

FRANCELINA APARECIDA DUARTE ROCHA

**Lagartas de *Spodoptera cosmioides* e *Spodoptera eridania* apresentam  
distintas atividades proteolíticas em dieta natural e artificial**

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

VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2016

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

T

R672l  
2016  
Rocha, Francelina Aparecida Duarte, 1987-  
Lagartas de *Spodoptera cosmioides* e *Spodoptera eridania*  
apresentam distintas atividades proteolíticas em dieta natural e  
artificial / Francelina Aparecida Duarte Rocha. – Viçosa, MG,  
2016.  
vi, 21f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Maria Goreti de Almeida Oliveira.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.16-21.

1. Lagarta. 2. *Spodoptera cosmioides*. 3. *Spodoptera eridania*. 4. Atividade enzimática. 5. Digestão. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Animal. Programa de Pós-graduação em Entomologia. II. Título.

CDD 22 ed. 595.78139

FRANCELINA APARECIDA DUARTE ROCHA

**Lagartas de *Spodoptera cosmioides* e *Spodoptera eridania*  
apresentam distintas atividades proteolíticas em dieta natural  
e artificial**

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

APROVADA: 27 de julho de 2016.

---

Eliseu José Guedes Pereira  
(Coorientador)

---

Camila Rocha da Silva  
(Coorientadora)

---

Gláucia Cordeiro  
(Coorientadora)

---

Fabricio Rainha Ribeiro

---

Maria Goreti de Almeida Oliveira  
(Orientadora)

*Ao Bom Deus, por realizar os desejos mais profundo do meu coração.  
A minha mãe que com todo amor e carinho, sempre me incentivou a ser uma pessoa  
boa e a lutar pelos meus ideais, sem você eu não seria nada.  
Aos meus irmãos Divanir, Givanildo, Zenildo e Altair, por me deixar fazer parte das  
vidas de vocês e serem a prova mais viva do amor de Deus por mim.  
Vocês fizeram com que tudo fosse possível!*

*“O Bom Deus não poderia inspirar-me desejos  
irrealizáveis...” Santa Terezinha*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia pela oportunidade de realização do mestrado;

Ao povo Brasileiro que através do pagamento de impostos possibilitou que o CNPq me concedesse o apoio financeiro, sem o qual seria impossível continuar meus estudos;

À FAPEMIG e ao INCT-Interação Planta Praga pelo apoio financeiro;

À minha mãe Marta, por todo amor, carinho e pelas orações que foram fundamentais na conclusão deste trabalho!

Aos meus irmãos e minha sobrinha. Obrigado pelos almoços dos domingos, pelas boas risadas e por todo apoio e amor!

À professora Maria Goreti de Almeida Oliveira, pela orientação;

Ao professor Eliseu José Guedes Pereira pela coorientação, por ceder os insetos e sugestões ao trabalho;

À professora Camila Rocha da Silva pela coorientação, amizade, companhia nas viagens aos congressos e pelas boas risadas.

À doutora Gláucia pela coorientação, amizade e disponibilidade;

Ao doutor Fabrício, pelas sugestões apresentadas, amizade e disponibilidade.

Ao Carlos pela ajuda na criação das lagartas.

Aos amigos do Laboratório de Enzimologia: Verônica, Manuel, Jenny, Yaremis, Roberta, Juan, Neilier, Rafael, Thayara pela amizade, vocês tornaram este período mais leve, obrigada pelas boas risadas e agradável convivência;

À amiga Yaremis pela ajuda nos gráficos, tabelas e pela disposição.

Aos amigos, Marcela, Marcelo, Marcos, Tiago, que mesmo em meio a tantos trabalhos, disciplina, trouxe sorrisos e alegrias à minha vida. “Os melhores”

As amigas, Alexandra e Laura pelo apoio, incentivo, risos e ombros amigos para chorar, vocês estarão sempre comigo;

Ao meu marido Aldair, pelo incentivo, companheirismo, amor e apoio em todas as minhas decisões.

## RESUMO

ROCHA, Francelina Aparecida Duarte, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2016. **Lagartas de *Spodoptera cosmioides* e *Spodoptera eridania* apresentam distintas atividades proteolíticas em dieta natural e artificial.** Orientadora: Maria Goreti de Oliveira Almeida Coorientadores: Camila Rocha da Silva, Eliseu José Guedes Pereira e Gláucia Cordeiro.

*Spodoptera cosmioides* e *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae) são insetos causadores de prejuízos econômicos em importantes culturas, além disso, são capazes de modificar a atividade de suas enzimas proteolíticas de acordo com as dietas consumidas. Por isso, o conhecimento das enzimas digestivas e da adaptação destas à diferentes dietas tem se mostrado fundamental na criação de estratégias de controle de insetos-pragas baseadas no uso de inibidores de proteases. Neste trabalho determinamos as atividades específicas de tripsina, quimotripsina, cisteíno protease e proteases totais de *S. cosmioides* e *S. eridania* nas seguintes dietas: folhas de soja, de algodão e dieta artificial. Verificamos que as atividades enzimáticas destas lagartas tem perfis diferentes frente às dietas oferecidas. *Spodoptera cosmioides* quando alimentada com algodão apresentou maior atividade de tripsina, e a *S. eridania* apresentou atividades maiores que *S. cosmioides* quando alimentada com soja. Os maiores valores de atividades encontrados foram em tripsina e proteases totais, sugerindo que estas enzimas são as principais destes insetos e podem ser importantes alvos de inibição para o controle dos mesmos.

## ABSTRACT

ROCHA, Francelina A. Duarte Barros, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2016. **Digestive protease activity on larvae of *Spodoptera cosmioides* and *Spodoptera eridania* treated with artificial diet and soybean leaves and cotton.** Advisor: Maria Goreti de Oliveira Almeida Co-advisors: Camila Rocha da Silva, Eliseu José Guedes Pereira and Gláucia Cordeiro.

*Spodoptera cosmioides* and *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae) are insects that cause economic losses in important crops, and are able to modify an activity of their proteolytic enzymes according to diets consumed. Therefore, the knowledge of digestive enzymes and adaptation to different diets has been fundamental in the creation of insect-pest control strategies based on the use of protease inhibitors. In this work we determined as specific activities of trypsin, chymotrypsin, cysteine protease and total proteases of *S. cosmioides* and *S. eridania* in the following diets: soybean and cotton leaves and artificial diet. We verified that the enzymatic activities of these caterpillars have different profiles in front of the diets offered. *Spodoptera cosmioides* when fed with cotton showed higher trypsin activity, and *S. eridania* showed higher activities than *S. cosmioides* when fed with soybean. The highest values of activities found in researches and total proteases, suggesting that they are enzymes are the main of these insects and may be important for the definition to control them.

## Sumário

<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Material e Métodos.....</b>	<b>4</b>
2.1. Criação das lagartas .....	4
<b>2.2. Obtenção do extrato enzimático do intestino das lagartas .....</b>	<b>5</b>
2.3. Determinação da atividade amidásica e esterásica de tripsina- <i>like</i> .....	5
2.4. Determinação da atividade amidásica e esterásica de quimotripsina- <i>like</i> .....	6
2.5. Determinação de atividade de cisteíno proteases .....	6
2.6. Determinação da atividade de proteases totais do intestino das lagartas .....	7
2.7. Determinação da concentração das proteínas.....	7
2.8. Análises estatísticas.....	7
<b>3. Resultados .....</b>	<b>9</b>
<b>4. Discussão .....</b>	<b>13</b>
<b>5. Conclusões e considerações finais .....</b>	<b>15</b>
<b>6. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>16</b>

## 1. Introdução

Espécies do gênero *Spodoptera* Guenée 1852 (Lepidoptera: Noctuidae) incluem as mais expressivas pragas do continente americano, provocando reduções nos rendimentos agrícolas, devido à voracidade e presença em todos os estágios vegetativos (Pogue, 2002).

*Spodoptera cosmioides* (Walker, 1858) e *Spodoptera eridania* (Cramer, 1784), (Lepidoptera: Noctuidae), conhecidas popularmente como lagarta-da-vagem, lagarta-das-vagens ou simplesmente lagarta-preta, são pragas em expansão, devida a crescente incidência e intensidade de danos nos cultivos agrícolas (Santos 2007; Souza et al., 2013). Essas lagartas podem atacar as plantas logo após a sua emergência, causando redução da produtividade, devido ao severo desfolhamento e a perfuração das estruturas reprodutivas (botões florais, flores, maçãs e vagens). Por isso são consideradas espécies de importância econômica nas culturas de algodão (*Gossypium hirsutum*) (Santos, 2010), soja (*Glycine max*) (Souza et al., 2012) tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Pereira et al., 2009) feijão corda-de-viola (*Ipomoea acuminata*) (Santos et al., 2005) e de frutíferas, tais como o morango (*Fragaria viridis*) e a uva (*Vitis vinifera*) (Bortoli et al., 2012).

Apesar das defesas das plantas contra a fitofagia, muitos insetos ainda têm causado grandes prejuízos as diversas culturas, o que justifica a necessidade de realizar o seu controle populacional. Espécies de *Spodoptera* têm sido controladas através da utilização de inseticidas organossintéticos. Entretanto, estes produtos químicos têm baixa eficácia e falhas de controle são comuns devido à alta tolerância natural dessas pragas aos inseticidas (Diez-Rodríguez & Omoto, 2001; Carvalho et al., 2013). Além disto, a dependência deste método de controle pode provocar prejuízos financeiros, desequilibrar a cadeia alimentar, elevar pragas secundárias à categoria de pragas-chave, causar o surgimento de novas pragas e de pragas resistentes. Essas consequências têm fomentado estudos que propiciem métodos alternativos de controle (Sávio et al., 2008; Mills & Kean, 2010; Vianna et al., 2011).

Em resposta as injúrias causadas pelos herbívoros, às plantas evoluíram ao longo do tempo com diferentes mecanismos para reduzir os ataques, incluindo respostas específicas, que ativam diferentes vias metabólicas as quais alteram suas características químicas e físicas (Falco, 2001). Entre estas respostas estão à formação de compostos protéicos de defesa, como os inibidores de proteases (IPs), tendo como principal sinalizador o ácido jasmônico, um hormônio vegetal que induz a expressão de diversos genes relacionados com defesa a estresses (Wasternack et al., 2006). Os IPs são considerados agentes antimetabólicos, eles

interferem na digestão proteica dos insetos prejudicando a síntese de proteínas necessárias ao seu crescimento, desenvolvimento e reprodução (Pilon et al., 2006; Pilon et al., 2009; Scott et al., 2010; Moreira et al., 2011; Jamal et al., 2012).

Entre os IPs mais estudados estão os inibidores encontrados nas plantas da soja do tipo Kunitz (Onesti et al., 1991) e o Bowman-Birk (Song, 1998) que são encontrados em grandes quantidades nestas plantas. Estes IPs possuem especificidade para a inibição de tripsinas, sendo que o do tipo Bowman-Birk, também, inibe quimotripsinas (Liener, 1994; Gariani & Leatherbarrow, 1997). As plantas de algodão também produzem uma série de aldeídos-terpenos, como o gossipol, que também atua como IPs (Meisner, 1978; Souza et al., 2006).

Em contrapartida, os insetos fitófagos desenvolveram diferentes adaptações para contornar os efeitos negativos da ingestão de IPs produzidos pelas plantas hospedeiras (Moon et al., 2004). Dessa forma, no trato intestinal do inseto ocorrem mudanças quantitativas, que incluem o aumento dos níveis de proteases específicas ou generalistas para alcançar a taxa ideal da digestão de proteínas. Além disso, também podem ocorrer respostas qualitativas, que incluem a síntese de isoformas de proteases “insensíveis” que não são capazes de ligar-se ao IP ou que tenha a possibilidade de se ligar e degradar o IP (Bown et al., 2004; Srinivasan et al., 2006; Zhang et al., 2010; Jamal et al., 2012). O inseto pode combinar essas respostas adaptativas aos IPs, mas a adaptação só acontecerá se ele metabolizar com êxito a dieta e continuar o crescimento e desenvolvimento normalmente. Entretanto, como é difícil prever o destino de IPs ingeridos, as respostas de insetos também podem ser imprevisíveis, devido ao dinamismo e diversidade de proteases digestivas presente no seu trato intestinal (Srinivasan et al., 2006; Zhang et al., 2010; Jamal et al., 2012).

Assim, as proteases intestinais podem ser alvos de pesquisa sobre controle de insetos pragas devido à sua importante participação na hidrólise das ligações peptídicas de proteínas e liberação de aminoácidos necessários para o crescimento, sobrevivência, reprodução e degradação de proteínas tóxicas ingeridas de plantas (Mahdavi et al., 2013; Shi et al., 2013). A inibição destas proteases como as serino proteases (E.C. 3.4.21), que são as principais enzimas digestiva de Lepidoptera, pode diminuir cerca de 95% do total de atividade digestiva de insetos desta ordem (Srinivasan et al., 2006). Estes inibidores são reconhecidos como bioinseticidas e também são valiosos no desenvolvimento de novas moléculas (Kidd, 2000; Rosell et al., 2008). Estes tais compostos foram inicialmente explorados para geração de plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos pragas (Hilder & Boulter, 1999;

Abdeen et al., 2005) e também são objetos de atenção para o desenvolvimento de peptídeos miméticos com atividade inseticida (Pompermayer et al., 2001; Pilon et al., 2006; Nicholson, 2007). Tem sido demonstrado que a ingestão de IPs em dietas naturais e adicionados à dieta artificial retarda o crescimento e o desenvolvimento de insetos pragas, atuando com uma forma efetiva de controle (Gatehouse, 1999; Pilon et al., 2006; Moreira et al., 2011)

Entretanto, para que esta estratégia tenha sucesso são necessários estudos sobre o espectro total de proteases intestinais envolvidas no processo de adaptação do inseto aos inibidores (Jongsma & Bolter, 1997; Visôto et al., 2009a, b), bem como a capacidade destes herbívoros em modificar a atividade de suas proteases. Para isso, é importante considerar a bioquímica da sua digestão e o conhecimento do seu sistema de produção de proteases (Srinivasan et al., 2006). Uma vez que insetos polívoros como os do gênero *Spodoptera* têm demonstrado capacidade de modificar a expressão e atividade das suas enzimas digestivas, como proteases, amilases e lipases, de acordo com as dietas consumidas (Kotkar et al., 2012; Sarate et al., 2012). E há evidências que eles tenham enzimas digestivas complementares às utilizadas primariamente, em quantidades relativas que mudam também em resposta à composição da dieta (Terra & Ferreira, 1994).

Assim, buscando conhecer o perfil enzimático de *S. cosmioides* e *S. eridania* e as modificações da atividade de suas proteases em diferentes dietas, o objetivo deste trabalho foi determinar a atividade das enzimas digestivas destas lagartas, quando alimentadas com dietas naturais: folha de soja e algodão e dieta artificial.

## 2. Material e Métodos

A criação das lagartas foi conduzida no Laboratório de Criação de Insetos do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG. As análises enzimáticas foram realizadas no Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária BIOAGRO, da UFV, Viçosa, MG.

### 2.1. Criação das lagartas

As pupas de *S. cosmioides* e *S. eridania* foram obtidas do Laboratório de interação Inseto-Planta do Departamento de Entomologia - UFV. Os adultos de cada espécie foram mantidos em gaiolas (50 x 50 cm) fechadas lateralmente com tecido de organza e a parte da frente e de cima fechados com uma placa de vidro. Estes, foram alimentados com solução nutritiva composta de mel (10,5 g), cerveja (350 mL), sacarose (60 g), ácido ascórbico (1,05 g), nipagin (1,05 g) e água (1000 mL), embebida em algodão colocado sobre uma placa de Petri, no fundo da gaiola. As posturas das mariposas ocorreram após o terceiro dia, na superfície de folhas de papel A4 que revestia internamente as laterais da gaiola. Os ovos foram coletados a cada dois dias e armazenados em sacolas plásticas até a eclosão. Grupos de neonatas foram transferidos para copos plásticos de 500 mL até o 2º instar, sendo alimentados com as diferentes dietas: Dieta artificial (Greene et al., 1976), folhas de soja ou folhas de algodão. Após este período as lagartas das duas espécies foram separadas em potes de 100 mL, contendo duas lagartas da mesma espécie por pote. Para cada dieta havia 50 potes contendo duas lagartas de cada espécie de *Spodoptera*, totalizando 100 lagartas. Estes insetos continuaram a serem alimentados diariamente com dieta artificial, folhas de soja ou de algodão frescas previamente lavadas em água corrente. Os potes eram trocados a cada dois dias a fim de evitar a contaminação por fungos devido ao acúmulo de fezes. Quando atingiu o 5º instar, os intestinos de nove lagartas tratadas com cada dieta, escolhidas ao acaso, foram retirados para as análises das atividades enzimáticas. As folhas de soja utilizadas para alimentação das lagartas foram da variedade TMG 1264 RR e as de algodão eram da variedade FM 910, ambos cultivados sob condições de campo e foram coletadas no estádio V3 e V4.

## **2.2. Obtenção do extrato enzimático do intestino das lagartas**

Para o preparo do extrato enzimático, foram extraídos nove intestinos de cada espécie de lagartas, coletados aleatoriamente nas diferentes dietas. O extrato enzimático foi obtido através da maceração de três intestinos por vez de cada tratamento em almofariz e pistilo de porcelana, previamente resfriados, conforme Paixão et., al. (2013). Em seguida, adicionou-se 3 mL de HCl  $10^{-3}$  M (4°C) e o homogenato foi centrifugado a 10.000 g por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante, denominado extrato enzimático bruto, foi mantido em gelo e utilizado para as atividades enzimáticas e determinação da concentração de proteínas.

## **2.3. Determinação da atividade amidásica e esterásica de tripsina-like**

A atividade amidásica foi realizada pelo método descrito por Erlanger et al. (1961), utilizando-se o substrato cromogênico N-benzoil-L-arginil-p-nitroanilida (L-BAPNA) para enzimas tripsina-like. O substrato L-BAPNA foi preparado na concentração de 1,2 mM em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo  $\text{CaCl}_2$  20 mM, a 25°C. A mistura de reação continha 500  $\mu\text{L}$  do substrato, 500  $\mu\text{L}$  do tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo  $\text{CaCl}_2$  20 mM e 10  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático. O branco foi composto de 500  $\mu\text{L}$  do substrato e 510  $\mu\text{L}$  do tampão.

As velocidades iniciais foram determinadas através da medida de absorvância de 410 nm em função do tempo (2,5 minutos). Para os cálculos, utilizou-se o coeficiente de extinção molar de 8800 ( $\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) para o produto. As análises foram realizadas em triplicatas nas três repetições de cada tratamento.

A atividade esterásica foi realizada pelo método descrito por Hummel (1959), utilizando-se o substrato N- $\alpha$ -p-tosil-L-arginina metil éster (L-TAME) na concentração de 0,1 mM em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo  $\text{CaCl}_2$  20 mM, a 25°C. A mistura de reação continha 50  $\mu\text{L}$  do substrato, 950  $\mu\text{L}$  do tampão e 5  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático. O branco foi composto de 100  $\mu\text{L}$  do substrato e 905  $\mu\text{L}$  do tampão.

As velocidades iniciais foram determinadas através da medida da absorvância a 247 nm em função do tempo (2,5 minutos). Para os cálculos, utilizou-se o coeficiente de extinção molar de 540 ( $\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) do produto. As análises foram realizadas em triplicatas nas três repetições de cada tratamento.

#### **2.4. Determinação da atividade amidásica e esterásica de quimotripsina-like**

A determinação da atividade amidásica de quimotripsina foi realizada utilizando-se o substrato cromogênico N-Benzoil-L-tyrosine-p-nitroanilida (L-BTpNA) 60 mM diluído em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,2 com CaCl<sub>2</sub> 20 mM a 25°C, obtendo-se uma concentração final de substrato de 1,2 mM. A mistura reacional consistiu de 500 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0; 500 µL de substrato e 10µL de extrato enzimático. O branco foi composto de 500 µL do substrato e 510 µL do tampão.

As velocidades iniciais foram determinadas através da medida de absorvância de 410 nm em função do tempo (2,5 minutos). Para os cálculos, utilizou-se o coeficiente de extinção molar de 8800 (M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>) para o produto. As análises foram realizadas em triplicatas nas três repetições de cada tratamento.

A atividade esterásica foi determinada utilizando-se o substrato ATEE (NAcetyl-L-tyrosine ethyl ester monohydrate) na concentração final de 0,1 mM a 25°C, em tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,2 contendo CaCl<sub>2</sub> 20 mM. A mistura de reação continha de 500 µL do substrato, 500 µL do tampão e 10 µL do extrato enzimático. O branco foi composto de 500 µL do substrato e 510 µL do tampão.

As velocidades iniciais foram determinadas através da medida de absorvância a 247 nm por 2,5 minutos. Para os cálculos, utilizou-se o coeficiente de extinção molar de 8800 (M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>) para o produto. As análises foram realizadas em triplicatas nas três repetições de cada tratamento.

#### **2.5. Determinação de atividade de cisteíno proteases**

A atividade amidásica de cisteíno proteases foi realizada com base no método de Erlanger et al. (1961) e com modificações sugeridas por Mendonça et al. (2011). Usou-se 500 µL do substrato L-BapNA na concentração final de 0,5 mM, a 25°C e 500 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,2; contendo 20 mM de CaCl<sub>2</sub> e 5 mM de Ditioneitol (DTT) para garantir que o resíduo de cisteína esteja reduzido. Em 10 µL do extrato foi adicionado 100 µL do inibidor de serino-protease benzamidina na concentração final de 1 mM, a qual corresponde a constante de dissociação (ki) de tripsinas-like por benzamidina. O branco foi composto de 200 µL do substrato e 810 µL do tampão.

As velocidades iniciais foram determinadas através da medida de absorvância de 410 nm em função do tempo (2,5 minutos). Para os cálculos, utilizou-se o coeficiente de extinção

molar de 8800 ( $M^{-1}.cm^{-1}$ ) para o produto. As análises foram realizadas em triplicatas nas três repetições de cada tratamento.

## **2.6. Determinação da atividade de proteases totais do intestino das lagartas**

As atividades proteásicas foram determinadas segundo o método descrito por Tomarelli et al. (1949) utilizando-se azocaseína 2% (p/v) como substrato, em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo  $CaCl_2$  20 mM, 37°C. A mistura reacional continha 50  $\mu$ L de substrato e 60  $\mu$ L de extrato enzimático. Para o branco, utilizou-se água em substituição ao extrato enzimático e as reações foram incubadas a 37°C por 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 240  $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v). Após a parada de reação, as amostras foram homogeneizadas em vortex e mantidas em repouso em banho de gelo, por 15 minutos. Em seguida, foram centrifugadas a 10.000 g por cinco minutos a 25°C para remoção da proteína precipitada. Uma alíquota de 240  $\mu$ L do sobrenadante foi transferida para tubos de ensaio contendo 280  $\mu$ L de NaOH 1 M. A atividade foi determinada no sobrenadante com leituras de absorvâncias a 440 nm. As análises foram realizadas em triplicatas nas três repetições de cada tratamento.

## **2.7. Determinação da concentração das proteínas**

A concentração das proteínas totais no extrato enzimático bruto dos intestinos das lagartas foi determinada conforme metodologia de Bradford (Bradford, 1976), utilizando-se como padrão uma solução de 0,2mg/mL de soro albumina bovina (BSA). As análises foram realizadas em triplicatas nas três repetições de cada tratamento.

## **2.8. Análises estatísticas**

A condução do experimento foi em delineamento inteiramente casualizado do tipo fatorial 2 x 3 (espécies de inseto x tipos de dieta larval) com 3 repetições. Os resultados gerais das atividades foram submetidos a uma análise de variância multivariada (MANOVA) seguido por análises de variância univariada (ANOVA) para cada enzima. As pressuposições de normalidade dos resíduos e homocedasticidade das variâncias foram verificadas usando análise de resíduo no SAS (PROC MIXED seguido de PROC UNIVARIATE e PROC GPLOT). Para comparação das médias obtidas para cada enzima em cada teste utilizou-se o teste t, ou também chamado de procedimento da diferença mínima significativa de Fisher, ao

nível de 5% de significância, protegido por ANOVA. O processamento dos dados foi realizado com o software SAS (SAS Institute, 2013).

### 3. Resultados

No geral, a análise de variância multivariada para as atividades específicas do conjunto de enzimas estudadas variaram significativamente entre as espécies de *Spodoptera* (Wilks' Lambda = 0,020;  $F_{6,7} = 58,01$ ;  $p < 0,0001$ ) e foram afetadas pelas dietas ingeridas (Wilks' Lambda < 0,0001;  $F_{12,14} = 53,37$ ;  $p < 0,0001$ ). Também a interação entre os fatores foi significativa (Wilks' Lambda = 0,0001;  $F_{12,14} = 37,75$ ;  $p < 0,0001$ ), indicando que a atividade das enzimas digestivas dependeu de cada espécie de inseto e cada dieta em que suas larvas foram criadas.

Os resultados da análise de variância (ANOVA) para a atividade específica de cada enzima estão mostrados na Tabela 1. A interação entre os fatores dieta e espécie de inseto foi significativa ( $p < 0,05$ ) na atividade de tripsina amidásica e esterásica, quimotripsina amidásica e esterásica e proteases totais, indicando que essas enzimas tiveram atividades específicas variadas com a dieta e a espécie de insetos estudados. Somente para cisteíno protease não se observou interação significativa entre os fatores ( $p = 0,3595$ ), sendo que a atividade desta enzima variou entre as espécies de *Spodoptera* independente da dieta ou entre as dietas independentes da espécie de inseto.

A Figura 1 mostra a média e erro padrão das atividades específicas de tripsina esterásica (1A) e amidásica (1B), quimotripsina esterásica (1C) e amidásica (1D), cisteíno protease (1E) e proteases totais (1F), de cada inseto quando alimentado com cada dieta.

*Spodoptera cosmioides* apresentou sua maior atividade de tripsina esterásica quando alimentada com folhas de algodão dentre as dietas testadas (Figura 1B). Os mais altos níveis de atividade dessa enzima para *S. eridania* ocorreram nas lagartas criadas em dieta artificial, sendo que quando em folhas soja, a atividade dessa enzima nestes insetos foi três vezes maior em relação aos insetos de *S. cosmioides*. Para a atividade amidásica de tripsina, o mesmo padrão foi observado, porém os valores foram aproximadamente dez vezes menores do que para a atividade esterásica (Figura 1B).

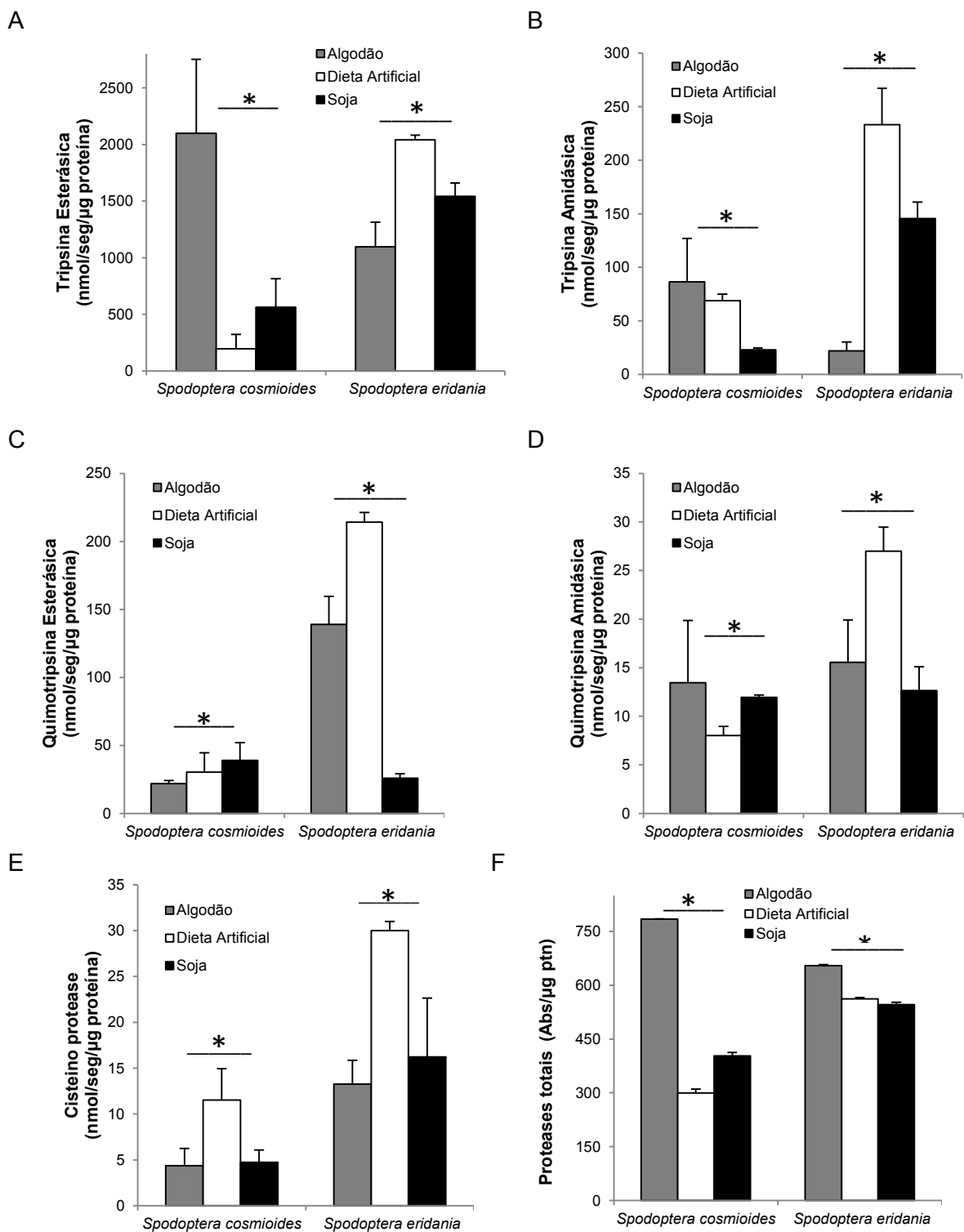
As duas lagartas apresentaram baixa atividade de quimotripsina (cerca de dez vezes menor que a atividade de tripsina). *Spodoptera cosmioides* apresentou baixa atividade de quimotripsina esterásica em todas as dietas, enquanto *S. eridania* apresentou maiores atividades quando alimentada com a dieta artificial e algodão. A atividade de quimotripsina amidásica foi cinco vezes menor que a esterásica (note a diferença de escala do eixo y dos gráficos que mostram a magnitude da atividade). Enquanto *S. cosmioides* manteve sua atividade baixa em todas as dietas, *S. eridania* manteve sua maior atividade em dieta artificial.

As atividades de cisteíno proteases das lagartas apresentaram padrão semelhante nas três dietas, isto é, as duas espécies de *Spodoptera* apresentaram maior atividade enzimática no intestino ( $p < 0.05$ ) quando as larvas foram alimentadas na dieta artificial (média  $\pm$  erro padrão, nmol/s/ug proteína:  $20,8 \pm 4,4$  na dieta artificial,  $10,5 \pm 3,92$  em folhas de soja e  $8,8 \pm 2,4$  em folhas de algodão). Além disto, os níveis de atividade destas proteases foram aproximadamente três vezes maiores em *S. eridania* (média  $\pm$  erro padrão:  $19,8 \pm 3,3$  nmol/s/ug proteína) em comparação a *S. cosmioides* ( $6,9 \pm 1,7$  nmol/s/ug proteína).

Na atividade total de proteases, *S. cosmioides* apresentou maior atividade que *S. eridania* quando alimentadas com folhas de algodão; Em contrapartida a *S. eridania* apresentou maiores atividades de proteases quando alimentadas com soja e dieta artificial comparado à *S. cosmioides*. Por fim, as duas espécies de lagarta apresentaram os maiores valores de atividade específica para proteases totais e tripsina esterásica.

**Tabela 1.** Resultados das análises de variância para atividades específicas de enzimas proteolíticas de *Spodoptera cosmioides* e *Spodoptera eridania*.

Fonte de Variação	Grau de Liberdade	Tripsina Amidásica		Tripsina esterásica		Quimotripsina amidásica		Quimotripsina esterásica		Cisteíno protease		Protease total	
		F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Inseto (A)	1	15,87	0,0018	5,82	0,0328	6,48	0,0256	95,41	0,0001	22,86	0,0004	263,87	0,0001
Dieta (B)	2	9,43	0,0035	1,86	0,1972	1,12	0,3585	27,95	0,0001	7,61	0,0073	1006,83	0,0001
A x B	2	14,27	0,0007	11,18	0,0018	4,25	0,0402	34,7	0,0001	1,12	0,3595	419,59	0,0001
Resíduo	12												



**Figura 1.** Atividade específica de enzimas digestivas de duas espécies de lagartas criadas em diferentes dietas. A) Tripsina esterásica. B) Tripsina amidásica. C) Quimotripsina esterásica. D) Quimotripsina amidásica E) Cisteino protease F) Proteases totais. Valores são médias  $\pm$  erro padrão. Barras com asteriscos diferem ( $p > 0,05$ ) pelo teste da diferença mínima de Fisher protegida por análise de variância.

#### 4. Discussão

A hipótese em estudo neste trabalho foi a de que insetos possuem diferentes perfis de atividades enzimáticas de acordo com as dietas consumidas para digerirem com êxito e nutrirem-se adequadamente. Tais modificações podem diferir entre espécies de insetos do mesmo gênero, devido às preferências por algum alimento e particularmente pela adaptação de cada um ao tipo de alimento ingerido. Foram encontradas variações entre as duas espécies do inseto e entre as dietas testadas.

As lagartas apresentaram diferentes atividades quando alimentadas com dieta de folhas de algodão que parece ter afetado heterogeneamente as atividades de enzimas digestivas em *S. cosmioides* e *S. eridania*. Enquanto ocorreu aumento da atividade esterásica de tripsinas e de proteases totais em *S. cosmioides*, para a *S. eridania* a atividade de quimotripsina e cisteíno proteases apresentaram maiores atividades comparado a *S. cosmioides*. Como plantas de algodão produzem um tipo de aldeído-terpeno, chamado gossipol, que também age como um IP (Lara, 1991; Calhoun, 1994), uma das adaptações dos insetos para contornar efeitos inibitórios do gossipol pode ser a superexpressão de proteases (Jongsma et al., 1994; Mosolov et al., 2008; Moreira et al., 2011). Entretanto, não podemos inferir que o aumento na atividade pode ser uma adaptação para aumentar o desempenho dos indivíduos, pois este poderia ser somente o perfil enzimático destas lagartas quando ingerem estas plantas e, além disso, é preciso que sejam avaliados os seus parâmetros biológicos para confirmar adaptação. Estudos com lagartas de *Spodoptera littoralis* alimentadas com plantas expressando inibidor de tripsina mostraram uma hiperprodução de peptídeos como forma de adaptação aos IPs, porém isto afetou o crescimento e peso do inseto (De Leo et al., 1998).

Diferentes genes de proteases podem ser ativados para atuar de forma coordenada para suprir as exigências nutricionais necessárias ao desenvolvimento do inseto, mesmo sob os efeitos antinutricionais dos IPs (Broadway, 1997; Ahn et al., 2009; Chi et al., 2009; Oppert et al., 2010; Jamal et al., 2012).

A soja teve maior efeito de inibição sobre as atividades enzimáticas de *S. cosmioides* em comparação a *S. eridania*, mostrando como estes insetos possuem adaptações diferentes as dietas. Uma hipótese explicativa para o ocorrido pode ser a

presença de um padrão de resposta eficiente em *S. eridania* para ambas as famílias de inibidores da soja e com isso ela não foi tão afetada por eles. Caso semelhante aconteceu com *Spodoptera frugiperda* em ensaios in vitro, em que esta lagarta tornou-se insensível aos inibidores SKTI e SBBI, sendo sugerido que isto pode ser mecanismo evolutivo que favorece seu alto grau de polifagia (de Oliveira et al. 2013). Outro estudo relata que *S. cosmioides* consome mais área foliar em soja (aproximadamente o dobro) que a *S. eridania* (Bortolotto et al., 2015), podendo ser pelo fato que *S. cosmioides* deve ingerir maior quantidade de alimento devido à menor eficiência do seu sistema digestivo, talvez por sua maior sensibilidade a inibidores de proteases em soja. Este tipo de alimentação compensatória é uma consequência esperada (Scriber e Slansky, 1981; Simpson e Simpson, 1990) a fim de compensar a biodisponibilidade de aminoácidos para a síntese de proteínas necessárias ao crescimento e desenvolvimento do inseto (Broadway e Duffey, 1986; Ryan, 1990).

*Spodoptera eridania* teve suas maiores atividades em quase todas as enzimas analisadas quando alimentada com a dieta artificial, com exceção das proteases totais onde ela apresentou maior atividade quando alimentada com o algodão. *Spodoptera cosmioides* apresentaram quase todas suas maiores atividades quando alimentada com algodão, exceto em quimotripsina esterásica e em cisteino protease, confirmando que estes insetos possuem diferentes perfis enzimáticos para diferentes dietas.

A atividade esterásica de tripsina e quimiotripsina das lagartas foram aproximadamente dez vezes maiores que a atividade amidásica dessas enzimas. Isto pode ser devido a uma maior afinidade destas enzimas pelo substrato L-TAME, a qual pode estar relacionada ao mecanismo da reação catalisada por serino proteases. Durante a atividade amidásica, as proteases apresentam a etapa de acilação com formação de acilenzima lenta, e a etapa de deacilação com formação de produto, rápida. Durante a atividade esterásica, a etapa de acilação é rápida e a deacilação é lenta. Assim, a etapa determinante da velocidade da reação de hidrólise de substratos amidas por enzimas tripsina-like é a de acilação com formação de acil-enzima, enquanto a etapa determinante da velocidade de hidrólise de substratos ésteres é a desacilação, com formação de produto (Inagami, 1971; Fastrez & Fersht, 1973).

## **5. Conclusões e considerações finais**

*S. cosmioides* e *S. eridania* tiveram suas atividades enzimáticas alteradas conforme as dietas, e as atividades de cada inseto apresentaram respostas diferentes a cada dieta ingerida.

Este é o primeiro trabalho analisando o perfil enzimático destas lagartas em diferentes dietas.

As maiores atividades destas lagartas encontradas em tripsina e proteases totais podem indicar que estas são as principais proteases digestivas destes insetos e deste modo são um importante alvo de inibição como controle destes insetos.

## 6. Referências Bibliográficas

- Abdeen, A., Virgos, A., Olivella, E., Villanueva, J., Aviles, X., Gabarra, R., Prat, S., Multiple insect resistance in transgenic tomato plants over-expressing two families of plant proteinase inhibitors. *Plant Molecular Biology* 57, 189 e 202. (2005).
- Ahn, J.E., Zhu-Salzman, K. CmCatD, a cathepsin D-like protease has a potential role in insect defense against a phytocystatin. *Journal of Insect Physiology* 55: 678–685. (2009).
- Bortoli, L. C., Bertin, A., Efrom, C. F. S., & Botton, M. Biology, fertility life table and effect of insecticides on *Spodoptera eridania* (Cramer)(Lepidoptera: Noctuidae) in strawberry and grape. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 34(4), 1068-1073. (2012).
- Bortolotto, O. C., Pomari, A. F., Bueno, R. C. O. D. F., Bueno, A. D. F., Kruz, Y. K. S. D., Queiroz, A. P., & Ferreira, R. B. The use of soybean integrated pest management in Brazil: a review. *Agronomy Science and Biotechnology*, 25-32. (2015).
- Bown DP, Wilkinson HS, Jongsma MA, Gatehouse JA. Characterization of cysteine proteinases responsible for digestive proteolysis in guts of larval western corn rootworm (*Diabrotica virgifera*) by expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Insect Molecular Biology* 34:305–320. (2004)
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, (1976).
- Broadway, R.M. Dietary regulation of serine proteinases that are resistant to serine proteinase inhibitors. *Journal of Insect Physiology*, v.43, p.855-874, (1997).
- Broadway, R.M., Duffey, S.S., Plant proteinase inhibitors: mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. *J. Insect Physiology* 32, 827–833. (1986).
- Calhoun, D.S.; et al. Registration of La. 850082 FN and La. 850075 FHG, two cotton germplasm lines resistant to multiple insect pests. *Crop Science*, v.34, p.316-317, (1994).
- Carvalho, R. A., Omoto, C., Field, L. M., Williamson, M. S., & Bass, C. Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *PLoS One*, 8(4), e 62268. (2013).
- Chi, Y.H., Salzman, R.A., Balfe, S., Ahn, J.E., Sun, W., Moon, J., Yun, D.J., Lee, S.Y., Higgins, T.J., Pittendrigh, B., Murdock, L.L., Zhu-Salzman, K., Cowpea bruchid midgut transcriptome response to a soybean cystatin costs and benefits of counter-defence. *Insect Molecular Biology* 18, 97–110. (2009).

De Leo, F., Bonadé-Bottino, M.A., Ceci, L.R., Gallerani, R., Jouanin, L., Opposite effects on *Spodoptera littoralis* larvae of a low and high expression level of a trypsin proteinase inhibitor in transgenic plants. *Plant Physiology*. 119, 997–1004. (1998).

de Oliveira, C. F. R., de Paula Souza, T., Parra, J. R. P., Marangoni, S., de Castro Silva-Filho, M., & Macedo, M. L. R. Insensitive trypsins are differentially transcribed during *Spodoptera frugiperda* adaptation against plant protease inhibitors. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 165(1), 19-25. (2013).

Diez-Rodríguez, G.I., Omoto, C., Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cialotrina. *Neotropical Entomology* 30, 11e316. (2001).

Erlanger, B. F.; Kokowsky, N.; Cohen, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 95, p. 271-278. (1961).

Falco, M. C., Marbach, P. A. S., Pompermayer, P., Lopes, F. C. C., & Silva-Filho, M. C. Mechanisms of sugarcane response to herbivory. *Genetics and Molecular Biology*, 24(1-4), 113-122. (2001).

Fastrez, J. & Fersht, A.R. Demonstration of the acyl-enzyme mechanism for the hydrolysis of peptides and anilides by chymotrypsin. *Biochemistry*. 12: 2025- 2034, (1973).

Gariani, T. and Leatherbarrow, R. J. Stability of protease inhibitors based on the Bowman-Birk reactive site loop to hydrolysis by proteases. *The Journal of Peptide Research*, 49: 467–475. (1997).

Gatehouse, A. M., Norton, E., Davison, G. M., Babbé, S. M., Newell, C. A., & Gatehouse, J. A. Digestive proteolytic activity in larvae of tomato moth, *Lacanobia oleracea*; effects of plant protease inhibitors in vitro and in vivo. *Journal of Insect Physiology*, 45(6), 545-558. (1999).

Greene, G. L.; Leppla, N. C.; Dickerson, W. A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *Journal of Economic Entomology*, v. 69, n. 4, p. 487-488, (1976).

Hilder, V.A., Boulter, D., Genetic engineering of crop plants for insect resistance e a critical review. *Crop Protection*. 18, 177e191. (1999).

Hummel, B.C.W. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, e trombin. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37 (12): 1393-1399, (1959).

Inagami, T. Trypsin. In: Funatsu, M.; Hiromi, K.; Imahori, K., Murachi, T.; Narita, K., ed. *Proteins structure and Function*. Tokio, Kodanska, p. 1-83. (1972).

Jamal, F.; Pandey, P.K.; Singh, D.; Khan, M.Y. Serine protease inhibitors in plants: nature's arsenal crafted for insect predators. *Phytochem Ver. Publicação online*: 14 novembro. (2012).

Jongsma, M. A., Bakker, P. L., Visser, B., & Stiekema, W. J. Trypsin inhibitor activity in mature tobacco and tomato plants is mainly induced locally in response to insect attack, wounding and virus infection. *Planta*, 195(1), 29-35. (1994).

Jongsma, M.A.; Bolter, C. The adaptations of insects to plant proteinase inhibitors. *Journal of Insect Physiology*.v.43, p.885-895, (1997).

Kidd, H., Human exposure to pesticide residues, natural toxins and GMOs e real and perceived risks. *Pesticide Outlook* 11, 215e216. (2000).

Kotkar H. M.; Bhide J. A.; Gupta S. V.; Giri P. A. Amylase gene expression patterns in *Helicoverpa armigera* upon feeding on a range of host plants. *Gene*. 501:1-7. (2012).

Lara, F.M. Princípios de resistência de plantas a insetos. São Paulo: Ícone, 336p. (1991).

Liener, Irvin E. "Implications of antinutritional components in soybean foods." *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* 34.1 31-67:(1994).

Mahdavi, A.; Ghadamyari, M.; Sajedi, R. H.; Sharifi, M.; Kouchaki, B. Identification and partial characterization of midgut proteases in the lesser mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis*. *Journal Insect Science*.13:81. (2013).

Meisner, J., Ishaaya, I., Ascher, K. R. S., & Zur, M. Gossypol inhibits protease and amylase activity of *Spodoptera littoralis* larvae. *Annals of the Entomological Society of America*, 71(1), 5-8. (1978).

Mendonça, E.G., Visôto, L.E., Costa, N.C.S., Ribeiro, F.R., DE Oliveira, J.A., de Almeida Oliveira, M.G. Enzymatic characterization of cysteine protease isoforms of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) [Caracterização enzimática de isoformas de cisteíno protease de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818)], *Ciencia e Agrotecnologia* Volume 35, Issue 3, May 2011, Pages 446-454, (2011).

Mills, N. J.; Kean, J. M. Behavioral studies, molecular approaches and modeling: Methodological contributions to biological control success. *Biology Control*. 52:255-262. (2010).

Moon, J., et al. Transcriptional regulation in cowpea bruchid guts during adaptation to a plant defence protease inhibitor. *Insect Molecular Biology* 13.3. 283-291. (2004).

Moreira, L. F.; Campos. W.G.; Ribeiro, F. R.; Guedes, R. N. C.; Oliveira, M. G. A. Survival and developmental impairment induced by the trypsin inhibitor bis-benzamide in the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*). *Crop Protection*, v. 30, n. 10, p. 1285-1290, (2011).

Mosolov, V. V., & Valueva, T. A. Proteinase inhibitors in plant biotechnology: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44(3), 233-240. (2008).

Nicholson, G.M. Fighting the global pest problem. *Toxicon* 49, 413e422. (2007).

Onesti, Silvia; Brick, Peter; BLOW, David M. Crystal structure of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Erythrina coffra* seeds. *Journal of molecular biology*, v. 217, n. 1, p. 153-176, (1991).

Oppert, B.; Elpidina, N., Toutges, M.; Mazumdar- Leighton, S. Microarray analysis reveals strategies of *Tribolium castaneum* larvae to compensate for cysteine and serine protease inhibitors *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D* 5 280–287, (2010).

Paixao, G. P., Lourenção, A. L., Silva, C. R., Eduardo G. Mendonça, E. G., Silva, P. L., Oliveira, J.A., Zanuncio, J. C., Oliveira, M. G. A. Biochemical responses of *Anticarsia gemmatalis* (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).

Pereira, J. M.; Seii, A. H.; Oliveira, M. F.; Brustolin, C.; Fernandes, O. M. Mortalidade de lagartas de *Spodoptera eridania* (Cramer) pela utilização de *Bacillus thuringiensis* (Berliner). *Pesquisa Agropecuária Tropical*. 39:140-143. (2009).

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

Pilon, A. M.; Oliveira, M. G. A.; Pilon, F. M.; Guedes, R. N. C.; Oliveira, J. A.; Fazollo, A. Adaptação da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepdoptera: Noctuidae) ao inibidor de protease benzamidina. *Revista Ceres*, v. 56, p. 744-748, (2009).

Pogue, G. M. A world revision of the genus *Spodoptera* (Guenée) (Lepidoptera: Noctuidae). *Memoirs of the American Entomological Society* 43: 1-202. (2002).

Pompermayer, P., Terra, W.R., Parra, J.R.P., Falco, M.C., Silva-Filho, M.C. Effects of soybean proteinase inhibitor on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. *Entomology Experimental and Applied*, v, 99, p, 79-85. (2001).

Rosell, G., Quero, C., Guerrero, A., Biorational insecticides in pest management. *Journal Pesticide Science*. 33, 103e121. (2008).

Ryan, C.A., Protease inhibitors in plants: genes for improving defences against insects and pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 28, 425e449. (1990).

Santos, K. B. Caracterização dos danos de *Spodoptera eridania* (Cramer) e *Spodoptera cosmioides* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) a estruturas de algodoeiro. *Neotropical Entomology*. 39:626-631. (2010).

Santos, K.B.; Neves, P.M.O.J.; Meneguim, A.M. Biologia de *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros. *Neotropical Entomology*, v.34, n.6, p.903-910, (2005).

Santos, W. J.. Manejo das pragas do algodão com destaque para o cerrado brasileiro, p.403-478. In Freire E C (ed) Algodão no cerrado do Brasil. Brasília, Associação Brasileira dos Produtores de Algodão, 918p, (2007).

Sarate, P.J.; Tamhane, V.A.; Kotkar, H.M. Ratnakaran, N.; Susan, N.; Gupta, V.S.; Girig, A.P. Developmental and digestive flexibilities in the midgut of a polyphagous pest, the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Journal Insect Science*. 12: 42. (2012).

SAS Institute. SAS user's manual, version 9.1. Cary, NC: SAS Institute, (2013).

Savio, G. M., Pinotti, E. B. Controle biológico da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*) por *baculovirus anticarsia*. *Revista científica eletrônica de Agronomia (FAEF)*. Ano VII – Nº 13 – Jun/Periódicos Semestral, (2008).

Scott, I. M.; Thaler, J. S.; Scott, J.G. Response of a Generalist Herbivore *Trichoplusiani* to Jasmonate-Mediated Induced Defense in Tomato *Journal Chemical Ecology*, 36:490–499, (2010).

Scriber, J.M., Slansky, F., The nutritional ecology of immature insects. *Annual Review Entomology* 26, 183e211. (1981).

Shi, M.; Zhu, N.; Yi, Y.; Chen, X. Four serine protease Cdnas from the midgut of *Plutella xylostella* and their proteinase activity are influenced by the endoparasitoid, *Cotesia vestalis*. *Arch. Insect Biochemistry Physiology* 83:101-114. (2013).

Simpson, S.J., Simpson, C.L., The mechanisms of nutritional compensation by phytophagous insects. In: Bernays, E.A. (Ed.), *Insect Plant Interactions*, vol. 2. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 111e160. (1990).

Song, H. K. & Suh, S. W. Kunitz-type soybean trypsin inhibitor revisited: Re@ned structure of its complex with porcine trypsin reveals an insight into the interaction between a homologous inhibitor from *Erythrina caffra* and tissue-type plasminogen activator. *Journal Molecular Biology* 275, 347-363 (1998).

Souza, B. H. S.; Boiça Junior, A. L.; Janini, J. C.; Silva, A. G.; Rodrigues, N. E. L. Feeding of *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae) on soybean genotypes. *Revista Colombiana de Entomologia*. 38: 215-223. (2012).

Souza, B.H.S.; Bottega, D.B.; Silva, A.G.; Boiça Junior, A.L. Feeding non-preference by *Spodoptera frugiperda* and *Spodoptera eridania* on tomato genotypes. *Ceres*, v.60, n.1, p.21-29, (2013).

Souza, D. M. M., et al. Identificação de genótipos de algodão (*Gossypium* spp.), quanto à presença de inibidores de protease. *Estudos Biológicos*, v. 28, n. 65, p. 97-103, out./dez. (2006).

Srinivasan, A.; Giri, A. P.; Gupta, V. S. Structural and functional diversities in lepidoptera serine proteases. *Cellular and Molecular Biology Letters*. 11:132-154. (2006).

Terra, W.R. & Ferreira, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 109 B (1): 1-62, (1994).

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, p. 428-433, (1949).

Vianna, U.R.; Pratisoli, D.; Zanuncio, J.C.; Alencar, J.R.C.C. DE; Zinger, F.D. Espécies e/ou linhagens de *Trichogramma* spp. (hymenoptera: trichogrammatidae) para o controle de *Anticarsia gemmatalis* (lepidoptera: noctuidae), *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.78, n.1, p.81-87, jan./mar., (2011).

Visôto, L. E., Oliveira, M.G.A, Ribon, A.O.B., Mares-Guia, T.R., Guedes, R.N.C. Characterization and identification of proteolytic bacteria from the gut of the velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal Entomology Ecology* 38(4): 1078-1085. (2009b).

Visôto, L. E., Oliveira, M.G.A., Guedes, R.N.C., Ribon, A.O.B. Good-God, P.I.V. Contribution of gut bacteria to digestion and development of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. *Journal of Insect Physiology* 55: 185–191. (2009a).

Wasternack, C., Stenzel, I., Hause, B., Hause, G., Kutter, C., Maucher, H., & Miersch, O. The wound response in tomato—role of jasmonic acid. *Journal of plant physiology*, 163(3), 297-306. (2006).

Zhang, C.; Zhou, D.; Zheng, S.; Lin, L.; Tao, S.; Yang, L.; Hu, S.; Feng, Q. A chymotrypsin-like serine protease cDNA involved in food protein digestion in the common cutworm, *Spodoptera litura*: Cloning, characterization, developmental and induced expression patterns, and localization. *Journal of Insect Physiology* 56:788–799. (2010).