esses insetos quando demonstrando ter potencial para uso na defesa de plantas contra esses insetos.

Palavras-chave: Lepidoptera, Berenil, aceturato de diminazena.

1 Autor, Bolsista CNPq(PIBIC): Graduação em Ciências Biológicas, UNIP, Campinas-SP; jullian.lemes@gmail.com

2 Orientador: Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP jeanne.marinho@embrapa.com

3 Bolsista Embrapa: Graduação em Ciências Biológicas, UNIP, Campinas-SP.

4 Bolsista Embrapa: Graduação em Ciências Biológicas, UNIP, Campinas-SP



ABSTRACT – *Helicoverpa armigera* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) is a polyphagous and widely distributed species, whose caterpillars were recorded in more than 180 species of cultivated and native plants in about 67 host plant families. By the beginning of 2013, it had not been officially registered in the American continent, being considered an A1 quarantine pest in Brazil. Since then, *H. armigera* has caused damage to various crops across the country. This specie develops resistance quickly, which justifies the search of new alternatives of control. Thus, the aim of this study was to explore the potential of the proteinase inhibitor Berenil (diminazene aceturate) for caterpillars control. Berenil was applied in soybean leaves which were given to *H. armigera* caterpillars at a concentration of 0.12%. The development of caterpillars was observed since the second instar to the insect's death. It was also evaluated the leaf area consumed by larvae of both treatments for 24h. Berenil caused a reduction in larvae weight gain and in food consumption when present in soybean leaves, demonstrating to have potential for using in plant defense against these insects. This species develops resistance quickly, which justifies as a new alternatives of control.

Keywords: *Helicoverpa armigera*, Berenil (diminazene aceturate).

1 INTRODUÇÃO

Helicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae) é uma espécie extremamente polífaga, suas larvas foram registradas em mais de 180 espécies de plantas cultivadas e nativas, em cerca de 67 famílias hospedeiras (CZEPAK, 2013). Até o início de 2013 não havia sido oficialmente registrada no continente americano, sendo até então considerada praga quarentenária A1 no Brasil (CZEPAK *et al.*, 2013, CZEPAK, 2013). Os adultos apresentam grande potencial reprodutivo e de dispersão (CZEPAK, 2013). Desde o ovo até o indivíduo adulto tem-se um período de quatro a seis semanas, podendo-se ter várias gerações ao longo do ano. As lagartas atacam todos os estádios fenológicos das plantas, comendo folhas, ramos, flores, botões florais, espigas e frutos, apresentando alta sobrevivência mesmo em condições adversas (ÁVILA *et al.*, 2013; CZEPAK, 2013).

Para o controle dessa praga é indicado o uso do manejo integrado de pragas, destacandose a rotação dos princípios ativos e de seus mecanismos de ação para reduzir a pressão de seleção dos ingredientes ativos, já que a população pode desenvolver resistência com muita facilidade (ÁVILA *et al.*, 2013; CZEPAK, 2013). Tal fato justifica a busca por novos compostos a serem utilizados na defesa das plantas contra esses insetos.

As plantas são capazes de produzir compostos químicos que funcionam para sua própria defesa contra o ataque de pragas. Tais compostos pertencem ao metabolismo secundário das plantas e podem ser de origem protéica, como por exemplo os inibidores de proteases (AGRAWAL,1998). Os inibidores de proteases compõem uma das mais estudadas classes de



proteínas de defesa de plantas. Esses compostos reduzem a capacidade de digestão dos insetos através da inibição das proteases do intestino, prejudicando, assim, seu desenvolvimento e crescimento (BROADWAY & DUFFEY, 1986; MARINHO-PRADO *et al.*, 2011). A ingestão de inibidores de proteases leva os insetos a deixarem de empregar os aminoácidos biodisponíveis na síntese de proteínas necessárias ao seu crescimento, desenvolvimento, manutenção e reprodução, passando a utilizar essa reserva aminoacídica para a biossíntese de novas proteases para a realização da hidrólise de sua dieta protéica. Este mecanismo de defesa pode comprometer a fisiologia do inseto, levando-o à morte (PILON *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Diversos estudos têm sido realizados visando esclarecer e demonstrar o efeito dos inibidores sobre os insetos herbívoros, mais especificamente os efeitos sobre os parâmetros biológicos, que culminam com um desempenho inferior destes insetos quando comparados ao seu desenvolvimento na ausência destes compostos (LAWRENCE & KOUNDAL, 2002; PILON *et al.*, 2006; MARINHO-PRADO *et al.*, 2011). Os efeitos dos inibidores de proteases nos insetos já foram comprovados de diversas maneiras: incorporados na dieta (PILON *et al.*, 2006), pulverizados diretamente sobre a planta (MARINHO-PRADO *et al.*, 2011; MARINHO-PRADO *et al.*, 2012) e expressos em plantas transgênicas (VILA *et al.*, 2005).

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 e o principal em lepidópteros (LAWRENCE & KOUNDAL, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2005). Entretanto, em um complexo estável hospedeiro-praga, insetos evoluíram e se adaptaram para superar o efeito de inibidores de proteases de suas plantas hospedeiras (VILA *et al.*, 2005). Portanto, é necessário utilizar compostos de plantas não hospedeiras ou compostos sintéticos como fontes potenciais para a defesa das plantas contra os insetos-praga. Berenil é um inibidor de tripsinas sintético e foi utilizado neste trabalho para testes em lagartas de *H. armigera*, avaliando o potencial desse composto contra esta praga.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A criação da *H. armigera* foi conduzida na área quarentenada do Laboratório de Quarentena Costa Lima, na Embrapa Meio Ambiente, em Jaguariúna, SP, em uma sala climatizada a 25°C de temperatura e 70% de umidade do ar, com iluminação por luz natural. As lagartas foram criadas individualmente em copos plásticos contendo uma dieta artificial (VILELA *et al.*, 2014), onde permaneceram por aproximadamente 2 a 3 semanas até tornarem-se pupas. A



**9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015
10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo**

pupa recém-formada foi deixada de molho durante 10 minutos em solução a 10% de água sanitária, enxaguada em água corrente e colocada em uma gaiola até emergência do adulto. Após emergirem, os adultos foram transferidos para uma gaiola revestida com papel filtro para a postura dos ovos, onde foram alimentados com solução de mel a 30%. As posturas foram retiradas a cada dois dias e colocadas em sacos plásticos até os ovos eclodirem. As larvas recém-eclodidas foram transferidas para os copos com a dieta previamente esterilizada durante duas horas em câmara de fluxo laminar com luz ultra violeta.

Os tratamentos contendo solução berenil e solução controle. Na solução teste havia 0,12% (p/v) de berenil em água mili-Q a 0,01% de (v/v) Triton x-100. A solução controle foi composta apenas por água mili-Q contendo 0,01% de Triton x-100.

Nos bioensaios, foram utilizadas lagartas de *H. armigera* com 7 dias (± 1) de vida. Cada lagarta foi pesada antes de começar os experimentos. Para os bioensaios foram utilizadas folhas de soja e cada folha foi medida em um aparelho medidor de área foliar (Li-Cor) antes do início dos testes. Após a medição, as folhas foram mergulhadas nas respectivas soluções, num total de 13 repetições para cada tratamento. As folhas foram deixadas nas soluções durante 10 minutos e depois deixadas em placas de Petri individualmente até secarem. Em seguida, as lagartas foram colocadas para se alimentarem durante 24 horas com as folhas contendo os tratamentos. As placas de Petri foram vedadas e mantidas dentro de câmara incubadora.

Passadas as 24 horas, as lagartas foram pesadas novamente. Foi feita avaliação de área foliar das folhas. Cada lagarta após a pesagem foi transferida para copos individuais contendo dieta artificial, que foram colocados na câmara incubadora aclimatada em 27°C. As lagartas foram repesadas após 3 dias e 7 dias. Realizadas as três pesagens, as lagartas foram observadas diariamente até a morte, avaliando-se o estágio de desenvolvimento. Os insetos que chegaram à fase adulta foram colocados em gaiolas individuais montadas com papel filtro em forma de tubo, fechado por uma placa de Petri em ambos os lados. O cálculo para a porcentagem de redução do ganho de peso foi realizado segundo metodologia descrita por Halder *et al.* (2012), utilizando a Equação 1.

$\% \text{ Redução no ganho de peso} = \frac{\text{Ganho de peso de larvas do controle} - \text{Ganho de peso de larvas do tratamento}}{\text{Ganho de peso de larvas do controle}} \times 100$

Equação (1) Ganho de peso de larvas do controle



3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1, encontra-se a medida de vida e porcentagem de lagartas mortas ao longo de 80 dias. Não houve diferença significativa entre média de vida (dias) e mortalidade (%) de lagartas de *H. armigera* alimentadas com folhas contendo o inibidor de proteases berenil e lagartas do tratamento controle, pelo teste M&M.

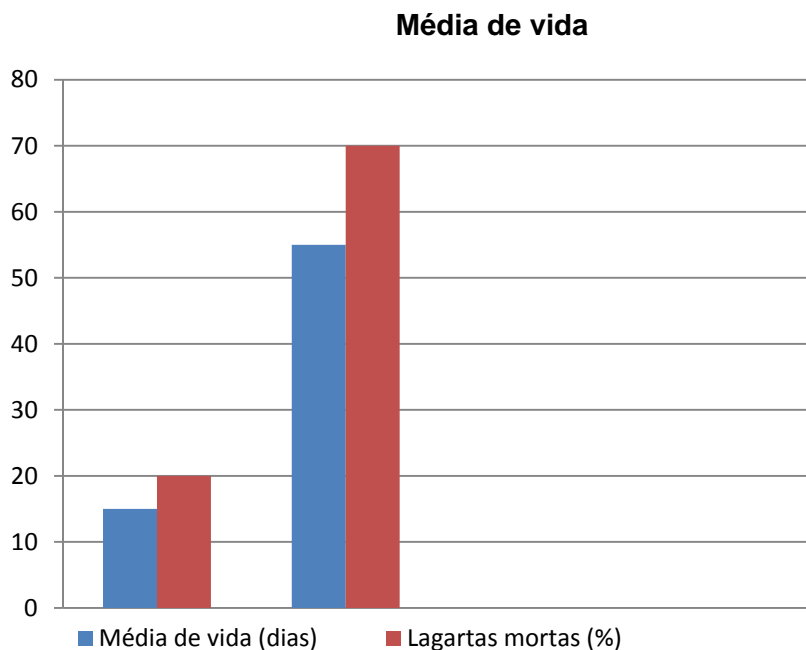


Figura 1. Neste gráfico em porcentagem a média de vida (dias) e porcentagem de lagartas mortas após ingestão de solução 12% Berenil e ingestão da solução controle, sem o inibidor de proteases.

Marinho-Prado *et al.* (2011) observaram o efeito de berenil oferecido sobre folhas de eucalipto a lagartas de *Thyrinteina arnobia*. Nesse trabalho verificou-se que o inibidor de proteases causou aumento na mortalidade de insetos, aumentou o tempo de desenvolvimento do inseto e reduziu a taxa intrínseca de crescimento da população quando administrada a dose de 0,12% de berenil em solução sobre folhas. No presente trabalho o berenil não causou aumento de mortalidade e nem alteração no tempo de desenvolvimento dos insetos, entretanto, aqui o inibidor de proteases foi oferecido às lagartas por apenas 24 horas e no trabalho citado com lagartas de *T. arnobia* o berenil foi oferecido às lagartas diariamente até a morte das mesmas.

Em relação ao peso de lagartas, aquelas que ingeriram berenil tiveram redução no ganho de peso (Figura 2). Lagartas que ingeriram folhas contendo o inibidor de proteases tiveram redução no ganho de peso de 56,39% em relação às lagartas do tratamento controle. Três e sete



dias depois, as lagartas que ingeriram berenil tiveram menor ganho de peso, 44,52% e 30,33%, respectivamente, em relação às aquelas que não ingeriram o inibidor.

Redução no ganho de peso

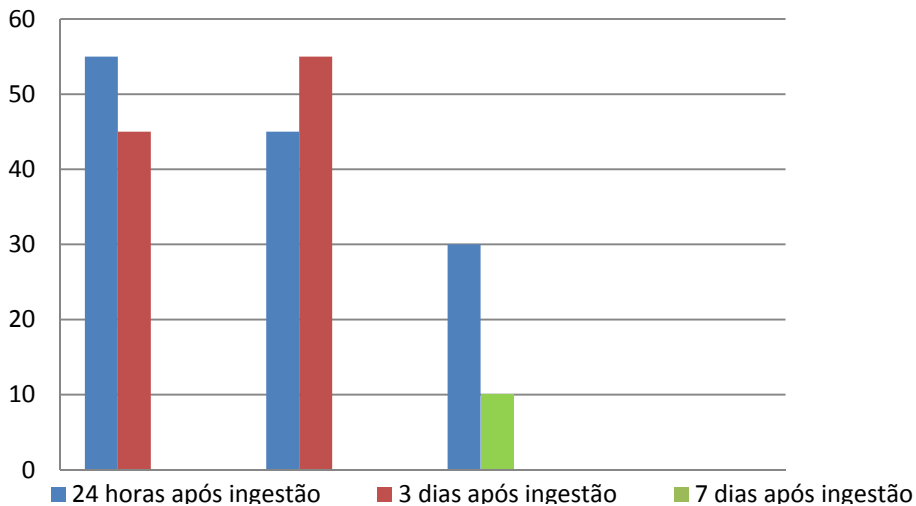


Figura 2. Redução no ganho de peso (%) de lagartas que ingeriram folhas de soja contendo berenil em relação às aquelas do tratamento controle, sem o inibidor de proteases.

Tais resultados podem ser devidos à atuação dos inibidores de proteases os quais atuam no intestino dos herbívoros, inibindo a ação das enzimas proteases sobre as proteínas provindas da alimentação, podendo resultar no retardamento do crescimento e reprodução desses insetos e, conseqüentemente, na sua morte (LAWRENCE & KOUNDAL, 2002).

Para avaliar o comportamento de lagartas, o inibidor de proteases foi testado quanto ao seu efeito sobre o consumo foliar. A área foliar das folhas foi medida antes e após 24h de consumo. Os resultados demonstraram uma ação de deterrência do inibidor de proteases berenil, pois neste tratamento o consumo de folhas foi menor em relação ao controle pelo teste M&M (Mann-Whitney). (Figura 3).

Como forma de adaptar-se ao efeito negativo dos inibidores de proteases ao seu desenvolvimento, o inseto pode aumentar o consumo de folhas. Tal efeito de alimentação compensatória foi observado em lagartas de *Anticarsia gemmatalis* quando alimentadas com dieta contendo o inibidor de proteases benzamidina (PILON *et al.*, 2006). A Benzamidina ocupa somente o centro catalítico de um sub-sítio da enzima tripsina (OLIVEIRA *et al.*, 1993). Berenil é uma bis-benzamidina e ocupa dois sub-sítios do centro catalítico das tripsinas, o que pode aumentar sua eficiência na inibição enzimática. Além disso, ela se liga também ao sítio secundário da enzima (OLIVEIRA *et al.*, 1993).



Área foliar consumida

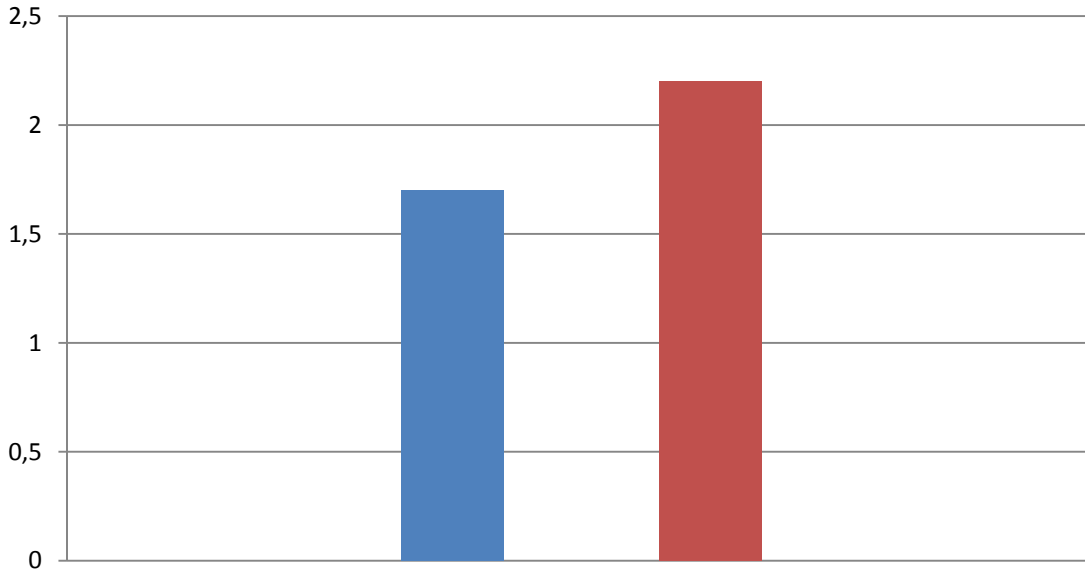


Figura 3. Área foliar consumida (mm) por lagartas de folhas contendo Berenil e de folhas sem o inibidor de proteases.

Os resultados indicam que as moléculas de Berenil podem ter se ligado às enzimas de proteases no intestino das lagartas de *H. armigera* impedindo a ação proteolítica dessas enzimas e, conseqüentemente, reduzido o ganho de peso dos insetos sem, no entanto, ter aumentado o consumo de folhas. Ao contrário, a presença de berenil nas folhas de soja provocou redução no consumo das *mesmas* como também foi observado ao oferecer folhas de eucalipto contendo berenil a lagartas de *T. arnobia* (MARINHO-PRADO *et al.* 2011).

4 CONCLUSÃO

O Berenil é potencialmente útil na defesa de plantas contra *Helicoverpa armigera*.

5 AGRADECIMENTOS

À Pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente Jeanne Scardini Marinho Prado, pela orientação e dedicação durante a Iniciação Científica. Ao CNPq pela bolsa concedida. À Embrapa Meio Ambiente pela realização deste projeto. Ao CIIC Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica pela oportunidade de divulgar este trabalho.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, A.A. Induced response to herbivory and increased plant performance. **Science**, v. 279, p. 12011202, 1998.



9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015
10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo

ÁVILA, C. J.; VIVAN, L. M.; TOMQUELSKI, G. V. **Ocorrência, aspectos biológicos, danos e estratégias de manejo de *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) e nos sistemas de produção agrícolas.** Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2013. Embrapa Agropecuária Oeste, Circular Técnica, 23.

BROADWAY, R.M. & DUFFEY, S.S. The effect of plant protein quality on insect digestive physiology and the toxicity of plant proteinase inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, v.34, p 1111-1117, 1988.

CZEPAK, C. ***Helicoverpa armigera*: ocorrência, bioecologia, sintomas de ataque, prejuízos e estratégias de manejo em cultivos agrícolas no Estado de Goiás – Disponível em – <http://www.infobibos.com/pragasesoticas/palestras/Cecilia.pdf>. Acesso em: 18 jun. 2015.**

CZEPAK, C.; ALBERNAZ, K. C.; VIVAN, L. M.; GUIMARÃES, H. O.; CARVALHAIS, T. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 43, n. 1, p. 110-113, 2013.

HALDER, J.; SRIVASTAVA, C.; DHINGRA, S.; DUREJA, P. Effect of essential oils on feeding, survival, growth and development of third instar larvae of *Helicoverpa armigera* Hubner. **The National Academy of Science Letters**, v. 35, n. 4, p. 271-276.

LAWRENCE, P.K. KOUNDAL. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 93-109, 2002.

MARINHO-PRADO, J. S.; LOURENÇÃO, A. L.; OLIVEIRA, J. A.; GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, M. G. A. Survival and feeding avoidance of the eucalyptus defoliator *Thyrinteina arnobia* exposed to the proteinase inhibitor berenil. **Journal of Applied Entomology**, v. 135, p. 763-770, 2011.

MARINHO-PRADO, JS; LOURENÇÃO, AL; GUEDES, RNC; PALLINI, A; OLIVEIRA, JA; OLIVEIRA, MGA. Enzymatic Response of the Eucalypt Defoliator *Thyrinteina arnobia* (Stoll) (Lepidoptera: Geometridae) to a Bis-Benzamidine Proteinase Inhibitor. **Neotropical Entomology**, v. 1, p. 1-6, 2012.

OLIVEIRA, M.G.A., ROGANA, E., ROSA, J.C., REINHOLD, B.B., ANDRADE, M.H., GREENE, L.J., MARESGUIA, M. Tyrosine 151 is part of the substrate activation binding site. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 26893-26903, 1993.

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

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

VILA, L., QUILIS, J., MEYNARD, D., BREITLER, J.C., MARFÀ, V., MURILLO, I., VASSAL, J.M., MESSEGUER, J., GUIDERDONI, E., SEGUNDO, B.S. 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**, v. 3, p. 187-202, 2005.

VILELA, M.; MENDES, S. M.; VALICENTE, F. H.; CARVALHO, S. S. S.; SANTOS, A. E.; SANTOS, C. A.; ARAÚJO, O. G.; BARBOSA, T. A. N.; CARVALHO, E. A. R.; COSTA, V. H. D. **Metodologia para criação e manutenção de *Helicoverpa armigera* em laboratório.** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2014. Embrapa Milho e Sorgo, Circular Técnica, 203