

THAYARA HELLEN MALTEZ FERREIRA

**RESPOSTA DAS ENZIMAS DIGESTIVAS DE PERCEVEJO-  
MARRON *Euschistus heros* NA INTERAÇÃO COM  
CULTIVARES RESISTENTE E SUSCEPTÍVEL DE SOJA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de Magister Scientiae.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2017

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

T

F383r  
2017  
Ferreira, Thayara Hellen Maltez, 1990-  
Resposta das enzimas digestivas de Percevejo-Marrom  
*Euschistus heros* na interação com cultivares resistente e  
susceptível de soja / Thayara Hellen Maltez Ferreira. – Viçosa,  
MG, 2017.  
x, 41f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Maria Goreti de Almeida Oliveira.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Relação inseto-planta. 2. Percevejo (Inseto) - Glândulas  
salivares. 3. *Euschistus heros*. 4. Soja. 5. Bioquímica.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica  
e Biologia Molecular. Programa de Pós-graduação em  
Bioquímica Aplicada. II. Título.

CDD 22 ed. 632.3

THAYARA HELLEN MALTEZ FERREIRA

**RESPOSTA DAS ENZIMAS DIGESTIVAS DE PERCEVEJO-MARROM  
Euschistus heros NA INTERAÇÃO COM CULTIVARES RESISTENTE E  
SUSCEPTÍVEL DE SOJA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de Magister Scientiae.

APROVADA: 24 de fevereiro de 2017.

---

Adriana Maria Patarroyo Vargas

---

Carolina Rocha da Silva

---

Gláucia Cordeiro  
(Coorientadora)

---

Maximiller Dal-Bianco Lamas Costa

---

Maria Goreti de Almeida Oliveira  
(Orientadora)

Dedico aos meus amados pais, avós, minha irmã Thatiane, meu cunhado Allan e minha sobrinha Yasmim. Por fim, aos meus queridos e estimados professores Poliana Maia, Helder Canto e Eduardo França, que mesmo distantes me incentivaram.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela força para superar todos os obstáculos, tive várias provações, bem como muitas graças, muito obrigada Deus.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela oportunidade de realizar o curso de mestrado.

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

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Interações Planta-Praga (INCT-IPP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro durante o trabalho.

À minha orientadora Goreti, por me aceitar de braços abertos em um momento ímpar da minha vida acadêmica, obrigada pela confiança e pelo conhecimento compartilhado, assim como pela bondade e paz que transmite.

Aos meus coorientadores Gláucia, Camila e Felipe, que foram, sem dúvida, imprescindíveis para concretizar esta dissertação. Equipe de grande competência. Em especial a Gláucia, pelas inúmeras vezes que me socorreu, me ajudou e esteve comigo em todos os momentos do trabalho, muitíssimo obrigada por tudo e pela amizade inestimável.

À minha amiga e eterna orientadora Poliana Maia pelo incentivo, carinho e conselhos nas horas que mais precisei, suas palavras muitas vezes me enchiam de alegria, relia sempre para me animar. Desde a graduação um anjo no meu caminho, muito obrigada por acreditar em mim até mesmo quando eu estava descrente de tudo.

Ao amigo Helder Canto Resende, suas palavras de apoio serão sempre lembradas e colocadas em práticas, obrigada pelo exemplo de professor que é e pela confiança.

Aos amigos Newton e Andreia pela companhia e constante contribuição por dias melhores no decorrer da minha jornada, pela diversão garantida que é estar na presença de vocês.

Ao Eduardo França pela atenção e conversas sobre os momentos complicados pelos quais passei e pelos mais diversos conselhos, saiba que é um amigo estimado.

Aos meus amados pais Solange e José, a minha irmã Thatiane, meu cunhado Allan e minha sobrinha Yasmim, obrigada pelo carinho, por acreditarem no meu potencial e pelos momentos de alegria juntos. Mãe e pai esse título é para vocês, foram a minha força para

concluir. À vó Terezinha e vô Maltez, por estarem sempre comigo, e muito obrigada vó pelas rezas diárias, pode ter certeza que me deram muita força para não desistir. Infelizmente Deus levou a senhora antes mesmo de me ver concluir mais essa etapa.

A todos da Família Ferreira e Família Maltez, em destaque aos tios Adilson, Vilma, Valéria, Carlos Antônio, Roberto Garcia e Shirlei, obrigada pelo carinho, pelo incentivo de sempre e também ao tio Carlos Alberto, pois tenho certeza que, onde esteja aí no céu, sempre torceu muito por mim.

Aos meus familiares, em especial meus primos Daniel, Wilton e Sandra, que se fizeram presentes em mensagens diárias. Não sabem a alegria que tinha em ter contato com vocês, me deram muita força para lutar cada dia mais.

Aos meus queridos amigos, como vocês mesmo dizem não importa a distância estamos sempre juntos, obrigada pelas vibrações positivas Day, Lalazinha, Carol, Jeje, Manda, Bárbara, Layla, Fimo, Gu, Fê, Cris, Marcos, Thimar, Mary, Mimi, Jês, Léo, Ingridzinha e Dri.

Às professoras Ana Amélia, Flávia Toussaint, Heloísa Antônia, Jacqueline Leite, Valdivia Borges, Estefânia Cordeiro, pelo constante incentivo e pela credibilidade.

Aos amigos/vizinhos de João Monlevade, obrigada pelo carinho e pelas rezas. Vocês são da família. Amo vocês!

Aos amigos que conheci em Viçosa, Fê, Laís, Luís, Murillo, Gabi e Jana vocês são de suma importância. Muito obrigada pela amizade, pelas mais diversas ajudas e pela alegria nos momentos compartilhados. Fê e Laís, muito obrigada por cada momento juntas, desde as saídas extrovertidas até cuidar dos insetos. Adoro muito vocês!

Ao Thiago Dutra e a Lilian Fialho, que me deram dicas importantes que contribuíram para os testes. Obrigada por serem tão prestativos.

À Be Medeiros, pelos vários momentos de alegria e distração, obrigada pela amizade.

À Ju Fialho, uma pessoa sensacional que tive o prazer em conhecer em Viçosa, obrigada pelas conversas e “cias”, amigas “forever”.

À minha amiga e irmã Juju, que fez os meus dias mais felizes, obrigada pela alegria, pelo apoio e pelo companheirismo.

Aos anjos que conheci no decorrer da parte experimental do trabalho, esses foram vários dos mais diversos departamentos, que tive a honra de conhecer. Aprendizado garantido que foi compartilhado, muito obrigada. Em especial, ao Sr. Cupertino, sem palavras para

agradecer cada aprendizado prático, que não há livro e nem artigo, que me ensine com tamanho zelo e cuidado, um pai que arrumei no decorrer da jornada.

À Honorina e Assis, casal nota mil, que me ajudou muitas vezes, muito obrigada pela disposição e desculpa o incomodo.

Aos meus queridos e eficientes estagiários, Camila e Marcos foi uma honra ter pessoas tão competentes e animadas trabalhando comigo. Obrigada pela praticidade de vocês: não têm ideia do quanto agilizaram minha vida.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, em especial ao Eduardo Monteiro, pelas diversas vezes nas quais desesperadamente, antes mesmo de chegar a Viçosa, o enchi de perguntas, obrigada pelos esclarecimentos e atenção. Ao Marco pela disposição sempre que precisava, obrigada.

Aos laboratórios aos quais tive acesso e onde pude realizar partes do meu experimento, bem como aos professores responsáveis. Ao Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos, à professora Maria Goreti; ao Laboratório de Análises Bioquímicas, ao professor Sebastião Rezende; ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Agentes Infecciosos e Parasitários, ao professor Cláudio Mafra; ao Laboratório de Ultraestrutura Celular e ao professor José Eduardo Serrão.

Ao professor Tiago Antônio de Oliveira Mendes, pelos esclarecimentos na informática, assim como pelo uso do equipamento do laboratório do professor Cláudio Mafra.

Às mais diversas casas de vegetação em que plantei, obrigada por cederem o espaço, ao Newton, Maximiller e Felipe.

À Mary e à Universidade do Estado do Mato Grosso (UNEMAT) por fornecer os primeiros ovos para iniciar a criação de *Euschistus heros*.

À Jamile pela colaboração e ensinamento no processo de retirada das glândulas, bem como na dissecação de *Euschistus heros*: sem você não teria conseguido dissecar tantos insetos, muito obrigada.

Ao André Luiz Lourenção e ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), pelo fornecimento das sementes de soja. Muito obrigada, pela disposição e pela preocupação com o cultivo das sementes. Custei, mas consegui, hehe.

Aos colegas de laboratório, em especial, Juan, Manuel, Yaremis, Verônica e Neilier, por me socorrerem nos meus dias de desespero. À Roberta, meu muito obrigada pelas diversas contribuições nas padronizações bioquímicas das análises.

À Carolina Rocha da Silva pela contribuição no desenvolvimento da escrita e nas vezes que precisei no decorrer do experimento.

Ao Renato Rosado, pela contribuição no delineamento estatístico do trabalho, bem como nos vários dias dispostos a me explicar os dados.

Ao Cristiano, pela ajuda na estatística e confecção dos gráficos.

Por fim, agradeço a UFV Campus Florestal que me proporcionou uma excelente base de conhecimento e profissionalismo durante a graduação, o que permitiu ingressar e formalizar o sonho de ser mestre em Bioquímica Aplicada. Muito obrigada!

## BIOGRAFIA

Thayara Hellen Maltez Ferreira, filha de José Joaquim Ferreira e Solange Aparecida Maltez Ferreira, nasceu no dia 21 de novembro de 1990 em João Monlevade –MG, Brasil.

Em 2010, ingressou no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa Campus Florestal, Minas Gerais, concluindo no segundo semestre de 2014 e adquirindo o diploma em 5 de fevereiro de 2015.

Em março de 2015 ingressou no programa de Bioquímica Aplicada na Universidade Federal de Viçosa, adquirindo o título de mestre em 24 de fevereiro de 2017.

“Sou apenas um caminhante  
À procura de si mesmo.” Augusto Cury

*“Não há saber mais ou saber menos: Há saberes diferentes. ”*

Paulo Freire

## SUMÁRIO

RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	x
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1. Glycine max.....	3
2.2. Euschistus heros .....	5
2.3. Interação inseto-planta: relação soja vs percevejo .....	6
2.4. Enzimas digestivas .....	7
2.4.1. Cisteíno proteases.....	8
2.4.2. Amilase.....	9
2.4.3. Lipase .....	10
3.OBJETIVO .....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
4.1. Criação de Euschistus heros.....	12
4.2. Cultivo da soja.....	12
4.3. Delineamento experimental .....	13
4.4. Análises bioquímicas em Euschistus heros .....	14
4.4.1. Extração do intestino médio e preparo do extrato bruto .....	14
4.4.2. Extração das glândulas salivares e preparo do extrato bruto.....	14
4.4.3. Determinação da concentração de proteína .....	15
4.4.4. Proteases totais.....	15
4.4.5. Cisteíno proteases.....	15
4.4.6. Amilase.....	16
4.4.7. Lipase .....	16
4.5. Análise estatística .....	17
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
5.2. Análises no intestino.....	18
5.2.1. Proteases totais.....	18
5.2.2. Cisteíno proteases.....	21
5.2.3. Amilase.....	22
5.2.4. Lipase .....	23
5.3. Análises nas glândulas salivares.....	25
5.3.1. Proteases totais.....	25
5.3.2. Cisteíno proteases.....	26
5.3.3. Amilase.....	26
5.3.4. Lipase .....	29
6. CONCLUSÕES .....	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

## RESUMO

FERREIRA, Thayara Hellen Maltez, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Resposta das enzimas digestivas de percevejo-marrom *Euschistus heros* na interação com cultivares resistente e susceptível de soja.** Orientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Coorientadores: Gláucia Cordeiro, Camila Rocha da Silva e Felipe Lopes da Silva.

A grande extensão de área com cultura de soja intensificou a ocorrência de diversas pragas, dentre elas, o percevejo-marrom, *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Pentatomidae). Os danos desta praga vêm se tornando cada vez mais expressivos, devido ao seu aumento populacional, manejo inadequado e resistência a inseticidas, o que resulta em perda de produtividade. As plantas apresentam mecanismos de defesa contra os insetos e, por sua vez, estes tentam burlar estas defesas. Estudos sobre a interação inseto/planta têm sido realizados analisando a via de defesa da planta e/ou enzimas digestivas das pragas. Entretanto, não há relatos sobre enzimas digestivas presentes no intestino e nas glândulas salivares do percevejo-marrom após interação com a soja, ao longo do tempo. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o perfil das enzimas presentes no intestino médio e nas glândulas salivares após serem alimentados com as cultivares IAC 24 (resistente) e IAC Foscarin 31 (susceptível). Sendo este o início dos estudos em relação ao controle desta praga com base em aspectos bioquímicos. Plantas, no estágio R5, foram infestadas com machos do percevejo. As avaliações foram realizadas em diferentes tempos de alimentação (0, 24, 48, 72 e 96 horas). Após cada tempo, retirou-se os intestinos e as glândulas salivares. As atividades das enzimas proteolíticas, amilase e lipase, foram realizadas de acordo com protocolos específicos. Tanto no intestino como nas glândulas salivares não foi detectada atividade de cisteíno proteases. No intestino médio, a atividade de proteases totais apresentou diferença para tempo, cultivar e interação cultivar x tempo. A amilase foi diferente somente para o tempo e lipase diferiu no tempo e na interação. Nas glândulas salivares, a atividade de proteases totais apenas diferiu em relação às cultivares analisadas. A amilase mostrou significância tanto para o tempo quanto para a interação e lipase foi significativa para as três fontes de variações avaliadas. Assim, observou-se o comportamento das enzimas responsivo a alimentação com os distintos cultivares. Estudos mais aprofundados são necessários para entender o porquê das oscilações registradas nas condições analisadas.

## ABSTRACT

FERREIRA, Thayara Hellen Maltez, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Digestive enzymes response of the Brown Stink Bug *Euschistus heros* in the interaction with resistant and susceptible soybean crops.** Adviser: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-advisers: Gláucia Cordeiro, Camila Rocha da Silva and Felipe Lopes da Silva.

Great extension of soybean crop intensified the occurrence of several pests, including the brown stink bug *Euschistus heros*, which is considered one of the main soybean pests. Pest damage has become increasingly significant due to its population increase, inadequate management and resistance to insecticides, resulting in soybean productivity losses. Plants have defense mechanisms against insects, and these latter in turn try to cheat these defenses. Plant-insect interaction studies have been performed by analyzing plants defense-signaling pathways and/or pest's digestive enzymes. However, digestive enzymes present in the gut and salivary glands of the stink bug after his interaction with soybeans over the time has not been reported. Thus, the aim of this study was to assess the enzymatic profile present in the midgut and salivary glands of the stink bug after feeding with IAC 24 (resistant) and IAC Foscarin 31 (susceptible) soybean crop. This being the beginning of the studies in relation to the control of this pest based on biochemical aspects. Plants at the R5 stage were infected with male stink bug. Assessments were performed at different feeding times (0, 24, 48, 72 and 96 hours). After each time, midgut and salivary glands were removed. The proteolytic enzyme assays, amylase and lipase were performed according to specific protocols. Cysteine proteases activities were not detected in the midgut and salivary glands. In the midgut, total proteases activity presented difference for time, cultivar and cultivar x time interaction. Amylase activity was different only in time, meanwhile lipase differed in time and interaction. In the salivary glands, total proteases activity differed only in relation to the cultivars analyzed. Amylase activity showed significance for time and in interaction, while lipase was significant for the three sources of variations assessed. Thus, the behavior of the enzymes responsive to feeding with the different cultivars was observed. Further studies are needed to understand why the oscillations recorded under the conditions analyzed.

## 1. INTRODUÇÃO

A soja, *Glycine max* (L.) Merrill, é uma das principais culturas de oleaginosas do mundo (LIU, 2006), sendo considerada o mais importante produto no agronegócio brasileiro (SILVA et al., 2010). De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), o Brasil deve produzir na safra 2016/2017 em torno de 105,56 milhões de toneladas de grãos de soja, novo recorde e 10,6% superior à temporada 2015/2016 (CONAB, 2017).

O grão da soja pode ser utilizado na alimentação humana e de animais, e na produção de biocombustível. A produtividade das sementes pode ser afetada por diversos fatores bióticos (RIBEIRO & COSTA, 2000), dentre eles, temos as lagartas desfolhadoras, as moscas-brancas e os percevejos (SOUZA et al., 2013). Segundo Saran [200-] nos últimos anos houve mudanças em relação às pragas no cultivo da soja, onde os sugadores, como os percevejos, vêm se destacando em relação às mastigadoras (lagartas).

Dentre os percevejos, os de maior importância pertencem à família Pentatomidae que sugam os ramos, hastes, vagens em formação e os grãos, injetando toxinas e inoculando fungos, que causam manchas (Saran, 200-). As espécies, desta família, *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758), *Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837) e *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) formam o complexo de percevejos da soja predominante no Brasil (GUEDES et al., 2012). As flutuações da ocorrência destas espécies variam em função do ano, do local e das plantas hospedeiras (CORRÊA-FERREIRA et al., 2009).

Os danos dos percevejos têm se tornado cada vez mais graves devido a ocorrência do seu aumento populacional, monitoramento ineficiente, e aplicações indiscriminadas de agrotóxicos, o que resulta em um desequilíbrio ambiental e na presença de populações mais resistentes (CORRÊA-FERREIRA & PANIZZI, 1999).

Entre as espécies do complexo dos percevejos, *E. heros* é considerada a mais abundante na cultura da soja. Esta praga ocorre de novembro até abril, com três gerações (CORRÊA-FERREIRA et al., 2009; SOUZA, 2013). *Euschistus heros*, conhecido como percevejo-marrom, se alimenta preferencialmente das vagens, sendo responsável pela redução do peso e qualidade das sementes (CORRÊA-FERREIRA & AZEVEDO, 2002; EMBRAPA SOJA, 2003; DEPIERI & PANIZZI, 2011; SILVA et al., 2012). Medidas de controle deste percevejo, que buscam evitar sua incidência, bem

como seu crescimento populacional, devem ser desenvolvidas, devido os prejuízos que causam e o uso excessivo de inseticida (SALUSO et al., 2011).

A digestão é a quebra de moléculas alimentares a partir de enzimas em porções menores para absorção das células do tecido intestinal. Estudos referentes ao intestino médio foram estimulados, devido o mesmo ser considerado uma interface grande e desprotegida em relação ao meio externo. Deste modo, o conhecimento da função intestinal é importante para desenvolver métodos de controle, como por exemplo o uso de transgênicos para controle de insetos fitófagos (TERRA & FERREIRA, 2012).

Os percevejos também apresentam uma digestão denominada de pré-oral (COHEN, 1995), pois ao inserirem seu estilete injetam saliva contendo enzimas digestivas, as quais hidrolisam as moléculas, e com isso conseguem adquirir os nutrientes adequados para o seu desenvolvimento (MITCHELL, 2004). Entretanto, este tipo de digestão é importante para as espécies que se alimentam de sementes ou presas, mas não para as que sugam a seiva (MEHRABADI et al., 2014). No caso dos percevejos que consomem semente, esta digestão é relevante devido a necessidade de perfurara cutícula e contornar os possíveis defensivos químicos presentes neste órgão, tais como os inibidores de proteases (MEHRABADI et al., 2012).

A coevolução entre planta e inseto permitiu o desenvolvimento de um sistema sofisticado de defesa. Assim, as plantas são capazes de reconhecer moléculas não próprias e/ou sinais de células danificadas, desencadeando uma resposta contra as injúrias causadas pelos herbívoros. Por outro lado, os insetos ativam uma resposta imune contra as defesas das plantas (HOWE & JANDER, 2008; VERHAGE et al., 2010).

Pesquisas sobre interação inseto/planta analisando a via de defesa da planta e/ou enzimas digestivas contidas no intestino de diversas espécies já foram desenvolvidas (PILON, 2004 e 2008; PILON et al., 2006; MENDONÇA et al., 2009; NASERI et al., 2010; CORDEIRO, 2011; FIALHO et al., 2012; PAIXÃO et al., 2013; NAMIN et al., 2014; CABRERA, 2015; FAUSTINO, 2015; SILVA, 2015; CHAVÉZ, 2016; ROCHA, 2016; NASARI et al., 2016). Estudos sobre as enzimas digestivas presentes nas glândulas salivares dos heterópteros também já foram descritas (COLEBATCH et al., 2001; ZENG & CHOEN, 2002; OLIVEIRA, 2004; OLIVEIRA et al., 2006; AZEVEDO et al., 2007; BIGHAM & HOSSEININAVEH, 2010; FIALHO et al., 2010; SILVA et al., 2012; PEIFFER & FELTON, 2014).

Diante do exposto, até o momento, não há relatos sobre as enzimas digestivas do intestino de *E. heros* após alimentação com diferentes cultivares de soja. Em relação às enzimas contidas nas glândulas salivares, apenas Silva et al. (2012) quantificaram a atividade de amilase no percevejo-marrom. Entretanto eles não variaram a cultivar e nem estudaram outras enzimas digestivas. Conhecer o perfil dessas enzimas podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias de controle do *E. heros*, como, por exemplo, a inibição. Desta forma, a presente pesquisa teve como objetivo analisar a interação soja versus percevejo-marrom a partir do perfil da atividade das enzimas digestivas do intestino e das glândulas salivares desta praga após serem alimentadas com cultivares resistente e susceptível. Esta interação é determinante para estudos envolvendo defesa da planta a insetos-praga.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Glycine max**

*Glycine max* é uma planta herbácea pertencente à família Fabaceae, subfamília Faboideae, tribo Phaseoleae, subtribo Glycininae (JUDD et al., 2009), sendo uma das oleaginosas mais cultivadas (LIU, 2006). O seu grão é rico em proteínas (40%) e óleo (20%) (SEDIYAMA et al., 2009).

A cultura de soja é nativa da região da Manchúria, Leste da Ásia (HYMOWITZ, 1970), que no final do século XV e início do próximo chegou no Ocidente (HARLAN, 1975). Em virtude do aumento de sua importância econômica, bem como do desenvolvimento do comércio, esta leguminosa foi introduzida no Sul da China, Coreia, Japão e Sudeste da Ásia (SEDIYAMA et al., 2015).

No século XIX, em 1882, a soja foi introduzida no Brasil pelos Estados Unidos, mais precisamente na Bahia (SEDIYAMA et al., 2009). Apenas em 1908 ela foi levada para São Paulo por imigrantes japoneses (EMBRAPA, 1974; SEDIYAMA et al., 1985). O Rio Grande do Sul foi o local no qual obteve melhor adaptabilidade, em função das semelhanças climáticas da região de origem (SANTOS, 1988). Além da aclimação referente a esta região, outros fatores influenciaram a expansão da sojicultura, tais como, a topografia plana dos solos do cerrado, o regime pluviométrico favorável e o estabelecimento de parque industrial (TECNOLOGIAS DE PRODUÇÃO DE SOJA,

2005). A partir de 1950 houve a expansão da soja para as regiões Sudeste, Norte e Nordeste (SEDIYAMA et al., 2009).

No Brasil, a safra 2015/2016 foi responsável por 59,6% de área cultivada e em fev/2017 houve um aumento de 1,6% (CONAB, 2017). Espera-se um futuro promissor para a produção da soja, já que esta apresenta uma grande importância econômica, devido a suas diversas utilidades, tais como, na alimentação humana e animal, na produção de biodiesel, desinfetante, lubrificante e adubo verde (SEDIYAMA et al., 2015; SEDIYAMA et al., 2009).

A grande extensão de área da sojicultura intensificou a presença de diversas pragas; dentre elas temos a lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818); os percevejos, *E. heros* e *N. viridula*; e os ácaros, *Mononychellus planki* (McGregor, 1950) e *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) (SOSA-GÓMEZ & OMOTO, 2013). Os insetos são considerados pragas quando reduzem a qualidade e o rendimento do produto final de uma determinada cultura (DEGRANDE & VIVAN, 2010).

Desde a época de sua introdução, a soja foi se destacando e com isso as instituições públicas implantaram programas de melhoramento genético, visando o desenvolvimento de cultivares adaptadas para as regiões brasileiras (VAL et al., 2014). De acordo com Rocha (2015), a tecnologia Bt não é a única estratégia disponível para o desenvolvimento de cultivares com resistência a insetos. Quando existem fontes de resistência adequadas torna-se possível o desenvolvimento de tais cultivares.

Entende-se por variedade resistente aquela que, devido a sua constituição genotípica, é menos danificada que outra (susceptível), sob as mesmas condições (PAINTER, 1968; ROSSETO, 1973; GULLAN & CRANSTON, 2007). O conceito de resistência é aplicado a partir da comparação de duas ou mais plantas, sendo, portanto considerada relativa (LARA, 1979; GULLAN & CRANSTON, 2007).

O Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) possui cultivares de soja com diferentes tipos de resistência (resistente ou susceptível) a diversas espécies de insetos-praga que podem afetar a cultura da soja, entre estas têm-se a IAC 24 e a IAC Foscarin 31. A variedade IAC 24 pertence ao grupo de maturação semiprecoce, com ciclo médio de 121 a 130 dias e o IAC Foscarin 31 é precoce, apresentando ciclo com até 120 dias (TECNOLOGIAS DE PRODUÇÃO DE SOJA, 2011).

Miranda et al. (2003) ao avaliarem a resistência de diferentes cultivares aos percevejos, verificaram que IAC 24 apresentou rendimento do grão superior às demais, sendo assim considerada uma variedade resistente. Rossetto et al. (1986) estudaram a

resistência de 35 variedades (resistentes e susceptíveis) aos percevejos utilizando como critérios a porcentagem de retenção de área foliar, o índice percentual de dano à vagem e a produtividade dos grãos e concluíram que a cultivar Paraná apresenta padrão de susceptibilidade e foi estatisticamente igual ao IAC Foscarin 31.

## **2.2. Euschistus heros**

O percevejo-marrom, *E. heros*, nativo da Região Neotropical, é considerado uma das mais importantes pragas da soja (PANIZZI & SLANSKY, 1985; CORRÊA-FERREIRA, 1999), sendo a principal espécie do complexo de percevejos praga do Brasil. Ele apresenta preferência por climas quentes e possui ampla distribuição e elevada densidade (CORRÊA-FERREIRA, 2009; GODOY et al., 2010).

*Euschistus heros* são hemimetábolos (ovo, ninfa e adultos), com fase ninfal contendo cinco instares (N1, N2, N3, N4 e N5). As ninfas recém-eclodidas têm hábito gregário, com coloração alaranjada e permanecem sobre os ovos até o segundo instar. As ninfas do terceiro ao quinto instar possuem cores variando de cinza a marrom (PANIZZI et al., 2012). Os adultos são marrom-escuro, com dois prolongamentos laterais do pronoto (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000).

As fêmeas depositam ovos amarelos em massas contendo de cinco a oito unidades (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000; PANIZZI et al., 2012). O período de eclosão é aproximadamente sete dias e o desenvolvimento de ovo a adulto é próximo a 38 dias (COSTA et al., 1998). Os adultos têm uma longevidade média de 116 dias (PANIZZI et al., 2012).

A forma mais prática para realizar a sexagem dos percevejos é através da sua morfologia genitália. Os machos apresentam uma placa única denominada pigóforo, enquanto as fêmeas possuem duas placas laterais (CORRÊA-FERREIRA & PANIZZI, 1999; BORGES et al., 2006).

Esta praga tem como hospedeiro primário a soja e encontra-se presente em diferentes estágios fenológicos da mesma. Entretanto, é no estágio de início de formação das vagens até a maturação dos grãos que esta planta apresenta maior sensibilidade. A partir do terceiro instar estes percevejos são capazes de causarem danos (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000).

Este inseto pode reduzir a produção e qualidade da semente através do seu hábito alimentar, sucção direta dos grãos da soja, e com isso causar danos irreversíveis à cultura (CORRÊA-FERREIRA & AZEVEDO, 2002; EMBRAPA SOJA, 2003;

DEPIERI & PANIZZI 2011; SILVA et al., 2012). O controle populacional desta praga tem sido realizado a partir de inseticidas sintéticos (BUENO et al., 2013), porém o seu uso indiscriminado pode resultar em uma seleção de percevejos resistentes, na redução dos inimigos naturais, na contaminação do meio ambiente e causar danos à saúde humana (SOSA-GÓMEZ & SILVA, 2010; BUENO et al., 2011; BELO et al., 2012).

### **2.3. Interação inseto-planta: relação soja vs percevejo**

As plantas e os insetos coexistem há cerca de 350 milhões de anos, datadas do Carbonífero, associação comprovada em registros fósseis. Entretanto, é no período do Cretáceo, cerca de 65 milhões de anos, com a disseminação das angiospermas que houve a principal diversificação dos insetos (GULLAN & CRANSTON, 2007). As interações entre eles podem ser benéficas para ambos, como no caso de insetos polinizadores e dispersores de sementes. Porém existem insetos que causam injúrias às plantas, resultando em uma interação negativa, como é o caso da herbivoria (MACHADO, 2009).

A alimentação dos percevejos fitófagos prejudica diretamente as vagens e as sementes, causando danos na qualidade e no rendimento das sementes (CORRÊA-FERREIRA & PANIZZI, 1999). Conforme Corrêa-Ferreira & Azevedo (2002), a injúria do percevejo prejudica o enchimento da vagem, reduz o vigor e viabilidade das sementes e serve de porta de entrada para patógenos. Degrande & Vivan (2010) destacam que a injúria de vagens em desenvolvimento leva a formação de vagens chocas, secas e/ou sem formação de grão e com isso as vagens secam e se tornam marrons.

A ocorrência dos percevejos na soja geralmente está relacionada com a presença das vagens, ou seja, do começo da frutificação (R3) até o ponto de acúmulo máximo de matéria seca no grão (R7). Porém, o período de maior sensibilidade compreende do final do desenvolvimento da vagem (R4) até o enchimento do grão (R5) (PANIZZI et al., 1979; EREJOMOVICH, 1980; CORRÊA-FERREIRA, 1999; GAZZONI, 1998; CORRÊA-FERREIRA et al., 2009). De acordo com Brier & Rogers (1991), o estágio R5 é considerado a fase mais crítica.

As plantas apresentam diferentes tipos de defesa. A defesa induzida pela herbivoria pode ser direta, de modo a atuar repelindo a praga, ou indireta, atraindo os inimigos naturais (DICKE & SABELIS, 1988; DE MORAES et al., 2001; KESSLER & BALDWIN, 2001; DUDAREVA et al., 2006).

Atuando no mecanismo de defesa das plantas contra as injúrias dos insetos, têm-se os inibidores de proteases, que são um grupo de proteínas amplamente estudado devido à função inibitória das enzimas digestivas (JONGSMA & BOLTER, 1997; MOSOLOV & PILON, 2004; VALUEVA, 2005; PAIXÃO et al., 2013; CHÁVEZ, 2016; PAIXÃO et al., 2016; ASHOURI et al., 2017). Ashouri et al. (2017) realizaram extração e purificação de inibidores de cisteína proteases de sementes de girassol e verificaram potencial desse inibidor para atuar em protease do intestino do besouro-da-batata, *Leptinotarsa decemlineata* (Say, 1824) (Chrysomelidae). Paixão et al. (2016) verificaram que a concentração de inibidores de proteases em cultivares de soja susceptível (IAC PL1) e resistentes (IAC 17, IAC 18, IAC 19 e IAC 24) injúriadas por *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Noctuidade) aumentou ao longo do tempo. Além destes estudos em relação aos inibidores das plantas estimulados pelos insetos, existem ainda aqueles onde há uma aplicação de inibidores sintéticos para avaliar o perfil das enzimas digestivas de diversas pragas (PILON, 2004; MARINHO et al., 2010; PAIXÃO et al., 2013; CHÁVEZ, 2016).

#### **2.4. Enzimas digestivas**

Segundo Terra & Ferreira (2012) no processo de digestão os alimentos passam por um conjunto de transformações físico-químicas para se converterem em compostos menores, hidrossolúveis e absorvíveis pelas células do intestino. Este processo é controlado por enzimas digestivas.

No século passado tiveram início os estudos sobre a bioquímica da digestão de insetos, contudo foram reduzidos na década de 40, com o aparecimento dos inseticidas químicos. O estímulo para novos estudos referentes à digestibilidade de insetos se dá pelo fato do intestino médio ter uma interface grande e relativamente desprotegida entre o inseto e o ambiente. Assim sendo, conhecer as funções do intestino torna-se importante para o desenvolvimento de novos métodos de controle de insetos (TERRA & FERREIRA, 2005).

O conhecimento da distribuição de enzimas salivares e ao longo do trato digestivo nos insetos permite deduzir a acessibilidade do inibidor às diferentes enzimas. Com isso, poder-se-á realizar uma seleção de variedades de plantas economicamente desejáveis e com capacidade de produzir inibidores de enzimas mais acessíveis e eficazes, promovendo maior resistência às pragas (DEPIERI, 2010).

Nos insetos as principais enzimas digestivas são as proteases, carboidrases e lipases, sendo as proteases o grupo mais caracterizado (MOREIRA, 2007). As proteases são responsáveis pela degradação de proteínas à aminoácidos (TERRA & FERREIRA, 1994). Elas são as principais enzimas hidrolíticas presentes no intestino dos insetos e são classificadas conforme o mecanismo de catálise. Quatro classes são reconhecidas pelo International Union of Biochemistry and Molecular Biology: as proteinases de serina (EC 3.4.21), as proteinases de cisteína (EC 3.4.22), proteinases de aspártico (EC 3.4.23) e metaloproteinases (EC 3.4.24) (FAN & WU, 2005; TERRA & FERREIRA, 2005).

As peptidases ou proteases podem ser divididas em endopeptidases (EC 3.4.21-24) e exopeptidases (EC 3.2.4.11-19) (BARRETT & MCDONALD, 1986; TERRA & FERREIRA, 1994). As endopeptidases atuam na clivagem de ligações internas de proteínas, enquanto que as exopeptidases catalisam as extremidades aminoterminais ou carboxiterminais das proteínas (SALVADORI, 2006).

#### **2.4.1. Cisteíno proteases**

As cisteíno proteases (EC 3.4.22) apresentam cisteína, histidina e aspartato no sítio ativo (TERRA & FERREIRA, 1994; TREMACOLDI, 2009) e são encontradas em eucariotos e procariotos (RAO et al.,1998). De uma maneira geral estas enzimas participam do processo digestivo dos insetos (TERRA & FERREIRA, 1994), podendo ainda ser encontradas em vários tecidos, o que sugere que desempenham outros papéis (MATSUMOTO et al., 1998).

Segundo Rao et al. (1998) cisteíno proteases possuem atividade enzimática máxima em pH neutro, entretanto, as proteases lisossomais, têm maior atividade em pH ácido. Para a ativação da enzima, utiliza-se o DTT (Ditioteitol) ou a Cisteína, e para a inativação o inibidor trans-epoxysuccinyl-l-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) (TERRA & FERREIRA, 2012).

Bigham & Hosseinaveh (2010) estudaram enzimas proteolíticas no intestino médio do percevejo *Brachynema germari* Kolenati (Pentatomidae). Na atividade de cisteíno proteases eles utilizarem os substratos z-RRpNA (benzyloxycarbonyl-Arg-Arg-p-nitroanilide) e z-FR-pNA (benzyloxycarbonyl-Phe-Arg-p-nitroanilide), verificando a existência das catepsina L e B, determinadas em pH 6 e 5, respectivamente. Com isso, concluíram que estas enzimas são importantes para a digestão do percevejo.

Fialho et al. (2012) observaram que atividade de catepsina L foi mais expressiva nas porções média e posterior do intestino, quando avaliaram a atividade desta enzima nas três regiões do intestino médio de *P. nigrispinus*.

Bigham & Hosseininaveh (2010) ao analisarem enzimas nas glândulas salivares do percevejo *B. germari*, não observaram atividade de cisteíno proteases (catepsina B e L) usando os ativadores L cisteína e ditioneitol, dessa forma estas enzimas apresentam um menor papel na digestão deste inseto. Por outro lado, Fialho et al. (2012) observaram a atividade de catepsina L em homogenato das glândulas salivares de *P. nigrispinus*.

#### **2.4.2. Amilase**

As glicosidases (EC 3.2) são classificadas conforme o substrato específico e podem ser separadas em dois grupos, as que clivam ligações internas de polissacarídeos e as que atuam na clivagem de oligossacarídeos e dissacarídeos. As do primeiro grupo são nomeadas conforme o substrato em que atuam, dentre elas temos: amilase, celulase, pectinase e quitinase. Já as do segundo grupo são designadas com base nos monossacarídeos, que doam o seu grupo redutor para a ligação glicosídica (TERRA & FERREIRA, 1994; 2012). No metabolismo de carboidratos, as  $\alpha$ -amilases atuam na digestão inicial e intermediária, já a digestão final das cadeias de glicogênio ocorre pelas  $\alpha$ -glicosidases (TERRA & FERREIRA, 2005).

As  $\alpha$ -amilases (EC 3.2.1.1) são catalisadoras de regiões internas, ou seja, endoenzimas, de ligações de  $\alpha$ -1,4 glucano, tais como, amido e glicogênio. O pH de melhor atividade varia conforme o táxon do inseto e têm pesos moleculares entre 48-60 kDa (TERRA & FERREIRA, 1994; TERRA & FERREIRA, 2005).

Mendonça et al. (2009) verificaram, através de teste qualitativo, a produção de amilase no intestino de *A. gemmatalis* alimentadas com dieta artificial e com folhas de soja. Em análises quantitativas verificaram que amilase têm diferença significativa nos três primeiros instares deste inseto, mostrando sua alteração pela dieta. As lagartas que consumiram dieta artificial apresentaram maior atividade. Assim, observaram que a dieta alimentar alterou o perfil desta enzima.

Naseri et al. (2010) constataram que a atividade de amilase de *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) (Noctuidae) foi maior na cultivar M4, que nas outras avaliadas. Entretanto, no geral, esta atividade foi semelhante em todas as cultivares. Sendo assim propôs que o conteúdo de carboidratos das cultivares são os mesmos.

Estudos como este são importantes para o controle de praga, com base na inibição das enzimas presentes no sistema digestivo de insetos.

No predador *P. nigrispinus*, Fialho (2010) observou expressão da atividade de amilase no intestino médio, tendo o seu pico na primeira hora de alimentação. Este autor e Oliveira et al. (2006) registraram atividade desta enzima em glândulas salivares deste percevejo.

Silva et al. (2012) encontraram maior atividade de amilase em *E. heros* do que no percevejo *Edessa meditabunda* (Fabr., 1974) (Pentatomidae), quando se alimentaram de soja. Este resultado foi explicado pela diferença da preferência alimentar destas espécies, uma sugadora de semente e a outra de haste.

### **2.4.3. Lipase**

Os lipídeos desempenham diversas funções tanto em insetos como em outros organismos. Eles podem constituir as estruturas celulares, atuar como hormônios e ser fonte de reserva energética. Além disso, são fundamentais em situações de alta demanda metabólica, como durante o vôo e na produção de ovos (ARRESE et al., 2001). Todavia o conhecimento sobre absorção e digestão nos insetos é considerado escasso (ZIBAEE & FAZELI-DINAN, 2012).

Os triglicerídeos são lipídeos de armazenamento, os quais são encontrados nos vegetais na forma de óleos e nos animais como gorduras (TERRA & FERREIRA, 2005). Estes são considerados a maior parte da gordura que os insetos consomem (NATION, 2008). As lipases secretadas do intestino médio liberam ácidos graxos e glicerol, sua atividade é aumentada com a atuação de surfactantes (TERRA & FERREIRA, 2005; GRILLO, 2007; TERRA & FERREIRA, 2012). Desta forma, as atuações de triacilglicerol lipases (EC 3.1.1.3) agem preferencialmente na hidrólise de ligações externas de triacilglicerol e somente na interfase água/lipídeo (GRILLO, 2007; TERRA & FERREIRA, 2012).

A caracterização das lipases é indispensável para encontrar inibidores de lipases. Os inibidores são responsáveis pela redução no crescimento, desenvolvimento e mortalidade em insetos, pois os ácidos graxos insaturados de cadeia longa são de suma importância como componentes dietéticos essenciais (DELKASH-ROUDSARI, 2014). Desta forma, este autor caracterizou a atividade de lipase do intestino médio de *Bacterocera oleae* Gmelin (Diptera: Tephritidae), encontrando que a porção ligada à membrana foi a que apresentou maior atividade e o melhor pH foi 4.

Lagartas de *A. gemmatalis*, que consumiram folhas de soja e dieta artificial, mostraram um pico de atividade de lipase, no intestino, entre os 4º e 5º instares e uma redução no 6º instar. Aquelas alimentadas com folhas apresentaram maior atividade, indicando que a dieta alimentar altera o perfil desta enzima (MENDONÇA et al., 2009).

Filietaz & Lopes (2010) estudaram caracterização e buscou evidenciar diferenças de especificidade das lipases em diferentes espécies de artrópodes. Sendo mostrado que a maioria dos artrópodes apresentaram lipases ativas em faixa de pH alcalino (7,0 – 9,0), massa molecular cerca de 50 kDa, têm pI 5,7 e 6,0. Por fim, foi possível evidenciar que estas enzimas mostraram especificidades distintas.

Lipases foram registradas nas glândulas salivares de percevejos que se alimentam de sementes, tais como, *Oncopeltus fasciatus* (Dallas) (Lygaeidae) e *Dysdercus fasciatus* Signoret (Pyrrhocoridae) (FEIR & BECK, 1961; KHAN & FORD, 1967).

Sorkhabi-Abdolmaleki & Zibae (2013) na pesquisa de enzimas digestivas no intestino médio de *Andrallus spinidens* (Fabricius, 1787) (Hemiptera: Pentatomidae) buscaram encontrar secretagogue de enzima digestiva, dentre elas a lipase. Verificou que a atividade de lipase aumentou na primeira hora de alimentação com um pico máximo em 12 horas. A morfologia observada após a alimentação indica que há ação do mecanismo de secretagogue, sendo regulada pela alimentação e digestão.

No predador *Brontocoris tabidus* (Signoret, 1863) (Heteroptera: Pentatomidae) o lóbulo posterior de suas glândulas salivares apresentou maior atividade de lipase que o anterior (AZEVEDO et al.; 2007). Em *P. nigrispinus* foi quantificada esta atividade em suas glândulas salivares de forma geral (OLIVEIRA et al.; 2006). No entanto, no percevejo fitófago *E. integriceps*, alimentado com grãos de trigo, não foi encontrada esta atividade em suas glândulas salivares sugerindo que essa não é uma enzima de ocorrência na digestão pré-oral desta praga. Além disso, a identificação de enzimas nas glândulas salivares permite obter uma compreensão das interações inseto-planta (MEHRABADI, 2014).

### **3.OBJETIVO**

Avaliar o perfil da atividade das enzimas digestivas do intestino médio e das glândulas salivares de *E. heros* após alimentação com cultivares de soja resistente e susceptível, visando contribuir com estudos de defesa de plantas à insetos-praga.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Criação de *Euschistus heros*

A criação de *E. heros* foi conduzida em uma sala com condições controladas (Temperatura: 18,3 a 27,5°C; Umidade Relativa do Ar: 61 a 75% e 14:10 h (L/E)), do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, semelhante à metodologia descrita por Borges et al. (2006). Os percevejos foram criados a partir de ovos fornecidos pelo Laboratório de Entomologia do Centro de Pesquisa, Estudos e Desenvolvimento Agro-ambientais (CPEDA) da Universidade do Estado do Mato Grosso (UNEMAT).

Os ovos foram mantidos em placas de Petri até as ninfas atingirem o segundo instar. Em seguida elas foram transferidas para potes plásticos (500 mL), contendo três grãos de amendoins (*Arachis hypogaea* (L.)), três sementes de girassol (*Helianthus annuus* (L.)), três sementes de soja (*Glycine max* (L.)) e uma vagem verde de feijão (*Phaseolus vulgaris* (L.)), para sua alimentação. Na tampa do pote foi feita uma abertura e colocado um pedaço de tecido organza, com o intuito de arejar o ambiente. Além disso, foi colocado um chumaço de algodão embebido com água destilada, sendo este, trocado e umedecido sempre que necessário. Os insetos adultos foram mantidos como as ninfas. A alimentação da criação foi trocada duas vezes por semana.

### 4.2. Cultivo da soja

As sementes da cultivar IAC 24 (resistente) e da IAC Foscarin 31 (susceptível) foram plantadas diretamente em vasos (2,5 L), 12 vasos para cada cultivar. Os vasos continham solo, areia e esterco, na proporção de 3:1:1, respectivamente. As sementes foram plantadas no final de agosto de 2016 e mantidas em casas de vegetação à temperatura variando de 22,1 a 35,1°C.

Antes da semeadura, as sementes foram tratadas com derosal, um fungicida sistêmico. Em cada vaso foi feita uma perfuração de aproximadamente três centímetros de profundidade e colocadas duas sementes. Após 20 dias, foi selecionada a planta mais vigorosa, deixando assim somente uma por vaso. As plantas foram conduzidas até chegarem no estágio fenológico R5 (FEHER & CAVINESS, 1977), momento no qual, foram instalados os experimentos.

A irrigação manual foi realizada conforme a necessidade da planta. Visando garantir plantas sem presença de pragas e/ou fungos, foi realizado controle fitossanitário do local e somente após ter passado o período de carência, os insetos foram colocados para interagirem com as plantas.

### **4.3. Delineamento experimental**

Para conhecer as possíveis alterações nas atividades das enzimas digestivas do intestino médio e das glândulas salivares do percevejo-marrom, foram instalados dois experimentos simultâneos com delineamento inteiramente casualizado (DIC). Utilizamos na forma fatorial 2x5, onde o primeiro fator foi a cultivar de soja (resistente e susceptível) e o segundo tempo de alimentação dos insetos (0, 24, 48, 72 e 96 horas). O tempo de interação soja versus percevejo-marrom foi definido de acordo com TIMBÓ et al. (2014).

Antes da instalação dos experimentos, adultos machos foram retirados da criação e permaneceram 24 horas sem alimentação (TIMBÓ et al., 2014). O tempo zero horas foi composto por parte destes insetos, ou seja, alimentados anteriormente pela dieta artificial e que foram privados de alimentação. Os demais insetos, que ficaram em jejum, foram distribuídos, em quantidades iguais, nas plantas resistentes e susceptíveis, onde permaneceram por até 96 horas.

Para cada tempo de interação inseto/planta (24, 48, 72, 96 horas) havia três vasos, que correspondiam as repetições. Em cada planta foram isoladas duas vagens (4<sup>o</sup> a 7<sup>o</sup> nós) com sacos de tecido organza e nove percevejos machos, totalizando 18 percevejos por planta. No período de interação, as plantas estavam sob condições de temperatura variando de 24,1 a 31,1°C e umidade relativa do ar de 67 a 92%. Em cada tempo analisado eram recolhidos seis sacos, um total de 54 insetos, e em seguida estes insetos foram levados para o Laboratório de Ultraestrutura Celular do Departamento de Biologia Geral/UFV.

Dos percevejos recolhidos em cada tempo analisado, 12 tiveram seu intestino coletado e cerca de 36 indivíduos foram usados para retirada das glândulas salivares. Entretanto, nos tempos 72 e 96 horas com a planta susceptível não foi possível utilizar esta quantidade de insetos. Nestes tratamentos usaram-se apenas 32 e 29 pares para 533 µL e 483 µL de água deionizada, respectivamente, em decorrência da morte dos demais. As amostras foram armazenadas em ultrafreezer (-80°C) para análises posteriores.

As seguintes atividades de enzimas digestivas no intestino médio e nas glândulas salivares foram analisadas: proteases totais, cisteíno proteases, amilase e lipase, de acordo com a cultivar (resistente e susceptível) e o tempo de alimentação (0, 24, 48, 72 e 96 horas).

#### **4.4. Análises bioquímicas em *Euschistus heros***

As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos, do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da UFV, bem como, no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Agentes Infecciosos e Parasitários, no Departamento de Bioquímica da UFV.

##### **4.4.1. Extração do intestino médio e preparo do extrato bruto**

Conforme Fialho et al. (2012) adaptado, os insetos foram imobilizados e dissecados em solução fisiológica (NaCl 0,1 M,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 M, pH 7,6). O intestino médio foi removido e transferido para tubo tipo eppendorf 2 mL contendo 600  $\mu\text{L}$  de ácido clorídrico  $10^{-3}$  M, macerados com o auxílio de um bastão de vidro e nitrogênio líquido. Em seguida foram centrifugados a 16.000 g durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante, denominado extrato bruto, foi utilizado para análises enzimáticas e armazenado a -20°C até à utilização.

Para realizar os ensaios de atividades enzimáticas foi utilizado um pool de 12 intestinos, em 600  $\mu\text{L}$  de HCl  $10^{-3}$  M.

##### **4.4.2. Extração das glândulas salivares e preparo do extrato bruto**

Os pares de glândulas salivares foram dissecados na presença de solução fisiológica conforme citado acima. Em seguida, transferidas para tubos tipo eppendorf 2 mL contendo 600  $\mu\text{L}$  de água deionizada e maceradas com o auxílio de um bastão de vidro. Posteriormente foram centrifugados a 16.000 g durante 25 minutos a 4°C (OLIVEIRA et al., 2006). O sobrenadante, denominado extrato bruto, foi utilizado para análises enzimáticas e armazenado a -20°C até à utilização.

Para realizar os ensaios de atividades enzimáticas referentes às glândulas salivares foi utilizado um pool de aproximadamente 36 pares de glândulas.

#### 4.4.3. Determinação da concentração de proteína

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976) utilizando-se albumina de soro bovino (BSA) como padrão na concentração de 0,2 mg/mL.

#### 4.4.4. Proteases totais

A atividade proteásica foi determinada segundo o método descrito por Tomarelli et al. (1949), utilizando azocaseína 2% (p/v) como substrato em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0; 37°C. O ensaio enzimático consistiu em 30 µL de substrato e 60 µL de extrato enzimático, sendo incubada por 30 minutos a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 144 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v). Após a parada de reação as amostras foram homogeneizadas em vórtex e deixadas em repouso no gelo por 15 minutos. Posteriormente, os microtubos do tipo eppendorf contendo as amostras foram centrifugados a 8000 g (9.350 rpm) por cinco minutos a 25°C. Uma alíquota de 144 µL do sobrenadante foi transferida para tubos contendo 168 µL de NaOH 1M. Posteriormente 300 µL foram transferidos para placa de Elisa e a absorbância aferida a 440 nm. A fim de obter os valores de atividade específica foi dividido os valores da absorbância pela concentração de proteína (mg/mL). O experimento foi realizado em triplicatas.

#### 4.4.5. Cisteíno proteases

A atividade amidásica de cisteíno proteases foi realizada conforme o método de Erlanger et al. (1961) e modificações sugeridas por Mendonça et al. (2011). O ensaio consistiu de 120 µL do substrato L-BapNA1,2 mM, a 25°C, 120 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo 20 mM CaCl<sub>2</sub> e 5 mM de DTT, 50 µL de benzamidina 12 mM e 10 µL de extrato enzimático. A leitura de absorbância foi determinada de 30 em 30 segundos por 2,5 minutos, a 410 nm. O experimento foi realizado em triplicata. A partir dos valores de absorbância foram calculadas as atividades de formação dos produtos em M/s, utilizando a fórmula abaixo:

$$A = \frac{A_{410}}{\epsilon \cdot l \cdot t}$$

Onde:

A<sub>410</sub>= Absorbância a 410 nm

ε= 8800 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> (coeficiente de extinção molar)

$t = 150$  s (tempo de incubação)

$l = 1,0$  cm (caminho ótico).

A atividade específica foi obtida dividindo os valores das atividades (M/s) pela concentração de proteína (mg/mL).

#### 4.4.6. Amilase

A atividade de amilase foi realizada de acordo com Kit Bioclin. Assim sendo, o ensaio consistiu de 100  $\mu$ L reagente 1, amido 0,4 g/L, tampão fosfato (pH 7,0) 100  $\mu$ mol/L, estabilizante e conservante. Em seguida, permaneceu por dois minutos em banho maria a 37°C. Adicionaram-se, então, 2  $\mu$ L de amostra e colocado por sete minutos e 30 segundos a 37°C em banho-maria. Posteriormente adicionaram-se 100  $\mu$ L do reagente de trabalho (solução estoque de iodo 50  $\mu$ mol e estabilizante) e 800  $\mu$ L de água. Após homogeneizar, a leitura da absorbância foi realizada a 660 nm. O controle foi realizado igualmente ao teste, porém sem adição da amostra. O teste foi realizado em triplicata.

A atividade de amilase foi calculada de acordo com a fórmula presente nas instruções de uso do kit:

$$\text{Amilase (U/dL)} = (Ac - Aa) / (Ac \times 800)$$

Onde:

Ac= absorbância do controle

Aa= absorbância da amostra

A atividade é dada como sendo a quantidade de hidrólise total de 10 mg de amido em 30 minutos à 37°C.

#### 4.4.7. Lipase

A atividade de lipase foi realizada de acordo com Kit Bioclin. O ensaio consistiu de 180  $\mu$ L do reagente 1 (100 mmol/L de tampão Tris (hidroximetilamino metano), pH 8,5, 10  $\mu$ L de amostra, 10  $\mu$ L do reagente 2 (inibidor enzimático 8 mmol/L de fenilmetilsulfonil fluoreto e solubilizante), 20  $\mu$ L do reagente 3 (reagente de cor 3 mmol/L de ácido ditionitrobenzóico, 100 mmol/L de acetato de sódio estabilizador), deixou-se por dois minutos em banho maria a 37°C. Posteriormente adicionaram-se 10  $\mu$ L do reagente 4 (substrato 20 mmol/L de tributiratoditiopropanol e surfactante), homogeneizou e incubou-se por 30 minutos à 37°C. Adicionaram-se 400  $\mu$ L do reagente 5 (acetona), homogeneizou-se bem e deixou-se em repouso por três minutos.

Transferiu-se para tubo tipo eppendorf e centrifugou-se a 3.500 rpm por cinco minutos. A leitura foi realizada a 410 nm. O controle foi realizado igualmente, porém sem adição do reagente 2 e 4. O teste foi realizado em triplicata.

A atividade de lipase foi calculada de acordo com a fórmula presente nas instruções de uso do kit:

$$\text{Lipase (U/L)} = (\text{Absorbância da amostra} - \text{Absorbância do controle}) / (7 \times 1.000)$$

Todas as absorbâncias foram quantificadas em SpectraMax 6.4.

#### 4.5. Análise estatística

Antes de proceder à análise de variância foram avaliadas as hipóteses de normalidade dos erros (teste de Qui-quadrado, a 5% de significância) e a hipótese de homogeneidade de variância (teste de Bartlett, a 5% de significância). Quando essas pressuposições foram atendidas, as variáveis (atividade enzimática) foram submetidas à análise de variância fatorial simples, teste de significância (teste F, a 5% de significância), utilizando o software GENES 2017.1.29 (CRUZ, 2013). O modelo estatístico utilizado foi:

$$Y_{ijk} = m + C_i + T_j + CT_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Em que:

$Y_{ijk}$  = observação no k-ésimo bloco, avaliado no i-ésimo genótipo e j-ésimo ambiente;

$m$  = média geral do ensaio;

$C_i$  = efeito do cultivar  $i$ ;

$T_j$  = efeito do tempo  $j$ ;

$CT_{ij}$  = efeito da interação entre o cultivar  $i$  e o tempo  $j$ ;

$\varepsilon_{ijk}$  = erro aleatório associado à observação  $ijk$ .

Quando a interação cultivar x tempo foi significativa foram feitos os desdobramentos (CRUZ, 2006). A comparação entre as médias foi através do teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ), quando houve significância para as fontes de variação: cultivar, tempo e para os desdobramentos da interação.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.2. Análises no intestino

#### 5.2.1. Proteases totais

A atividade de proteases totais no intestino médio de *E. heros*, de acordo com a ANOVA fatorial, apresentou diferença significativa para tempo, cultivar e interação cultivar x tempo (Tabela 1).

Tabela 1: Análise de variância da atividade enzimática do intestino de *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Pentatomidae) após interação com as cultivares IAC 24 e IAC Foscarin 31. Viçosa, MG. 2016.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Proteases totais (ABS/mg de proteína)	Amilase (U/dL.mg <sup>-1</sup> )	Lipase (U/L.mg <sup>-1</sup> )
Tempo	4	0,0266800**	46629**	3019,87**
Cultivar	1	0,0020833**	21862 <sup>ns</sup>	118,37 <sup>ns</sup>
Cultivar x Tempo	4	0,0257667**	4698 <sup>ns</sup>	1115,42**
Resíduo	20	0,0002900	6453	0044,37
CV (%)		7,44	24	17,86

\*\* :  $p < 0,05$ ; <sup>ns</sup>:  $p > 0,05$  pelo teste F; CV: Coeficiente de variação.

Ao realizar o desdobramento da cultivar dentro de cada nível de tempo foi verificado diferença estatística a partir de 24 horas de alimentação do percevejo-marrom (Tabela 2 e Figura 1). A atividade de proteases totais foi maior quando os percevejos se alimentaram do IAC 24 por 24 e 48 horas, enquanto que os alimentados com IAC Foscarin 31 apresentaram maior atividade em 72 e 96 horas (Figura 1). Dando continuidade à análise, foi avaliado o tempo dentro de cada nível de cultivar, onde houve diferença significativa (Tabela 3 e Figura 2). Essa análise, mostrou uma maior expressão de atividade no intestino dos percevejos alimentados por 24 horas com o IAC 24 (Figura 2A) e em 96 horas para os que consumiram o IAC Foscarin 31 (Figura 2B).

Tabela 2: Atividade enzimática do intestino de *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Pentatomidae) após interação com as cultivares IAC 24 e IAC Foscarin 31: Análise de cultivar dentro de cada nível de tempo. Viçosa, MG. 2016.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Proteases totais (ABS/mg de proteína)	Lipase (U/L.mg <sup>-1</sup> )
Tempo	4	0,02668**	3019,86822**
Tempo 0: Cultivar	1	0,00000 <sup>ns</sup>	0,00000 <sup>ns</sup>
Tempo 24: Cultivar	1	0,03527**	1693,10402**
Tempo 48: Cultivar	1	0,00482**	2337,61082**
Tempo 72: Cultivar	1	0,02667**	0435,88327**
Tempo 96: Cultivar	1	0,03840**	0113,44802 <sup>ns</sup>
Resíduo	18	0,00029	0044,36901
Total	29	0,00751	605,06549

\*\* :  $p < 0,05$ ; <sup>ns</sup>:  $p > 0,05$  pelo teste F.

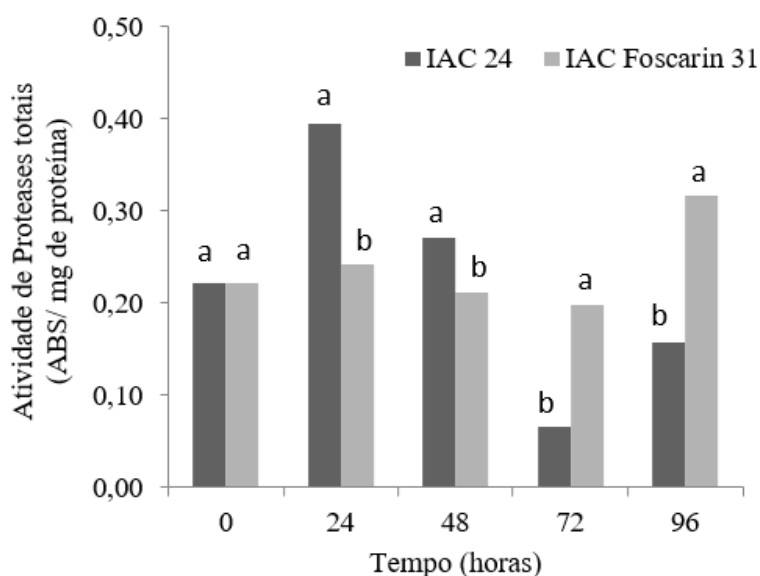


Figura 1: Atividade de Proteases totais do intestino de *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Pentatomidae) após interação com as cultivares IAC 24 e IAC Foscarin 31: Análise das cultivares dentro de cada nível de tempo. Viçosa, MG. 2016. Médias com mesmas letras, em cada coluna (tempo), não difere entre si, pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

Tabela 3: Atividade enzimática do intestino de *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Pentatomidae) após interação com as cultivares IAC 24 e IAC Foscarin 31: Análise de tempo dentro de cada nível de cultivar. Viçosa, MG. 2016.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Proteases totais (ABS/mg de proteína)	Lipase (U/L.mg <sup>-1</sup> )
Cultivar	1	0,00208**	118,36560 <sup>ns</sup>
Cultivar IAC 24: Tempo	4	0,04582**	1620,55964**
Cultivar IAC Foscarin 31: Tempo	4	0,00662**	2514,72871**
Resíduo	20	0,00029	0044,36901
Total	29	0,00751	0605,06549

\*\* :  $p < 0,05$ ; <sup>ns</sup>:  $p > 0,05$  pelo teste F.

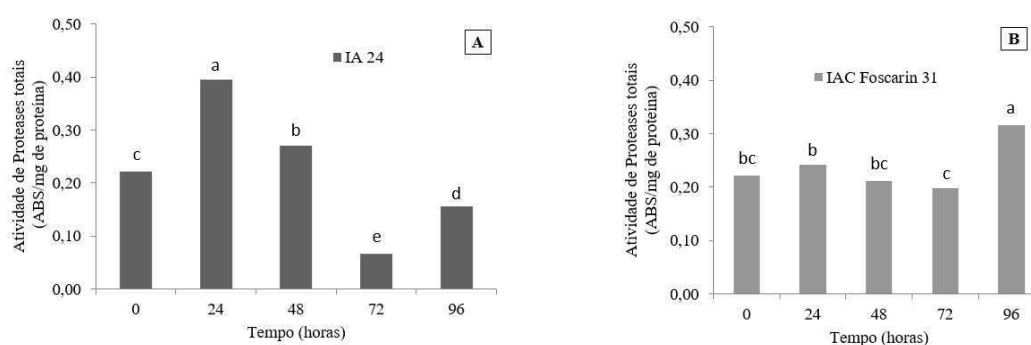


Figura 2: Atividade de Proteases totais do intestino de *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Pentatomidae) após interação com a cultivar IAC 24 (A) e IAC Foscarin 31 (B): Análise de tempo dentro de cada nível de cultivar. Viçosa, MG. 2016. Médias com mesmas letras, em cada coluna (tempo), não difere entre si, pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

De acordo com o tipo de resistência de plantas a insetos, sabe-se que estas apresentam diferentes formas de se defenderem e isso pode causar diversos efeitos sobre os insetos, ou seja, alterações em sua biologia e/ou comportamento. Em relação a biologia, alterações nas atividades das enzimas digestivas podem causar sua morte e/ou afetar o seu ciclo de vida (PILON, 2004 e 2008; PILON et al., 2006; SILVA, 2015; CHAVÉZ, 2016). Podemos relatar, ainda, que diferentes dietas podem alterar esta atividade, como observado por Rocha (2016), onde a atividade de proteases totais de *Spodoptera eridania* (Cramer, 1782) (Noctuidae) aumentou quando consumiu folhas de algodão, sugerido que a superexpressão é uma maneira de contornar os efeitos deletérios dos inibidores presentes nas plantas.

Desta forma, acredita-se que o aumento da atividade de proteases totais nos tempos 24 e 48 horas, quando alimentados com o IAC 24 em relação ao controle (tempo zero) (Figura 2A), seja uma maneira de contornar os efeitos de inibição. Possivelmente

os insetos conseguem superar os efeitos de inibidores pela hiperprodução de proteases (BROADWAY, 1995) ou pela produção de proteases insensíveis ao inibidor (JONGSMA&BOLTER, 1997). Por outro lado, nos tempos 72 e 96 horas, observou-se uma redução desta atividade, sugerindo a presença de inibidores de proteases. Lourenção et al. (1997) sugeriram que um inibidor de protease com alta constante de inibição na planta reduz a atividade de enzimas proteolíticas no intestino de *A. gemmatalis*. Já os insetos que se alimentaram do IAC Foscarin 31, apresentaram uma maior produção de proteases no tempo 96 horas (Figura 2B), indicando que somente neste ponto foi necessário burlar os possíveis efeitos de inibidores.

No presente estudo, verificou-se diferença da atividade de proteases totais entre a cultivar resistente e susceptível (Tabela 1), com picos de atividades em tempos distintos (Figura 1). Estes resultados demonstraram que existem atividades de proteases distintas no intestino médio do percevejo-marrom que poderão ser estudadas para conhecer qual sua expressão, bem como sua possível utilização no manejo integrado dessa praga. Salvadori (2006) relatou que a presença abundante de inibidores de proteases nos tecidos vegetais esteja relacionada com a diversidade das enzimas proteolíticas descritas em insetos fitófagos.

No caso da soja temos dois tipos de inibidores de proteases predominantes: KTI (Inibidor de Tripsina Kunitz) e BBI (Inibidor de Tripsina e de Quimotripsina Bowman-Birk) (MONTEIRO et al., 2004). A presença destes inibidores na dieta do inseto pode diminuir a atividade das proteases do inseto.

### **5.2.2. Cisteíno proteases**

Este estudo não apresentou atividade detectável de cisteíno no intestino médio dos percevejos-marrons alimentados com os dois cultivares e em jejum. Entretanto, estudos realizados por Bigham & Hosseininaveh (2010), com o percevejo *Brachynema germari* Kolenati (Pentatomidae), alimentados com pistache, registraram a atividade máxima de cisteíno proteases do tipo catepsina B e L no intestino deste inseto, em pH 5 e 6. Fialho et al. (2012) mostraram a atividade da cisteíno proteases, catepsina L, em *P. nigripinus* no pH 6. Mendonça et al. (2011), observaram diferentes picos de atividade de cisteíno proteases em intestino médio da *A. gemmatalis* e sugeriram que há diferentes isoformas de cisteíno no extrato. De acordo com Terra & Ferreira (1994), entre serino e cisteíno proteases, a cisteíno é a mais comum no intestino dos heterópteros, visto que essa predominância está relacionada com a natureza ácida deste intestino. Desta forma a

ausência de cisteíno, neste trabalho, pode ser devido à inexistência de isoformas alcalinas nas condições de ensaio.

### 5.2.3. Amilase

A atividade de amilase foi estatisticamente diferente somente para o tempo, ou seja, para as cultivares esta atividade foi igual (Tabela 1). Foi verificado que o pico de atividade, independentemente da cultivar, ocorreu no tempo zero horas, sendo este estatisticamente igual a 24 horas de alimentação do percevejo-marrom (Figura 3). No presente estudo observa-se diminuição da atividade de amilase a partir de 24 horas de alimentação. Possivelmente seja devido a presença de inibidores inespecíficos de amilase na dieta. Sabe-se também que a soja não contém amido (EMBRAPA, 2004) e portanto, pode ter sido a causa da perda da atividade de amilase do intestino do inseto.

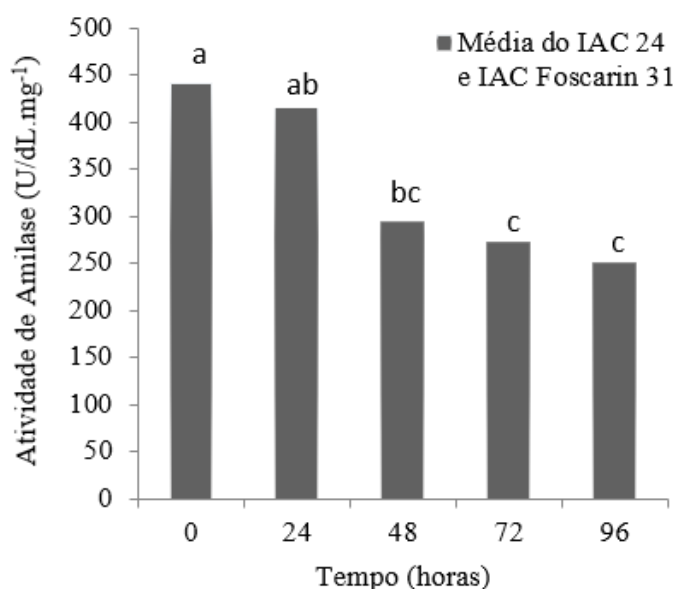


Figura 3: Atividade de Amilase média do intestino de *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Pentatomidae) após interação com as cultivares IAC 24 e IAC Foscarin 31: Análise de tempo dentro de cada nível de cultivar. Viçosa, MG. 2016. Médias com mesmas letras, em cada coluna (tempo), não difere entre si, pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

Corroborando com os resultados do presente trabalho, Fialho (2010), para *P. nigrispinus*, também observou maior atividade de amilase na primeira hora de avaliação, logo após o período de jejum, e a menor atividade após quatro horas (última avaliação).

Em folhas de algumas cultivares de beterraba, foi observada diferença significativa sobre conteúdo de amido, e ao analisarem a atividade amidolítica de larvas de *Autographa gamma* (L.) (Noctuidae) alimentadas com tais cultivares, verificaram maior atividade naquelas com maior teor de amido (NASARI et al., 2016). A atividade de amilase em lagartas de *H. armigera* (Noctuidae) alimentadas com diferentes cultivares de soja foi semelhante, sendo sugerido que a quantidade de carboidratos nestes cultivares eram os mesmos e por isso não foi verificada diferença desta enzima (NASARI et al., 2010).

Mendonça et al. (2009) relataram que o aumento da atividade enzimática no trato intestinal seja devido à necessidade de um maior consumo e utilização do alimento em questão. Assim, podemos inferir que a queda, após 24 horas de alimentação, da atividade de amilase de *E. heros* seja devida à redução do amido em sua alimentação. Possivelmente uma dieta contendo amido tem importância para o desenvolvimento deste inseto.

#### **5.2.4. Lipase**

A análise da atividade de lipase apresentou diferença estatística no tempo e na interação cultivar x tempo (Tabela 1). Ao analisar os cultivares dentro de cada nível de tempo verificou-se significância do tempo 24 até 72 horas (Tabela 2 e Figura 4). A atividade de lipase foi maior quando os percevejos se alimentaram do IAC 24 por 48 horas, enquanto que os alimentados com IAC Foscarin 31, apresentaram maior atividade em 24 e 72 horas (Figura 4). Para a análise de tempo dentro de cada nível de cultivar observou-se diferença estatística (Tabela 3 e Figura 5). De modo que, a maior expressão de atividade foi constatada quando os percevejos consumiram, por 48 horas, o IAC 24, sendo a atividade estatisticamente igual ao tempo 24 horas (Figura 5A). Para os que se alimentaram com o IAC Foscarin 31, o pico de atividade foi no tempo 24 horas, diferindo-se dos demais (Figura 5B).

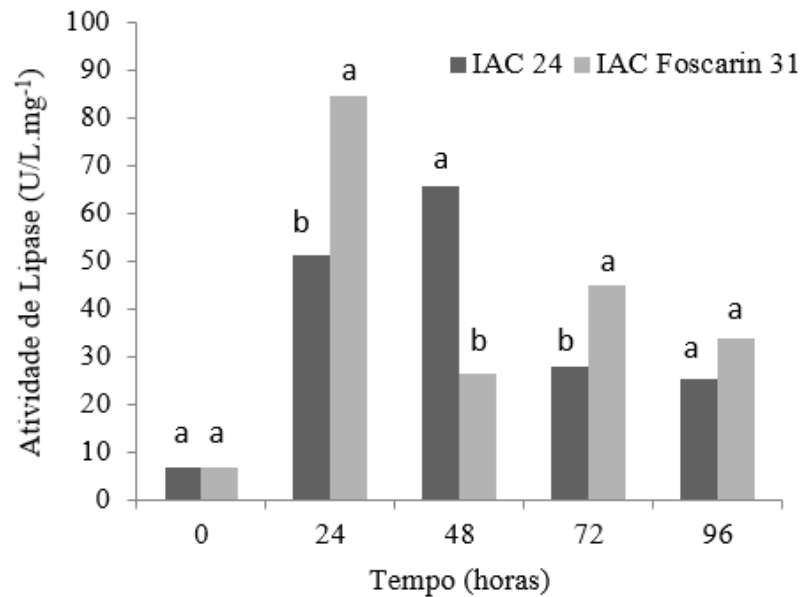


Figura 4: Atividade de Lipase do intestino de *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Pentatomidae) após interação com as cultivares IAC 24 e IAC Foscarin 31: Análise das cultivares dentro de cada nível de tempo. Viçosa, MG. 2016. Médias com mesmas letras, em cada coluna (tempo), não difere entre si, pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

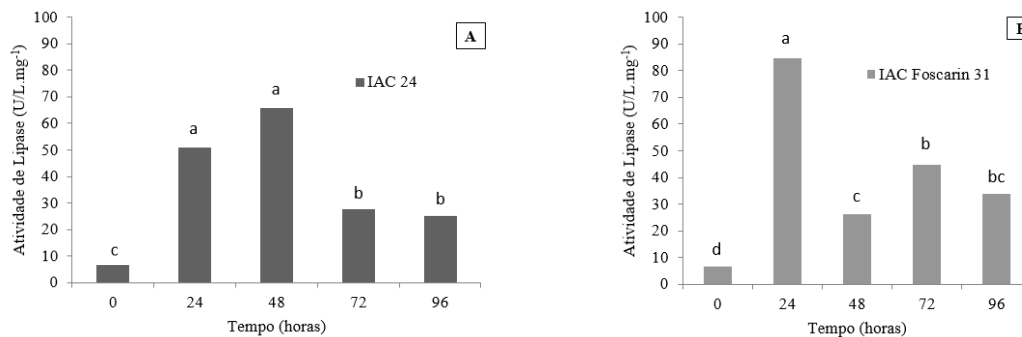


Figura 5: Atividade de Lipase do intestino de *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Pentatomidae) após interação com a cultivar IAC 24 (A) e IAC Foscarin 31(B): Análise de tempo dentro de cada nível de cultivar. Viçosa, MG. 2016. Médias com mesmas letras, em cada coluna (tempo), não difere entre si, pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

Sabe-se que os ácidos graxos, essenciais para muitos artrópodes, são obtidos exclusivamente da digestão dos lipídeos presentes na dieta (CANAVOSO et al., 2001). Apesar do conhecimento em relação a digestão de lipídeos em insetos ainda ser considerado escasso, existem trabalhos com registro de atividade de lipase no intestino médio de algumas espécies (MENDONÇA et al., 2009; ZIBAE & BANDANI, 2010; FILIETAZ & LOPES, 2010; SORKHABI-ABDOLMALEKI & ZIBAE, 2013;

DELKASH-ROUDSARI et al., 2014; MEHRABADI, 2014). Sorkhabi-Abdolmaleki & Zibaee (2013) ao analisarem a atividade de lipase no intestino médio do predador *Andrallus spinidens* (Fabricius, 1787) (Pentatomidae) verificaram um aumento desta atividade na primeira hora de alimentação, com máxima e mínima de atividade em 12 e 48 horas, respectivamente. No presente estudo também foi observado um aumento desta atividade após o período de jejum do percevejo-marrom nas duas cultivares.

A soja contém cerca de 20% de lipídeos no grão (EMBRAPA, 2004; SEDIYAMA et al., 2009; SILVA et al., 2010). A lipase é uma enzima que libera os ácidos graxos dos glicerídeos e, portanto, é importante analisá-la em uma leguminosa que apresenta alto teor de lipídeos. Assim, existe a possibilidade da dieta alimentar estar influenciando a atividade desta enzima. Além do mais, a maior atividade de lipase quando os percevejos se alimentaram do IAC Foscarin 31 (Figura 4) pode ser devida ao maior teor de óleo desta cultivar em relação ao IAC 24. Gavioli et al. (2012) verificaram que o teor de óleo presente no IAC Foscarin 31 é maior que no IAC 24.

### 5.3. Análises nas glândulas salivares

#### 5.3.1. Proteases totais

A atividade de proteases totais do percevejo-marrom apenas apresentou diferença estatística em relação às cultivares analisadas (Tabela 4). Logo, existe diferença entre a cultivar resistente e a susceptível independentemente do tempo de sua alimentação.

Tabela 4: Análise de variância da atividade enzimática das glândulas salivares de *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Pentatomidae) após interação com as cultivares IAC 24 e IAC Foscarin 31. Viçosa, MG. 2016.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Proteases totais (ABS/mg de proteína)	Amilase (U/dL.mg <sup>-1</sup> )	Lipase (U/L.mg <sup>-1</sup> )
Tempo	4	0,0006800 <sup>ns</sup>	627416**	31,411 **
Cultivar	1	0,0061633**	18845 <sup>ns</sup>	77,699**
Cultivar x Tempo	4	0,0011467 <sup>ns</sup>	248344**	20,634**
Resíduo	20	0,0004400	25845	0,573
CV (%)		13,03%	11,15%	19,62%

\*\* : p < 0,05; <sup>ns</sup> : p > 0,05 pelo teste de F; CV: Coeficiente de variação.

A atividade de proteases totais nas glândulas salivares de adultos de *Creontiades dilutus* (Stal) (Miridae) em jejum e alimentados não apresentou diferença significativa

(COLEBATCH et al., 2001). Para *E. heros* não houve diferença desta atividade ao longo do tempo, ou seja, insetos em jejum também não diferenciaram dos alimentados.

Foi relatado que a composição salivar de hemípteros fitófagos pode variar em resposta da composição da dieta da planta hospedeira (MILES, 1987; HABIBI et al., 2001). Gavioli et al. (2012) observaram que o teor de proteínas do IAC 24 e IAC Foscarin 31 são iguais estatisticamente. Contudo acredita que a diferença entre as cultivares em relação à atividade proteases totais pode estar relacionada com o teor de proteínas contidas nestes cultivares nestas condições de estudo. Bonato et al. (2000), relataram diferença estatística em 26 genótipos de soja em relação ao teor proteico em três regiões do Rio Grande do Sul, mostrando que os genótipos reagem diferentemente conforme as condições ambientais em que são conduzidas.

### **5.3.2. Cisteíno proteases**

A presente pesquisa não detectou atividade de cisteíno proteases no extrato das glândulas salivares de *E. heros* nas duas cultivares analisadas. Bigham & Hosseininaveh (2010) observaram restrita atividade de cisteíno proteases nas glândulas salivares de *B. germari*, quando usaram L-cisteína, e concluíram que estas enzimas têm um papel menor na sua digestão. Entretanto, estes autores não verificaram atividade destas enzimas ao utilizarem DTT (ditiotreitól), assim como no presente trabalho. Fialho et al. (2012) quantificaram a atividade de cisteíno proteases, com o ativador L-cisteína, do percevejo *P. nigrispinus*. Logo, L-cisteína pode ser um ativador melhor de cisteíno proteases para alguns hemípteros.

### **5.3.3. Amilase**

Conforme os dados estatísticos a atividade de amilase das glândulas salivares do percevejo-marrom não teve diferença entre as cultivares, porém mostrou significância tanto para o tempo quanto para a interação cultivar x tempo (Tabela 4). A decomposição da análise de cultivar dentro de cada nível de tempo permitiu observar diferença significativa no extrato das glândulas nos tempos 24, 72 e 96 horas (Tabela 5 e Figura 6). A atividade de amilase nos tempos 24 e 96 horas foi maior quando os percevejos foram alimentados com a cultivar IAC 24, enquanto que no tempo 72 horas esta atividade foi maior na cultivar IAC Foscarin 31 (Figura 6).

Ao analisar o tempo dentro de cada nível de cultivar, observou-se diferença estatística (Tabela 6 e Figura 7). Os insetos alimentados com a cultivar IAC 24

apresentaram maior atividade no tempo 24 horas, sendo este estatisticamente igual aos tempos zero e 48 horas (Figura 7A). A máxima atividade daqueles que consumiram a cultivar IAC Foscarin 31 ocorreu em zero horas, valor este idêntico aos tempos 24 e 48 horas, estatisticamente (Figura 7B).

A atividade de amilase já foi verificada em glândulas salivares de algumas espécies de percevejos (OLIVEIRA, et al., 2006; AZEVEDO et al., 2007; SOYELU et al., 2007; FIALHO, 2010; SILVA et al., 2012; MEHRABADI, 2014). Em *Eurygaster integriceps* (Puton, 1881) (Scutelleridae) a presença desta atividade foi justificada devido a sua alimentação com sementes de trigo, que são ricas em carboidratos (MEHRABADI, 2014). Silva et al. (2012) ao compararem a atividade de amilase entre *E. heros* e *Edessa meditabunda* (Fabricius, 1974) (Pentatomidae) constataram maior atividade na primeira espécie, inferindo que essa diferença possa ser devida à sua preferência alimentar (sementes).

Tabela 5: Atividade enzimática das glândulas salivares de *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Pentatomidae) após interação com as cultivares IAC 24 e IAC Foscarin 31: Análise de cultivar dentro de cada nível de tempo. Viçosa, MG. 2016.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Amilase (U/dL.mg <sup>-1</sup> )	Lipase (U/L.mg <sup>-1</sup> )
Tempo	4	627415,83**	31,41089**
Tempo 0: Cultivar	1	0,000000 <sup>ns</sup>	0,00000 <sup>ns</sup>
Tempo 24: Cultivar	1	339178,91**	1,58107 <sup>ns</sup>
Tempo 48: Cultivar	1	10581,48 <sup>ns</sup>	68,68167**
Tempo 72: Cultivar	1	429423,10**	89,47482**
Tempo 96: Cultivar	1	233035,28**	0,49882 <sup>ns</sup>
Resíduo	18	25844,56	0,57297
Total	29	139268,04	10,25308

\*\* : p < 0,05; ns: p > 0,05 pelo teste F.

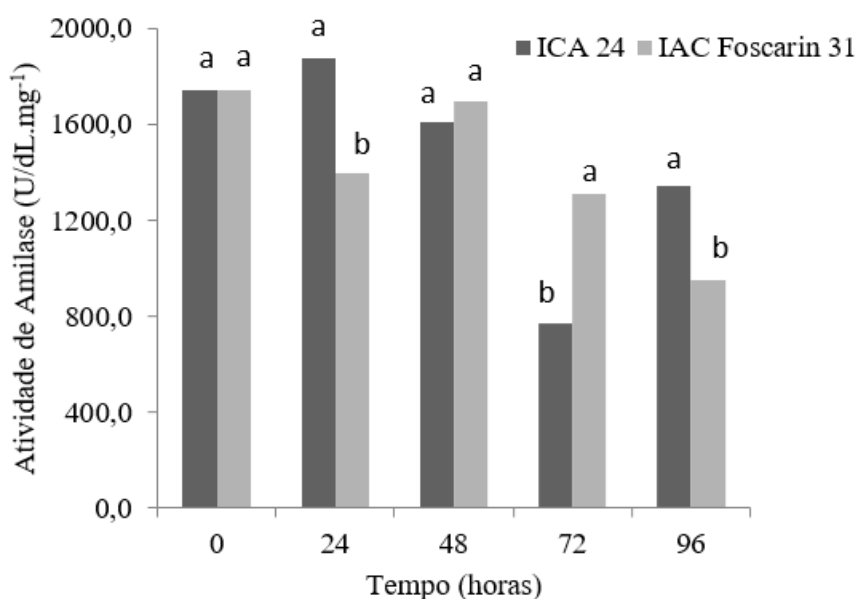


Figura 6: Atividade de Amilase das glândulas salivares de *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Pentatomidae) após interação com as cultivares IAC 24 e IAC Foscarin 31: Análise das cultivares dentro de cada nível de tempo. Viçosa, MG. 2016. Médias com mesmas letras, em cada coluna (tempo), não difere entre si, pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

Tabela 6: Atividade enzimática das glândulas salivares de *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Pentatomidae) após interação com as cultivares IAC 24 e IAC Foscarin 31: Análise de tempo dentro de cada nível de cultivar. Viçosa, MG. 2016.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Amilase (U/dL.mg <sup>-1</sup> )	Lipase (U/L.mg <sup>-1</sup> )
Cultivar	1	18844,62 <sup>ns</sup>	77,69861**
Cultivar IAC 24: Tempo	4	568110,30**	37,69126**
Cultivar IAC Foscarin 31: Tempo	4	307649,06**	14,35408**
Resíduo	20	25844,56	0,57297
Total	29	139268,04	10,25308

\*\* $p < 0,05$ ; <sup>ns</sup>:  $p > 0,05$  pelo teste F.

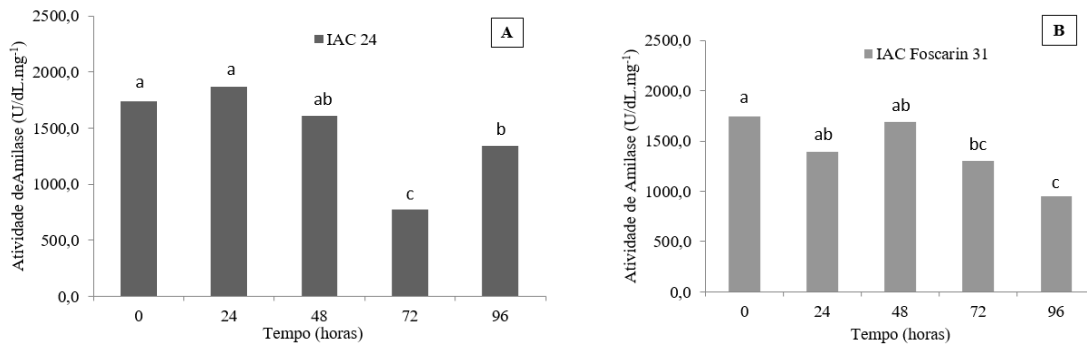


Figura 7: Atividade de Amilase das glândulas salivares de *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Pentatomidae) após interação com a cultivar IAC 24 (A) e IAC Foscarin 31 (B): Análise de tempo dentro de cada nível de cultivar. Viçosa, MG. 2016. Médias com mesmas letras, em cada coluna (tempo), não difere entre si, pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

Portanto, o presente estudo corrobora com Silva et al. (2012) em relação a presença da atividade de amilase em *E. heros* alimentados com sementes de soja e acrescenta que tal atividade não foi influenciada pelo tipo de resistência das cultivares (resistente ou susceptível), havendo alterações em relação ao tempo de alimentação e cultivar x tempo. De acordo com Mehrabadi (2012) a atividade desta enzima foi reduzida em extrato das glândulas salivares de *E. integriceps* resultante da atuação de proteínas inibidores de Triticale (TAI). Desta forma a diferença em relação aos tempos avaliados pode estar relacionada com possíveis inibidores.

#### 5.3.4. Lipase

A análise estatística dos dados referentes à atividade de lipase nas glândulas salivares foi significativa para as três fontes de variações avaliadas (Tabela 4). A extensão da análise cultivar dentro de cada nível de tempo demonstrou que nos tempos 48 e 72 horas de alimentação do percevejo-marrom houve diferença estatística (Tabela 5 e Figura 8). Nestes tempos os insetos alimentados com o IAC 24 apresentaram maior atividade (Figura 8).

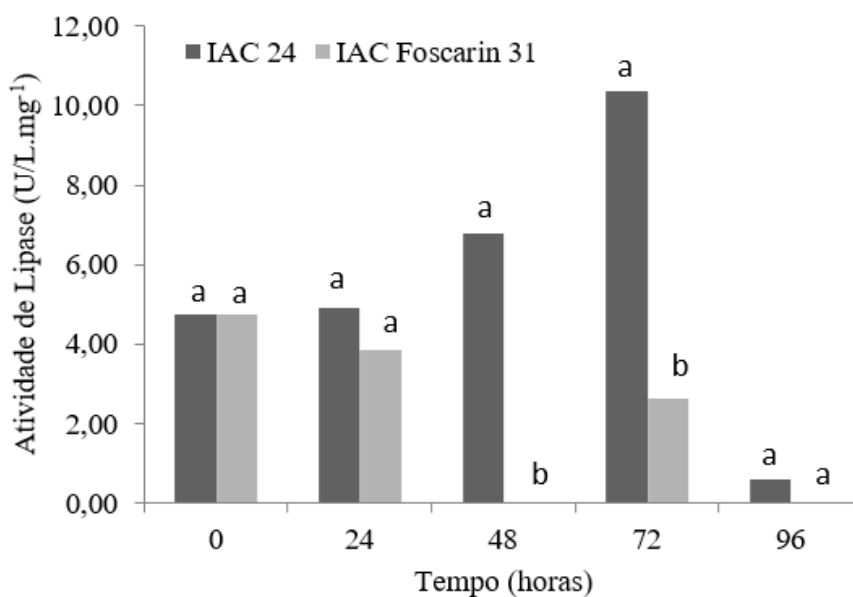


Figura 8: Atividade de Lipase das glândulas salivares de *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Pentatomidae) após interação com as cultivares IAC 24 e IAC Foscarin 31: Análise das cultivares dentro de cada nível de tempo. Viçosa, MG. 2016. Médias com mesmas letras, em cada coluna (tempo), não difere entre si, pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

Ao analisar o tempo dentro de cada nível de cultivar observou-se significância (Tabela 6 e Figura 9). Para os percevejos que consumiram a cultivar IAC 24 o pico de atividade ocorreu em 72 horas, sendo este estatisticamente distinto das demais (Figura 9A). Este pico pode indicar que o inseto está aumentando a produção de lipase devido a atuação de um inibidor desta enzima, de maneira compensatória. Enquanto que no tempo 96 horas mostra a possível atuação de um inibidor de lipases, agindo de modo a reduzir a atividade, em relação ao controle (zero horas). Para os alimentados com o IAC Foscarin 31 a maior atividade foi verificada em zero hora, que é estatisticamente igual àquela verificada no tempo 24 horas (Figura 9B). O que indica que a alimentação nas primeiras 24 horas com a soja não altera a atividade desta enzima. Porém nos tempos subsequentes há uma redução da atividade, sugerindo a ação de inibidor.

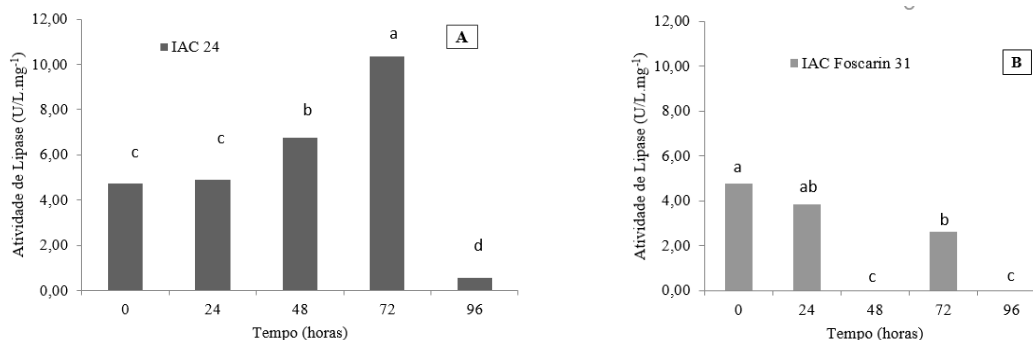


Figura 9: Atividade de Lipase das glândulas salivares de *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Pentatomidae) após interação com a cultivar IAC 24 (A) e IAC Foscarin 31 (B): Análise de tempo dentro de cada nível de cultivar. Viçosa, MG. 2016. Médias com mesmas letras, em cada coluna (tempo), não difere entre si, pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

A presença de lipase foi demonstrada nas glândulas salivares de percevejos predadores (OLIVEIRA et al., 2006; AZEVEDO et al., 2007). Mehrabadi (2014) não encontrou atividade desta enzima no percevejo fitófago *E. integriceps* alimentado com grãos de trigo. No presente estudo a atividade de lipase foi observada, podendo estar relacionada com a sua preferência alimentar ou sua reserva lipídica (PANIZZI & VIVAN, 1997). Sabe-se que lipases nas glândulas salivares são úteis tanto para zoofagia quanto para fitofagia (TORRES & BOYD, 2009).

## 6. CONCLUSÕES

Neste estudo, apenas foram possíveis descrever proteases totais, amilase e lipase do intestino médio e das glândulas salivares de *E. heros*, pois foram as que apresentaram atividades após a interação com cultivares de soja.

Este é o primeiro trabalho sobre as enzimas digestivas presentes no intestino e nas glândulas salivares de *E. heros* alimentados com o IAC 24 e com o IAC Foscarin 31.

No intestino médio e nas glândulas salivares existem proteases que agem diferentemente dependendo do cultivar ingerido, resistente e/ou susceptível. Sugere-se que outros trabalhos futuros visem a identificação de quais enzimas estão atuando.

A maior atividade de amilase e lipase nas glândulas salivares e no intestino, respectivamente, sugere que pesquisas futuras deverão ser conduzidas para validar a utilização destas enzimas no manejo integrado de *E. heros*.

A maioria das enzimas digestivas descritas apresenta diferença ao longo do tempo de alimentação do percevejo-marrom para cada cultivar.

Por fim, há necessidade de novas pesquisas para conhecer as respostas bioquímicas destes cultivares, nas mesmas condições avaliadas, visando entender melhor as oscilações das atividades enzimáticas de *E. heros*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARRESE, E. L.; CANAVOSO, L. E.; JOUNI, Z. E.; PENNINGTON, J. E.; TSUCHIDA, K.; WELLS, M. A. Lipid storage and mobilization in insects: Current status and future directions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, p. 7-17, 2001.
- ASHOURI, S.; ABAD, R. F. P.; ZIHNIUGLU, F.; KOCADAG, E. Extraction and purification of protease inhibitor(s) from seeds of *Helianthus annuus* with effects on *Leptinotarsa decemlineata* digestive cysteine protease. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 9, p. 113-119, 2017.
- AZEVEDO, D. O.; ZANUNCIO, J. C.; ZANUNCIO Jr, J. S.; MARTINS, G.F.; SILVA-MARQUES, S.; SOSSAI, M. F.; SERRÃO, J. E. Biochemical and morphological aspects of salivary glands of the predator *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 3, p. 469-477, 2007.
- BARRETT, A. J.; MCDONALD, J. K. Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. **Biochemical Journal**, v. 237, p. 935, 1986.
- BELO, M. S. S. P.; PIGNATI, W.; DORES, E. F. G. C.; MOREIRA, J. C.; PERES, F. Uso de agrotóxicos na produção de soja do Estado do Mato Grosso: um estudo preliminar de riscos ocupacionais e ambientais. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 37, n. 125, p. 78-88, 2012.
- BIGHAM, M.; HOSSEININAVEH, V. Digestive proteolytic activity in the pistachio green stink bug, *Brachynema germari* Kolenati (Hemiptera: Pentatomidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 13, n. 3, p. 221-227, 2010.
- BORGES, M.; LAUMANN, R. A., SILVA, C. C. A da. **Metodologias de criação e manejo de colônias de percevejos da soja (Hemiptera-Pentatomidae) para estudos de comportamento e ecologia química**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 18, 2006.
- BONATO, E. R.; BERTAGNOLLI, P. F.; LANGE, C. E.; RUBIN, S. A. L. Teor de óleo e de proteína em genótipos de soja desenvolvidos após 1990. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 12, p. 2391-2398, 2000.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRIER, H. B.; ROGERS, D. J. Susceptibility of soybeans to damage by *Nezara viridula*

(L.) (Hemiptera: Pentatomidae) and *Riptortus serripes* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae) during three stages of pod development. **Journal of the Australian Entomological Society**, v. 30, p. 123-128, 1991.

BROADWAY, R. M. Are insects resistant to plant proteinase inhibitors? **Journal of Insect Physiology**, v. 41, n. 2, p. 107-116, 1995.

BUENO, A. F.; BATISTELA, M. J.; BUENO, R. C. O. F.; FRANÇA-NETO, J. B.; NISHIKAWA, M. A. N.; FILHO, A. L. Effects of integrated pest management, biological control and prophylactic use of insecticides on the management and sustainability of soybean. **Crop Protection**, v. 30, n. 7, p. 937-945, 2011.

BUENO, A. F.; PAULA-MORAES, S. V.; GAZZONI, D. L.; POMARI, A. F. Economic thresholds in soybean-integrated pest management: old concepts, current adoption, and adequacy. **Neotropical Entomology**, v. 42, n. 5, p. 439-447, 2013.

CABRERA, Y. B. M. **Resposta de plantas de *Coffea arabica* (Rubiaceae) às injúrias de *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetidae) através das vias das lipoxigenases e a atividade de polifenol oxidases**. 2015. 49 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Aplicada) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2015.

CANAVOSO, L. E.; JOUNI, Z. E.; KARNAS, K. J.; PENNINGTON, J. E.; WELLES, M. A. Fat metabolism in insects. **Annual review of nutrition**, v. 21, n. 1, p. 23-46, 2001.

CHÁVEZ, C. Y. L. **Efeito dos inibidores de proteases benzamidinas nas respostas bioquímico-fisiológicas de *Coffea arabica* e da cochonilha *Coccus viridi***. 2016. 78 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2016.

COHEN, A. C. Extra-oral digestion in Predaceous terrestrial arthropoda. **Annual Review of Entomology**, v. 40, n. 1, p. 85-103, 1995.

COHEN, A. C. Organization of digestion and preliminary characterization of salivary trypsin-like enzymes in a predaceous heteropteran, *Zelus renardii*. **Journal of Insect physiology**, v. 39, n. 10, p. 823-829, 1993.

COLEBATCH, G.; EAST, P.; COOPER, P. Preliminary characterisation of digestive proteases of the green mirid, *Creontiades dilutus* (Hemiptera: Miridae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, n. 45, p. 415-423, 2001.

CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO). Disponível em : <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/170216115151boletimgraosfev\\_ereiro\\_2017.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/170216115151boletimgraosfev_ereiro_2017.pdf)>. Acessado em 20 de fevereiro de 2017.

CORDEIRO, E. G. **Resposta de planta de soja ao ataque do percevejo marrom *Escuistus heros* (F.) e injúrias**. 2011. 53 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2011.

CORRÊA-FERREIRA, B. S. Suscetibilidade da soja a percevejos na fase anterior ao desenvolvimento das vagens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 11, p. 1067-1072, 2005.

CORRÊA-FERREIRA, B. S.; AZEVEDO, J. Soybean seed damage by different species of stink bugs. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 4, n. 2, p. 145-150, 2002.

CORRÊA-FERREIRA, B. S.; KRZYŻANOWSKI, F. C.; MINAMI, C. A. **Percevejos e**

- a qualidade da semente de soja – série sementes.** Londrina: Embrapa Soja, 2009. p. 16. (Circular Técnica, 67).
- CORRÊA-FERREIRA, B. S.; PANIZZI, A. R. **Percevejos da soja e seu manejo.** Londrina: Embrapa Soja, 1999. p. 46. (Circular Técnica, 24).
- COSTA, M. L. M.; BORGES, M.; VILELA, E. F. Biologia reprodutiva de *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 27, n. 4, p.559-568, 1998.
- CRUZ, C. D. A Software package for analysis in experimental statistic and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.
- CRUZ, C. D. **Programa Genes: estatística experimental e matrizes.** Editora UFV, 2006.
- DE MORAES, C. M.; MESCHER, M. C.; TUMLINSON, J. H. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. **Nature**, v. 410, p. 577-580, 2001.
- DEGRANDE, P. E.; VIVAN, L. M. Pragas da soja. **Boletim de Pesquisa de Soja**, v. 12, p. 254, 2007.
- DELKASH-ROUDSARI, S.; ZIBAE, A.; ABBACIMOZHDEHI, M. R. Determination of lipase activity in the larval midgut of *Bacterocera oleae* Gmelin (Diptera: Tephritidae). **ISJ**, v. 11, p. 66-72, 2014.
- DEPIERI, R. A. **Danos em sementes de soja *Glycine max* (L.) Merr. (Fabaceae), morfologia dos estiletos e enzimas salivares de pentatomídeos fitófagos.** 2010. 104 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2010.
- DEPIERI, R.; PANIZZI, A. R. Duration of feeding and superficial and in-depth damage to soybean seed by selected species of stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v.40, n. 2, p.197-203, 2011.
- DICKE, M.; SABELIS, M. W. Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds? **Functional Ecology**, v. 2, n. 2, p. 131-139, 1988.
- DUDAREVA, N.; NEGRE, F.; NAGEGOWDA, D. A.; ORLOVA, I. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 25, n. 5, p. 417-440, 2006.
- EMBRAPA SOJA. **Soja na alimentação.** Londrina, 2004. Disponível em: <[http://www.cnpso.embrapa.br/soja\\_alimentacao/index.php?pagina=23](http://www.cnpso.embrapa.br/soja_alimentacao/index.php?pagina=23)>. Acesso em: 27 de fevereiro de 2017.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Anteprojeto do de implementação centro nacional de pesquisa de soja.** Brasília, p. 1-113, 1974.
- EREJOMOVICH, J. A. El “Vaneo de frutos” como limitante para el cultivo de la soja. **Revista Facultad de Agronomía**, v.1, n. 1, p. 33-39, 1980.
- ERLANGER, B.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 95, p. 271-278, 1961.

- FAN, S. G.; WU, G. J. Characteristics of plant proteinase inhibitors and their applications in combating phytophagous insects. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 46, p. 273-292, 2005.
- FAUSTINO, V. P. **Impacto do estresse hídrico e biótico (*Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818) sobre o mecanismo de defesa da soja**. 2015. 57 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Aplicada) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2015.
- FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**. 1977.
- FEIR, D.; BECK, S. D. Salivary secretions of *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera: Lygaeidae)<sup>1</sup>. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 54, p. 316.
- FIALHO, M. C. Q. **Caracterização e imunolocalização das principais enzimas digestivas do predador *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae)**. 2010. 68 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2010.
- FIALHO, M. C. Q.; MOREIRA, N. R.; ZANUNCIO, J. C.; RIBEIRO, A. F.; TERRA, W. R.; SERRÃO, J. E. Prey digestion in the midgut of the predatory bug *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 58, n. 6, p. 850-856, 2012.
- FILIETAZ, C. F. T.; LOPES, A. R. Caracterização de Lipases em Arthropoda. **Revista de Pesquisa e Inovação Farmacêutica**, v. 2, n. 1, 2010.
- GAVIOLI, I. L. C.; LEMOS, L. B.; FARINELLI, R.; CAVARIANI, C. Desempenho agrônomico e tecnológico de cultivares de soja convencional e com características especiais para alimentação humana. **Journal of Agronomic Sciences**, v. 1, n. 1, p. 84-99, 2012.
- GAZZONI, D.L. Efeito de populações de percevejos na produtividade, qualidade da semente e características agrônomicas da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n. 8, p. 1229-1237, 1998.
- GILL, I.; LÓPEZ-FANDIÑO, R.; JORBA, X.; VULFSON, E. N. Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 162-183, 1996.
- GODOY, K. B.; ÁVILA, C. J.; DUARTE, M. M.; ARCE, C. C. M. Parasitismo e sítios de diapausa de adultos do percevejo marrom, *Euschistus heros* na região da Grande Dourados, MS. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 1199-1202, 2010.
- GORMAN, M. J.; ANDREEVA, O. V.; PASKEWITZ, S. M. Sp22D: A multi domain serine protease with a putative role in insect immunity. **Gene**, v. 251, p. 9–17, 2000.
- GRILLO, L. A. M.; MAJEROWICZ, D.; GONDIM, K. C. Lipid metabolism in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae): Role of a midgut triacylglycerol-lipase. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, p. 579-588, 2007.
- GUEDES, J. V. C.; ARNEMANN, J. A.; STÜRMER, G. R.; MELO, A. A.; BIGOLIN, M.; PERINI, C. R.; SARI, B. G. Percevejos da soja: novos cenários, novo manejo. **Revista Plantio Direto**, v. 12, n. 1, p. 24-30, 2012.
- GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. **Os insetos: um resumo de entomologia**. Roca, 2007.
- HABIBI, J.; BACKUS, E. A.; COUDRON T. A.; BRANDT, S. L. Effect of different host substrates on hemipteran salivary protein profiles. **Entomologia Experimentalis et**

**Applicata**, v. 98, n. 3, p. 369-375, 2001.

HARLAN, J. R. **Crops and man**. Foundation for modern Crop Science. 1975.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; OLIVEIRA, L. J.; SOSA-GOMEZ, D. R.; PANIZZI, A. R.; CORSO, I. C.; GAZZONI, D. L.; OLIVEIRA, E. B. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado**. Londrina: Embrapa Soja, 2000. p. 70. (Circular Técnica, 30).

HORI, K. Carbohydrases in the gut and salivary gland, and the nature of the amylase in the gut homogenate of *Lygus disponsi* Linnavuori (Hemiptera: Miridae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 5, n. 1, p. 13-22, 1970.

HOUSEMAN, J. G.; DOWNE, E. R. Cathepsin D-like activity in the posterior midgut of Hemiptera insects. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 75B, n. 3, p. 509-512, 1983.

HOUSEMAN, J. G.; MORRISON P. E.; DOWNE, A. E. R. Cathepsin B and aminopeptidase in the posterior midgut of *Phymata wolffii* (Hemiptera: Phymatidae). **Canadian Journal of Zoology**, v. 63, n. 4, p. 1288-1291, 1985.

HOWE, G. A.; JANDER, G. Plant immunity to insect herbivores. **Annual review of plant biology**, v. 59, p. 41-66, 2008.

HYMOWITZ, T. On the domestication off the soybean. **Economic Botany**, v. 24, p. 408-421, 1970.

JONGSMA, M. A.; BOLTER, C. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **Journal Insect Physiology**, v. 43, n. 10, p. 885-895, 1997.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; DONOGHUE, M. J. **Sistemática vegetal, um enfoque filogenético**. Porto Alegre: Artmed, 2009.

KESSLER, A.; BALDWIN, I. T. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. **Science**, v. 291, p. 2142-2143, 2001.

KHAN, M.; FORD, J. The distribution and localization of digestive enzymes in the alimentary canal and salivary glands of the cotton stainer, *Dysdercus fasciatus*. **Journal of Insect Physiology**, v. 13, p. 1619-1628, 1967.

LARA, F.M. **Princípios de resistência de planta a inseto**. Livro Ceres. 1979.

LAUREMA, S.; VARIS, ANNA-LIISA; MIETTINEN, H. Studies on enzymes in the salivary glands of *Lygus rugulipennis* (Hemiptera, Miridae). **Insect Biochemistry**, v. 15, n. 2, p. 211-224, 1985.

LIU, Z. T.; BI, Y. L. Yield rise and potential of Heilongjiang soybean production in the perspective of science and technology progress. **Soybean Bull**, v. 80, p. 1-3, 2006.

LOURENÇÃO, A. L.; MIRANDA, M. A. C.; PEREIRA, J. C. V. N. A.; AMBROSANO, G. M. B. Resistência de soja a insetos. X. Comportamento de cultivares e linhagens em relação a percevejos e desfolhadores. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 26, n. 3, p. 543-550, 1997.

MACHADO, R. C. M. **Interação inseto-planta e suas implicações no manejo integrado de pragas**. 2009. 53 f. Especialização em “Tecnologias inovadoras no manejo integrado de pragas e doenças de plantas” – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2009.

MARINHO, J. S.; OLIVEIRA, M. G. A.; GUEDES, R. N. C.; PALLINI, A.

- OLIVEIRA, J. A. Resposta bioquímica de *Thyrntina leucoceraea* a inibidor de proteases em plantas de goiaba. **Idesia**, v. 28, n. 3, p. 101-109, 2010.
- MATSUMOTO, I.; ABE, K.; ARAI, S.; EMORI, Y. Functional expression and enzymatic properties of two *Sitophilus zeamais* cysteine proteinases showing different autolytic processing profiles in vitro. **Journal of Biochemistry**, v. 123, p. 693-700, 1998.
- MEHRABADI, M.; BANDANI, A. R.; DASTRANJ, M. Salivary digestive enzymes of the wheat bug, *Eurygaster integriceps* (Insecta: Hemiptera: Scutelleridae). **Comptes Rendus - Biologies**, v. 337, n. 6, p. 373-382, 2014.
- MEHRABADI, M.; BANDANI, A. R.; MEHRABADI, R.; ALIZADEH, H. Inhibitory activity of proteinaceous  $\alpha$ -amylase inhibitors from Triticale seeds against *Eurygaster integriceps* salivary  $\alpha$ -amylases: Interaction of the inhibitors and the insect digestive enzymes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 102, n. 3, p. 220-228, 2012.
- MENDONÇA, E. G.; OLIVEIRA, M. G. A.; VISÔTTO, L. E.; GUEDES, R. N. C.; RIBEIRO, F. R.; OLIVEIRA, J. A. Determinação da atividade enzimática e do número de bactérias associadas ao intestino médio da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*, criada em diferentes dietas. **Ceres**, v. 56, n. 1, p. 018-024, 2009.
- MENDONÇA, E. G.; VISÔTTO, L. E.; COSTA, N. C. S.; RIBEIRO, F. R.; OLIVEIRA, J. A.; OLIVEIRA, M. G. A. Caracterização enzimática de isoformas de cisteíno protease de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 3, p. 446-454, 2011.
- MILES, P. W. Feeding process of Aphidoidea in relation to effects on their food plants. In: MINKS, A. K.; HARREWIJN, P. (Eds) **Aphids, their Biology, Natural Enemies and Control**, Amsterdam: Elsevier Science Publishers. 1987. p. 321-335.
- MIRANDA, M. A. C.; BRAGA, N. R.; LOURENÇÃO, A. L.; MIRANDA, F. T. S. UNÊDA, S. H.; ITO, M. F. Descrição, produtividade e estabilidade da cultivar de soja IAC-24, resistente a insetos. **Bragantia**, v. 62, n. 1, p. 29-37, 2003.
- MITCHELL, P. L. Heteroptera as vectors of plant pathogens. **Neotropical Entomology**, v. 33, p. 519-545, 2004.
- MOREIRA, L. F. **Efeito do inibidor de serino-proteases, berenil, sobre a eficiência alimentar, atividade proteolítica e desenvolvimento pós-embrionário de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae)**. 2007. 104 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2007.
- MOSOLOV, V. V.; VALUEVA, T. A. Proteinase inhibitors and their function in plants: a review. **Applied Biochemistry Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 261-282, 2005.
- NAMIN, F. R.; NASERI, B.; RAZMJOU, J. Nutritional performance and activity of some digestive enzymes of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*, in response to seven tested bean cultivars. **Journal of insect science**, v. 14, n. 1, p. 93, 2014.
- NASERI, B.; FATHIPOUR, Y.; MOHARRAMIPOUR, S.; HOSSEININAVEH, V.; GATEHOUSE, A. M. R. Digestive proteolytic and amylolytic activities of *Helicoverpa armigera* in response to feeding on different soybean cultivars. **Pest Management Science**, v. 66, n. 12, p. 1316-1323, 2010.
- NASERI, B.; GOLIKHAJEH, N.; NAMIN, F. R. Digestive physiology and nutritional responses of *Autographa gamma* (L.) (Lepidoptera: Noctuidae) on different sugar beet cultivars. **Journal of insect science**, v. 16, n. 1, p. 1-8, 2016.

- NATION, J. L. **Insect physiology and biochemistry**. CRC press, 2008.
- OLIVEIRA, J. A. **Glândulas salivares de Podisus nigrispinus (Heteroptera: Pentatomidae): morfologia e enzimas**. 2004. 69 f. Tese (Doutorado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2004.
- OLIVEIRA, J. A.; OLIVEIRA, M. G. A.; GUEDES, R. N. C.; SOARES, M. J. Morphology and preliminary enzyme characterization of the salivary glands from the predatory bug *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 96, n. 3, p. 251-258, 2006.
- PAIXÃO, G. P.; LOURENÇÃO, A. L.; SILVA, C. R.; CORDEIRO, G.; BARROS, R. D. A.; OLIVEIRA, J. A. Active response of soybean to defoliator *Anticarsia gemmatilis* Hübner : strategies to overcome protease inhibitor production. **Idesia**, v. 34, n. 2, p. 69-75, 2016.
- PAIXÃO, G. P.; LOURENÇÃO, A. L.; SILVA, C. R.; MENDONÇA, E. G.; SILVA, P. L.; OLIVEIRA, J. A.; ZANUNCIO, J. C.; OLIVEIRA, M. G. A. Biochemical responses of *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) in soybean cultivars sprayed with the protease inhibitor berenil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 34, p. 8034-8038, 2013.
- PANIZZI, A. R., BUENO, A. F., SILVA, F. A. C. Insetos que atacam vagens e grãos. In: Hoffman-Campo CB, Corrêa-Ferreira BS, Moscardi F (Eds) **Soja: Manejo Integrado de Insetos e outros Artrópodes Praga**. Brasília: Embrapa, 2012. p. 335-420.
- PANIZZI, A. R.; SLANSKY JR, F. Review of phytophagous pentatomids (Hemiptera: Pentatomidae) associated with soybean in Americas. **Florida Entomologist**, v. 68, n. 1, p.184-203, 1985.
- PANIZZI, A. R.; SMITH, J. G.; PEREIRA, L. A. G.; YAMASHITA, J. Efeitos dos danos de *Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837)<sup>1</sup> no rendimento e qualidade da soja. **Anais do I Seminário Nacional de Pesquisa de Soja**, v. 2, p. 59-78, 1979.
- PANIZZI, A. R.; VIVAN, L. M. Seasonal abundance of the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros*, in overwintering sites, and the breaking of dormancy. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 82, n. 2, p. 213-217, 1997.
- PEIFFER, M.; FELTON, G. W. Insights into the saliva of the brown marmorated stink bug *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae). **Plos One**, v. 9, n. 2, p. e88483, 2014.
- PILON, A. M. **Resposta bioquímica da lagarta da soja ao inibidor de protease benzamidina e seus efeitos no desenvolvimento pós-embrionário**. 2004. 66 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2004.
- PILON, A. M. **Respostas bioquímica, fisiológica e comportamental de *Anticarsia gemmatilis* (lagarta-da-soja) ao inibidor de serino proteases benzamidina**. 2008. 85 f. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2008.
- 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, n. 1, p. 23-29, 2006.

- SILVA, V.; VAN DER WERF, H. M. G.; SPIES, A.; SOARES, S. R. Variability in environmental impacts of Brazilian soybean according to crop production and transport scenarios. **Journal of Environmental Management**, v. 91, n. 9, p. 1831-1839, 2010.
- RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.
- RIBEIRO, A. L. P.; COSTA, E. C. Desfolhamento em estádios de desenvolvimento da soja, cultivar BR 16, no rendimento de grãos. **Ciência Rural**, v. 30, n. 5, p. 767-771, 2000.
- ROCHA, F. A. D. **Atividade de proteases digestivas em larvas de Spodoptera cosmíodes e Spodoptera eridania tratadas com dieta artificial e folhas de soja e de algodão**. 2016. 25 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2016.
- ROSSETTO, C. J.; IGUE, T.; MIRANDA, M. A. C.; LOURENÇÃO, A. L. Resistência de soja a insetos: VI. Comportamento de genótipos em relação a percevejos. **Bragantia**, v. 45, n. 2, p. 323-335, 1986.
- ROSSETTO, C. J. **Resistência de plantas a insetos**. Piracicaba-SP, ESALQ-USP, 1973.
- SALUSO, A. XAVIER, L.; SILVA, F.; PANIZZU, A. An invasive pentatomid pest in Argentina: Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v. 40, n. 6, p. 704-705, 2011.
- SALVADORI, J. M. **Purificação parcial e caracterização das proteinases digestivas de *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae): papel na hidrólise da urease de *Canavalia ensiformis***. 2006. 87 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2006.
- SANTOS, O. S. **A cultura da soja – 1: Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná**. Globo, 1998.
- SARAN, P. E. **Manual de identificação de percevejos da soja**. Disponível em: <[http://www.fmcagricola.com.br:8080/Conteudo/publicacoes/arquivos/MANUALpercevejos\\_2\\_1.pdf](http://www.fmcagricola.com.br:8080/Conteudo/publicacoes/arquivos/MANUALpercevejos_2_1.pdf)> Acessado: 23 de fevereiro de 2017, [200-].
- SEDIYAMA, T.; PEREIRA, M. G.; SEDIYAMA, C. S.; GOMES, J. L. L. **Cultura da soja – Parte I**. Editora UFV, 1985.
- SEDIYAMA, T.; SILVA, F.; BORÉM, A. **Soja do plantio à colheita**. Editora UFV, 2015.
- SEDIYAMA, T.; TEIXEIRA, R. C.; BARROS, H. B. Origem, evolução e importância econômica. In: SEDIYAMA, T. (Ed.). **Tecnologias de produção e usos da soja**. Londrina: Mecenaz, p. 1-5, 2009.
- SILVA, C. E.; CARRÃO-PANIZZU, M. C.; MANDARINO, J. M. G.; OLIVEIRA, M. A.; LEITE, R. S.; OLIVEIRA, G. B. A.; MOREIRA, A. A.; SANTOS, H. M. C.; MÔNACO, A. P. A. Avaliação de ácidos graxos da soja: grão inteiro, casca, cotilédones e hipocótilo. In: JORNADA ACADÊMICA DA EMBRAPA SOJA, 5., Londrina. **Resumos...** Londrina: Embrapa Soja, 2010. 31-34. (Embrapa Soja. Documentos, 323). 2010.
- SILVA, F. A. C.; SILVA, J. J.; DEPIERI, R. A.; PANIZZU, A. R. Feeding activity,

salivary amylase activity, and superficial damage to soybean seed by adult *Edessa mediatubunda* (F.) and *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v. 41, n. 5, p. 386-390, 2012.

SILVA, P. L. **Resposta fitoquímica de soja ao ataque de *Anticarsia gmmatalis* e desenvolvimento do inseto alimentado com cultivares resistentes e susceptíveis**. 2015. 68 f. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2015.

SORKHABI-ABDOLMALEKI, S.; ZIBAEI, A. Secretagogue mechanism of digestive enzyme secretion in the midgut of *Andrallus spinidens* Fabricius (Hemiptera: Pentatomidae). **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 84, n. 2, p. 373-379, 2014.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; OMOTO C. Resistência a inseticidas e outros agentes de controle em artrópodes associados à cultura da soja, In: HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F (Ed.). **Soja: Manejo Integrado de Insetos e outros Artrópodes-Praga**. Brasília: Embrapa, 2013. p. 673-723.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; SILVA, J. J. DA. Neotropical brown stink bug (*Euschistus heros*) resistance to methamidophos in Paraná, Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 1, p. 767-769, 2010.

SOUZA, L. A.; BARBOSA, J.C.; GRIGOLLI, J. F. J.; FRAGA, D. F.; MALDONADO Jr, W.; BUSOLI, A. C. Spatial distribution of *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae) in soybean. **Neotropical Entomology**, v. 42, n. 4, p. 412-418, 2013.

SOYELU, O. L.; AKINGBOHUNGBE, A. E.; OKONJI, R. E. Salivary glands and their digestive enzymes in pod-sucking bugs (Hemiptera: Coreoidea) associated with cowpea *Vigna unguiculata* ssp. *unguiculata* in Nigeria. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 27, n. 1, p. 40-47, 2007.

PAINTER, R. H. **Insectresistance in cropplants**. New York. MacMillan, 1968.

PASCUAL-RUIZY, S.; CARRILLO, L.; ALVAREZ-ALFAGEMEYY, F.; RUIZ, M.; CASTANERA, P.; ORTEGO, F. The effects of different prey regimes on the proteolytic digestion of nymphs of the spined soldier bug, *Podisus maculiventris* (Hemiptera: Pentatomidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 99, p. 487-491, 2009.

VERHAGE, A.; VAN WEES, S. C. M.; PIETERSE, C. M. J. Plant immunity: It's the hormones talking, but what do they say? **Plant Physiology**, v. 154, n. 2, p. 536-540, 2010.

TECNOLOGIAS DE PRODUÇÃO DE SOJA. **Região Central do Brasil**, 2005. Londrina, Paraná: Embrapa Soja; Embrapa Cerrados; Embrapa Agropecuária Oeste, 2005. p. 239.

TECNOLOGIAS DE PRODUÇÃO DE SOJA. **Região Central do Brasil**, 2012 e 2013. Londrina, Paraná: Embrapa Soja; Embrapa Cerrados; Embrapa Agropecuária Oeste, 2011. p. 261.

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

- TERRA, W. F.; FERREIRA, C. Biochemistry and Molecular Biology of Digestion. In: GILBERT, L. L (Ed.). **Insect Molecular Biology and Biochemistry**. Amsterdam: Elsevier, 2012. p. 366-406.
- TERRA, W. R. Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 21, p. 675-734, 1988.
- TERRA, W. R., Evolution of digestive systems of insects. **Annual Review of Entomology**, v. 35, p. 181-200, 1990.
- TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Biochemistry of digestion. In: GILBERT, L. I., IATROV, K., GILL, S. (Org.). **Comprehensive Molecular Insect Science**, v. 4, p. 171-224, 2005.
- TIMBO, R. V.; HERMES-LIMA, M.; SILVA, L. P.; MEHTA, A.; MORAES, M. C. B.; PAULA, D. P. Biochemical aspects of the soybean response to herbivory injury by the brown stink bug *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae). **Plos One**, v. 9, n. 10, p. 1-9, 2014.
- TOMARELLI, R. M.; CHARNEY, J.; HARDING, M. L. The use of azoalbumin as a substrate in the colorimetric determination of peptic and tryptic activity. **Journal Laboratory Clinical Medical**, v. 34, n. 3, p. 428-433, 1949.
- TORRES, J. B.; BOYD, D. W. Zoophytophagy in predatory Hemiptera. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 5, p. 1199-1208, 2009.
- TREMACOLDI, C. R. Proteases e inibidores de proteases na defesa de plantas contra pragas. **Embrapa Amazônia Oriental**. Documentos, 2009.
- VOET, D., VOET, J. G. **Bioquímica**. Artmed, 2013.
- ZENG, F.; ZHU, Y.; COHEN, A. Partial characterization of trypsin-like protease and molecular cloning of a trypsin-like precursor cDNA in salivary glands of *Lygus lineolaris*. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 131, n. 3, p. 453-463, 2002.
- ZIBAE, A.; BANDANI, A. R. Effects of *Artemisia annua* L.(Asteracea) on the digestive enzymatic profiles and the cellular immune reactions of the Sunn pest, *Eurygaster integriceps* (Heteroptera: Scutellaridae), against *Beauveria bassiana*. **Bulletin of Entomological Research**, v. 100, n. 02, p. 185-196, 2010.
- ZIBAE, A.; FAZELI-DINAN, M.; LICENSE, C. A. Purification and characterization of a digestive lipase in *Naranga aenescens moore* (Lepidoptera: Noctuidae). **Entomological Studies**, v. 1, p. 33-48, 2012.