

**JOEL ANTÔNIO DE OLIVEIRA**

**GLÂNDULAS SALIVARES DE *Podisus nigrispinus* (HETEROPTERA:  
PENTATOMIDAE): MORFOLOGIA E ENZIMAS**

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

**VIÇOSA**  
**MINAS GERAIS - BRASIL**  
**2004**

**JOEL ANTÔNIO DE OLIVEIRA**

**GLÂNDULAS SALIVARES DE *Podisus nigrispinus* (HETEROPTERA:  
PENTATOMIDAE): MORFOLOGIA E ENZIMAS**

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

APROVADA: Em 30 de julho de 2004

---

Dr. Maurílio José Soares  
(Coorientador)

---

Prof. José Eduardo Serrão  
(Conselheiro)

---

Prof. Sebastião Tavares de Rezende

---

Prof<sup>a</sup>. Marli Lourdes de Oliveira

---

Prof. José Cola Zanuncio  
(Orientador)

## **OFEREÇO**

Aos meus pais

José Francisco de Oliveira e Elza Augusto Alemão de Oliveira (In Memoriam)

## **DEDICO:**

A minha esposa Maria Goreti de A. Oliveira e a  
minha filha Layla Maria de A. Oliveira

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por minha vida e, também, pela única e verdadeira companhia diante de situações difíceis.

À minha mãe e meu pai que me fizeram acreditar nos meus ideais.

À Universidade Federal de Viçosa, pela contribuição em minha formação profissional e pessoal.

Ao Departamento de Química da UFV por possibilitar a realização do curso.

Ao professor José Cola Zanuncio pela orientação, cobranças e encorajamento.

Aos professores José Eduardo Serrão, Norivaldo dos Anjos e Raul Guedes pela ajuda e apoio no início do curso.

Ao Laboratório de Enzimologia por ter possibilitado a realização de parte deste trabalho.

Ao Agenor, Anderson Pilon e Eduardo por sua colaboração

Aos colegas de laboratório e de curso: Walter, José Milton, Rosenilson, Mábio, Germi, Fernando, Rômulo, Ulysses, Tobias, Edylene, Gláucia, Camila, Madú, Mábio, Júnior, Fabricio, Sheila, Evaldo, Aline e Paula.

Aos funcionários Antonio, José Cláudio, Lelis e Moacir, pela colaboração e boa vontade.

À secretária Maria Paula, pela competência profissional e amizade

À Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ pela oportunidade de realizar parte deste trabalho.

Ao Dr. Maurilio José Soares, por me receber no Laboratório de Biologia Celular de Microrganismos (LBCM), por sua amizade, compreensão e paciência.

Aos colegas do LBCM: Carolina, Cibele, Correa, Rosane, Jeane, Camila e Rodrigo, pelo convívio.

Às secretárias Lourdes e Cida e aos técnicos Genésio Farias e José Farias por sua sempre pronta colaboração.

## **BIOGRAFIA**

JOEL ANTÔNIO DE OLIVEIRA, filho de José Francisco de Oliveira e Elza Augusto Alemão de Oliveira, nasceu em Rio Vermelho, Minas Gerais, Brasil, em 23 de maio de 1950.

Ingressou, em 1974, no curso de Agronomia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, concluindo-o em dezembro de 1977, recebendo o título de Engenheiro Agrônomo.

Em junho de 1980 tornou-se Professor Auxiliar de Ensino, por Concurso Público, no Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa.

Em junho de 1989, concluiu o Mestrado em Agroquímica no Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais.

Em 01 de março de 2001 iniciou o curso de Doutorado em Entomologia no Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, defendendo tese em 30 de julho de 2004.

## ÍNDICE

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	ix
INTRODUÇÃO GERAL.....	01
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	06
CAPÍTULO 1: Morfologia das glândulas salivares do predador <i>Podisus nigrispinus</i> (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae).....	14
Resumo.....	15
Introdução.....	16
Material e Métodos.....	17
Resultados e Discussão.....	18
Referências Bibliográficas.....	23
CAPÍTULO 2: Caracterização bioquímica de enzimas hidrolíticas em extrato de glândulas salivares de <i>Podisus nigrispinus</i> (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae).....	45
Resumo.....	46
Introdução.....	47
Material e Métodos.....	48
Resultados.....	51
Discussão.....	52
Referências Bibliográficas.....	57

## RESUMO

OLIVEIRA, Joel Antônio, D.S. Universidade Federal de Viçosa, julho de 2004.  
**Glândulas salivares de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae):  
Morfologia e Enzimas.** Orientador: José Cola Zanuncio. Conselheiros: José  
Eduardo Serrão e Maria Goreti de Almeida Oliveira

O objetivo deste trabalho foi analisar a morfologia das glândulas salivares do predador *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851) (Heteroptera: Pentatomidae) e caracterizar a atividade bioquímico-enzimática dessas glândulas. *P. nigrispinus* apresenta um par de glândulas salivares principais e um de acessórias. Cada glândula principal é constituída por um lóbo anterior e um posterior sendo o anterior localizado na região do protórax. O lóbo posterior apresenta forma de saco alongado, translúcido com a porção próxima ao lóbo anterior dilatada. Entre esses lóbos existe uma forte constrição, caracterizando um hilo onde se inserem dois ductos, o excretor e o da glândula salivar acessória. As glândulas salivares principais e acessórias de *P. nigrispinus* são supridas por uma rede de traquéias. A ultraestrutura das glândulas salivares principais de *P. nigrispinus* mostrou que o epitélio do lóbo anterior está constituído por uma camada única de células achatadas com núcleo volumoso e predomínio de cromatina descondensada com porção apical apresentando microvilosidades curtas e irregulares. Mitocôndrias,

retículo endoplasmático rugoso, inclusões lipídicas, figuras mielínicas e grânulos de secreção com diferentes eletrondensidades se acumulam no citoplasma. O conteúdo do lúmen das glândulas salivares de *P. nigrispinus* é muito eletrondenso, mas apresenta inclusões esféricas e eletrontransparentes. Na porção mediana da célula verificou-se retículo endoplasmático rugoso, elementos do complexo de Golgi, mitocôndrias e corpos densos tomados como lisossomos. A porção basal da célula apresenta invaginações da membrana plasmática basal, mitocôndrias e vacúolos eletrontransparentes. A membrana basal apresenta uma túnica formada por células musculares e elementos traqueais. O epitélio do lóbo posterior é achatado com vesículas eletrontransparentes e cisternas do retículo endoplasmático rugoso. A porção apical da célula apresenta eliminação de porções do citoplasma para o lúmen preenchido por secreção eletrondensa e homogênea, enquanto a basal apresenta invaginações da membrana plasmática basal. O núcleo é irregular com cromatina condensada. Externamente há células musculares e traqueais. A porção secretora das glândulas salivares acessórias de *P. nigrispinus* apresenta uma camada única de células colunares com cutícula espessa e lúmen vazio. A porção apical da célula secretora tem microvilosidades curtas e irregulares com acúmulo de grânulos eletrondensos e vacúolos. A porção basal da célula é rica em mitocôndrias, com retículo endoplasmático rugoso, vacúolos e alguns grânulos eletrondensos. O núcleo, caracteristicamente, apresenta cromatina descondensada. A célula está assentada sobre uma fina membrana basal, sem células musculares externas. O epitélio do ducto das glândulas salivares acessórias de *P. nigrispinus* é mais baixo que na porção secretora, com citoplasma vacuolizado. A caracterização bioquímico-enzimática do extrato de glândulas salivares de *P. nigrispinus* mostrou atividades das enzimas digestivas amilase, lipase e proteases. A atividade específica de amilase sobre o amido e aquela da lipase sobre o tributirato de ditiopropanol apresentaram aumento linear com o aumento da concentração do substrato. A atividade proteásica, determinada sobre a azocaseína em concentrações de 0 a 0,6 mg/mL, apresentou curva hiperbólica seguindo a cinética Michaeliana. A

atividade específica tripsina-*like*, caracterizada com o substrato sintético L-BApNA em diferentes pH apresentou picos de atividade específica a pH 5,0 e 8,0, com maior atividade neste último. A atividade tripsina-*like*, a diferentes temperaturas, apresentou, picos de atividade a 25° C e 37,5° C. O efeito de inibidores, sobre a atividade esterásica, foi determinado em presença de benzamidina, um inibidor competitivo clássico de tripsina e do TLCK, inibidor irreversível desta enzima. Esses inibidores ocasionaram queda na atividade da tripsina-*like* com aumento da concentração dos mesmos, com redução de 65,2 e 70,9% nessa atividade, respectivamente. O gráfico de Michaelis-Mentem apresentou valor de  $K_m$  1,57 mM e  $V_{máx}$  0,166  $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$ . As glândulas salivares de *P. nigrispinus* contêm enzimas hidrolíticas, com pronunciada atividade catalítica que, possivelmente, estão envolvidas no processo de predação e fitofágico desse predador.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Joel Antônio . D. S. Universidade Federal de Viçosa, July 2004.  
**Salivary glands of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae):  
Morphology and Enzymes.** Advisor: José Cola Zanuncio. Committee  
members: José Eduardo Serrão and Maria Goreti de Almeida Oliveira.

The objective of this investigation was to analyze the morphology of the salivary glands of the predator *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851) (Heteroptera: Pentatomidae) and to characterize biochemical-enzymatic activity of these glands. *P. nigrispinus* presents a pair of main salivary glands and one pair of ancillaries. Each main gland is constituted by an anterior and one posterior lobe being the anterior located in the protoraxial region. The posterior lobe exhibit the format of an oblong sac, translucent with the proximal portion of the lobe dilated. Between these lobes exists a strong constriction, characterizing a hilum where two ducts are inserted, the excretory and the one of the ancillary salivary gland. The main and ancillary salivary glands of the *P. nigrispinus* are supplied by a net of tracheas. The ultra structure of the main salivary glands of *P. nigrispinnus* shows that the epithelium of the anterior lobe is constituted by a single layer of flattened cells with a bulky nucleus and a predominance of descondensed chromatin with the apical portion presenting short and irregular microvilosides. Mitochondria, creasy endoplasmatic reticules, fatty inclusions, myelin images and secretion granules with different electron densities accumulates in the cytoplasm. The lumen content of the salivary glands of the *P. nigrispinus* is very electron dense, but exhibits spherical and electron transparent inclusions. In the

median portion of the cell a creasy endoplasmatic reticule was detected, as well as elements of the Golgi complex, mitochondria and dense bodies considered as lisosomes. The basal portion of the cell exhibits invaginations of the basal plasmatic membrane, mitochondria and electron transparent vacuoles. The basal membrane presents a tunic formed muscular cells and tracheal elements. The epithelium of posterior lobe is flattened with electron transparent vesicles and cisterns of the creasy endoplasmatic reticule. The apical portion of the cell presents elimination of portions of the cytoplasm to the lumen filled by electron dense and homogeneous secretion, whereas the basal portion presents invaginations of the basal plasmatic membrane. The nucleus is irregular with condensed chromatin. Externally there are muscular and tracheal cells. The secretor portion of the ancillary salivary glands of the *P. nigrispinus* exhibits a single layer of columnar cells with thick cuticle and empty lumen. The apical portion of the secretor cell has short and irregular micromicrovilosides with accumulation of electron dense granules and vacuoles. The basal portion of the cell is rich in mitochondria, with creasy endoplasmatic reticule, vacuoles and some electron dense granules. The nucleus, characteristically, presents decondensated chromatin. The cell is settled on a thin basal membrane, with no external muscular cells. The epithelium of the ducts of the ancillary salivary glands of *P. nigrispinus* is lower than in the secretor portion, with vacuolated cytoplasm. The biochemical-enzymatic characterization of the extract of the salivary glands of *P. nigrispinus* exhibited activity of the digestive enzymes amylase, lipase and protease. The specific activity of the amylase on the starch and that of the lipase on dithiopropanol tributyrate exhibited linear increase with the concentration of the substrate. The protease activity, determined on azocaseine in concentrations from 0 to 0.6 mg/mL, exhibited a hyperbole curve following a Michaelian kinetics. The specific trypsine-like activity, characterized with the synthetic substrate L-BapNA at different pH's exhibited peaks of specific activity at pH 5.0 and 8.0, with a higher activity with respect to the latter. The trypsine-like activity, at different temperatures, exhibited activity peaks at

25°C and 37.5 °C. The effect of inhibitors on the stereostatic activity was determined in the presence of benzamidyne, a classic competitive inhibitor of trypsin and of TLCK, irreversible inhibitor of this enzyme. These inhibitors caused decrease in the activity of the trypsin-like with the increase of the concentrations of the same, with a reduction of 65.2 and 70.9 % of this activity, respectively. The Michaelis-Menten graph exhibited a value of  $K_M$  1.57 mM and  $V_{max}$  0.166 mM.s<sup>-1</sup>. The salivary glands of *P. nigrispinus* contain hydrolytic enzymes, with prominent catalytic activity that, possibly, are involved in the predatory and phytophagic process of this predator.

## **INTRODUÇÃO GERAL**

---

---

Percevejos predadores, como *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851) (Heteroptera: Pentatomidae), vem sendo utilizados em programas de controle biológico de lagartas desfolhadoras em áreas reflorestadas com eucalipto (ZANUNCIO *et al.*, 1994; 2000). Além da alimentação em presas, esses inimigos naturais utilizam plantas hospedeiras das mesmas como fonte de nutriente e umidade (ZENG & COHEN, 2000; LEMOS *et al.*, 2001; COLL & GUERSHON, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2002; EVANGELISTA *et al.*, 2003). Este comportamento fitofágico pode melhorar as características biológicas de percevejos predadores, como menor duração da fase ninfal e maior longevidade e fecundidade de suas fêmeas (NARANJO & GIBSON, 1996; MOLINA-RUGAMA *et al.*, 1997). Além disso, esse comportamento tem levado ao desenvolvimento de estudos enzimáticos para a comparação de fitofagia e zoofagia desses insetos (STAMOPOULOS *et al.*, 1993, COLL, 1995, COHEN, 1996). Alguns heterópteros, como *Lygus hesperus* Knight (Heteroptera: Miridae), considerados primariamente fitófagos por possuírem pectinase e amilase como pré-adaptação para alimentação em plantas, apresentam, também, enzimas digestivas especializadas à zoofagia, como fosfolipase (COHEN, 1996; AGUSTI & COHEN, 2000).

Percevejos podem ser classificados como zoofitófagos ou fitozoófagos, dependendo da importância da presa e da planta, respectivamente, no desenvolvimento e reprodução dessas espécies (COLL & GUERSHON, 2002). *P. nigrispinus* está incluído no grupo dos zoofitófagos, por ser dependente da alimentação em presas para seu desenvolvimento e apresentar melhores características biológicas em presença de plantas. A fitofagia favorece *P. nigrispinus* em escassez de alimento (ZANUNCIO *et al.*, 1993, OLIVEIRA *et al.*, 2002, EVANGELISTA *et al.*, 2004, MOURÃO *et al.*, 2004) ou com presas de baixa qualidade nutricional (VIVAN *et al.*, 2003). No entanto, percevejos predadores podem ser negativamente afetados por compostos secundários de defesas de plantas (TRAUGOUT & STAMP, 1997). Por outro lado, percevejos predadores do gênero *Podisus* podem ser beneficiados pela presença de plantas

na dieta (ZANUNCIO *et al.*, 1993, MOLINA-RUGAMA *et al.*, 1997, OLIVEIRA *et al.*, 2002), ou não (VALICENTE & O'NEIL 1995) pela presença de plantas na dieta dos mesmos.

A fitofagia deve-se a adaptações do aparelho bucal e do complexo enzimático digestivo de percevejos predadores, para torná-los aptos a exercerem, ocasionalmente, a fitofagia sem causar danos a plantas hospedeiras (COHEN, 1996). No entanto, o mecanismo do processo de digestão extra oral de percevejos predadores é, ainda, pouco estudado (COHEN, 1998).

Percevejos predadores, durante o ataque às presas, injetam enzimas produzidas em suas glândulas salivares as quais estão associadas à absorção de nutrientes e cujas secreções estão envolvidas na lubrificação e digestão dos alimentos (TERRA & FERREIRA, 1994; ALI, 1997). Essas glândulas apresentam grande diversidade de enzimas digestivas como  $\alpha$ -glicosidases,  $\beta$ -galactosidases, amilases, tripsina e lipase (ADEDIRE & BALOGUM, 1995). Quando presentes, proteases da saliva dos heterópteros são, na maioria das vezes, da classe das serino proteases (HORI, 1970; LAUREMA *et al.*, 1985; COHEN, 1993; GOODCHILD, 1996).

A fisiologia da digestão varia entre espécies de heterópteros de acordo com a fonte de alimento que utilizam (HABIBI *et al.*, 2001) e muitas espécies de percevejos usam a digestão extra oral com injeção de enzimas digestivas na presa antes de ingeri-la (COHEN, 1984; 1989; 1990; 1995; CHEESEMAN & GILLOTT, 1987; AMBROSE & MARAN, 2000). O mecanismo de alimentação de percevejos é do tipo sem refluxo, no qual enzimas digestivas, originadas nas glândulas salivares, são introduzidas nas presas para auxiliar a digestão (COHEN, 1990). Embora a presa seja consumida parcialmente, esses predadores apresentam alta eficiência com extração de, aproximadamente, 80% dos nutrientes da mesma (COHEN, 1989) e absorção de mais de 90% dos mesmos (COHEN, 1984; SWART & FELGENHAUER, 2003). Esta eficiência deve-se ao processo da digestão extra oral com seleção de estruturas da presa rica em nutrientes (COHEN, 1998), através da injeção de enzimas que atuam sobre

substratos específicos como proteínas, lipídeos, polissacarídeos e ácidos nucléicos (COHEN, 1998).

Os processos digestivos dos heterópteros predadores explicam adaptações bioquímicas, morfológicas e comportamentais altamente eficientes para utilização e ingestão de alimentos. A digestão extra oral é uma forma de preparação do alimento que transforma uma presa, muito grande, numa forma ingerível (KASPARI, 1990), sendo muito importante para heterópteros predadores e outros artrópodos (HESPENHEIDE, 1973; COHEN, 1990). Mais de 200 famílias de artrópodes apresentam espécies predadoras e 75% das mesmas utilizam a digestão extra oral, especialmente na sub-ordem Heteroptera (COHEN, 1995).

As glândulas salivares dos Hemiptera estão associadas com a ingestão de nutrientes e essas secreções estão, geralmente, envolvidas no processo de digestão e lubrificação dos alimentos (BAPTIST, 1941; ALI, 1997). A digestão extra-oral de percevejos predadores é facilitada por secreções de enzimas digestivas das glândulas salivares desses insetos (COHEN & WHEELER, 1998). A saliva pode dissolver o alimento e apresentar enzimas para iniciar a digestão, além de exercer funções adicionais em alguns insetos (TERRA & FERREIRA, 1994; ALI, 1997).

O tipo de enzimas digestivas, especialmente aquelas de origem salivar, está relacionado com o hábito alimentar de Heteroptera (BAPTIST, 1941; COHEN, 1995). As secreções das glândulas salivares dos insetos estão associadas e, geralmente, envolvidas no processo de digestão e lubrificação de alimentos (BAPTIST, 1941; ALI, 1997). As substâncias encontradas nas glândulas salivares podem ser usadas para caracterizar os hábitos alimentares dessas espécies (COHEN, 1993; ZENG & COHEN, 2000; BOYD Jr., 2003) e especialmente enzimas digestivas como proteases, hialuronidases e fosfolipases que propiciam a zoofagia (COHEN, 2000) e amilase e pectinase que favorecem a fitofagia (COHEN, 1996).

Várias enzimas digestivas foram identificadas e caracterizadas em heterópteros predadores (COHEN, 1993; ASHOURI *et al.*, 1998; AGUSTI & COHEN, 2000; COLEBATCH *et al.*, 2001; BOYD Jr. *et al.*, 2002; BOYD Jr., 2003; SWART & FELGENHAUER, 2003), mas percevejos fitófagos, (LAUREMA *et al.*, 1985; LAUREMA & VARIS, 1991; COHEN & WHEELER, 1998; COLEBATCH *et al.*, 2001; ZHU *et al.*, 2003) e hematófagos podem, também, apresentar proteases em suas glândulas salivares (SANTOS *et al.*, 1997; RIBEIRO *et al.*, 1998; AMINO *et al.*, 2001). A presença dessas proteases, especialmente tripsina-like, em glândulas salivares de percevejos predadores é bastante comum (AGUSTI & COHEN, 2000). *Daraeocoris nigritulus* (Uhler) e *Daraeocoris nebulosus* (Uhler) (Heteroptera: Miridae) apresentaram atividade de enzimas tripsina-like e quimiotripsina-like caracterizando essas espécies como fitozoófagos (BOYD Jr. *et al.*, 2002; BOYD Jr., 2003) e a presença da enzima pectinase em percevejos da família Miridae possibilita aos mesmos alimentarem-se em plantas (HORI, 2000). Os predadores *Nabis alternatus* Parshley (Heteroptera: Nabidae) e *Sinea confusa* Caudell (Heteroptera: Reduviidae) não apresentaram atividade amilásica em suas glândulas salivares, mas *Zelus renardii* Kolenati (Heteroptera: Reduviidae) apresentou alta atividade dessa enzima em extrato de suas glândulas (COHEN, 1996).

A grande variabilidade da constituição enzimática de glândulas salivares de percevejos predadores, com enzimas direcionadas a zoofagia e, também, a fitofagia, pode auxiliar no entendimento do mecanismo de alimentação desses inimigos naturais e na interação com plantas hospedeiras de suas presas.

Esta tese segue as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) com os seguintes capítulos:

1 Morfologia das glândulas salivares do predador *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae).

2 Caracterização bioquímica de enzimas hidrolíticas em extrato de glândulas salivares de *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEDIRE, C.O. & BALOGUM, R.A. Digestive enzymes and regional localisation of proteolytic endopeptidases in the alimentary canal of the kol a nut weevil, *Sophrorhinus inspiratus* Faust (Coleoptera: Curculionidae). *Entomon.*, 20(3-4): 183-189, 1995.

AGUSTI, N. & COHEN, A.C. *Lygus hesperus* and *Lygus lineolares* (Hemiptera: Miridae), phytophages, zoophages, or omnivores: Evidence of feeding adaptations suggested by the salivary and midgut digestive enzymes. *Journal of Entomological Science*, 25(2): 176 - 186, 2000.

ALI, D.W. The aminergic and peptidergic innervation of insect salivary gland. *Journal of Experimental Biology*, 200(14): 3-8, 1997.

AMBROSE, D.P. & MARAN, S.P.M. Polymorphic diversity in salivary and haemolymph proteins and digestive physiology of assassin bug *Rhynocoris marginatus* (Fab.) (Heteroptera: Reduviidae). *Journal of Applied Entomology*, 124(7-8): 315-317, 2000.

AMINO, R.; TANAKA, A.S. & SCHENKMAN, S. Triapsin, an unusual activatable serine protease from the saliva of the hematophagous vector of Chagas disease *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31(4-5): 465-472, 2001.

ASHOURI, A.; OVERNEY, S.; MICHAUD, D. & CLOUTIER, C. Fitness and feeding are affected in the two-spotted stinkbug, *Perillus bioculatus*, by the cysteine proteinase inhibitor, oryzastatin I. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 38(2): 74-83, 1998.

BAPTIST, B.A. The morphology and physiology of the salivary glands of Hemiptera-Heteroptera. Quarterly Journal of Microscopical Science, 83(1): 91-139, 1941.

BOYD, D.W. Digestive enzymes and stylet morphology of *Deraeocoris nigrifulus* (Uhler) (Hemiptera: Miridae) reflect adaptations for predatory habits. Annals of the Entomological Society of America, 96(5): 667-671, 2003.

BOYD Jr., D.W; COHEN, A.C. & ALVERSON, D.R. Digestive enzymes and stylet morphology of *Deraeocoris nebulosus* (Hemiptera: Miridae), a predacious plant bug. Annals of the Entomological Society of America, 95(3): 395-401, 2002.

CHEESEMAN, M.T. & GILLOTT, C. Organization of protein digestion in *Calosoma calidum* (Coleoptera: Carabidae). Journal of Insect Physiology, 33(1): 1-8, 1987.

COHEN, A.C. Food consumption, food utilization and metabolic rates of *Geocoris punctipes* fed *Heliothis virescens* eggs. Entomophaga, 29(1): 361-367, 1984.

COHEN, A.C. Ingestion efficiency and protein consumption of a heteropteran predator. Annals of the Entomological Society of America, 82(4): 495-499, 1989.

COHEN, A.C. Feeding adaptations of some predaceous heteropterans. Annals of the Entomological Society of America, 83(6): 1215-1223, 1990.

COHEN, A.C. Organization of digestion and preliminary characterization of salivary tripsin-like enzymes in a predaceous heteropteran, *Zelus renardii*. *Journal of Insect Physiology*, 39(10): 823-829, 1993.

COHEN, A.C. Extra-oral digestion in predaceous terrestrial arthropoda. *Annual Review of Entomology*, 40(1) : 85-103, 1995.

COHEN, A.C. Plant feeding by predatory Heteroptera: evolutionary adaptational aspects of trophic switching. In Alomar, O. & R.N. Wiedenmann (eds.), *Zoophytophagous Heteroptera: implications for life history and integrated pest management*. Lanham, Entomological Society of America, 202p. 1996.

COHEN, A.C. Biochemical and morphological dynamics and predatory feeding habits terrestrial Heteroptera. In: COLL, M. & J.R. Ruberson (eds.), *Predatory Heteroptera: their ecology and use in biological control*. Lanham, Entomological Society of America, 233p., 1998.

COHEN, A.C. How carnivorous bugs feed. In: C.W. SCHAEFER & PANIZZU, A.R. (Eds.), *Heteroptera of economic importance*. CRC, Boca Raton, pp. 563-570, 2000.

COHEN, A.G. & WHEELER, A.G. Jr. Role of saliva in the highly destructive fourlined plant bug (Hemiptera: Miridae: Mirinae). *Annals of the Entomological Society of America*, 91(1): 94 -100, 1998.

COLEBATCH, G.M.; EAST, P. & COOPER, P. Preliminary characterization of digestive proteases of a green mirid, *Creontiades dilutus* (Hemiptera: Miridae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31(4-5): 415-423, 2001.

COLL, M. Feeding and living on plants in predatory Heteroptera. In: COLL, M.; RUBERSON, J.R. (Ed.). *Predatory Heteroptera in agroecosystems: their ecology and use in biological control*. Lanham: Entomological Society of America, 1995. 233p.

COLL, M. & GUERSHON, M. Omnivory in terrestrial arthropods: mixing plant and prey diets. *Annual Review of Entomology*, 47(1): 267-297, 2002.

EVANGELISTA JR. W.S.; GONDIM JR., M.G.C.; TORRES, J.B. & MARQUES, E.J. Efeito de plantas daninhas e do algodoeiro no desenvolvimento, reprodução e preferência para oviposição de *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae). *Neotropical Entomology*, 32(4): 677-684, 2003.

EVANGELISTA JR. W.S.; GONDIM JR., M.G.C.; TORRES, J.B. & MARQUES, E.J. Fitofagia em *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) associada a plantas daninhas em algodoeiro . *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39(5): 413-420, 2004.

GOODCHILD, A.J.P. Evolution of the alimentary canal in the Hemiptera. *Biological Review* 41(1): 97-140, 1966.

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*, 98(3): 369-375, 2001.

HESPENHEIDE, H.A. Ecological inferences from morphological data. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 4(1): 213-229, 1973.

HORI, K. Some variations in the activities of salivary amylase and protease of *Lygus disponi* Linnavnorri (Hemiptera: Miridae). *Applied Entomology and Zoology*, 5(1):51-61, 1970.

KASPARI, M. Prey preparation and the determinants of handling time. *Animal Behavior*, 40(1): 118-126, 1990.

LAUREMA S. & VARIS A.L. Salivary amino-acids in *Lygus* species (Heteroptera, Miridae). *Insect Biochemistry*, 21(7): 759-765, 1991.

LAUREMA, S.; VARIS, A.L. & MIETTINEN, H. Studies on enzymes in the salivary glands of *Lygus rugulipennis* (Hemiptera: Miridae). *Insect Biochemistry*, 15(2): 211-224, 1985.

LEMOS, W.P.; MEDEIROS, R.S.; RAMALHO, F.S. & ZANUNCIO, J.C. Effects of plant feeding on the development, survival and reproduction of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae). *International Journal of Pest Management*, 47(2): 89-93, 2001.

MOLINA-RUGAMA, A.J.; ZANUNCIO, J.C. & TORRES, J.B. Longevidad y fecundidad de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) alimentado com *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) y frijol. *Revista de Biologia Tropical*, 45(3): 1125-1130, 1997.

NARANJO, S.E. & GIBSON, R.L. Phytophagy in predaceous Heteroptera: effects on life history and population dynamics, 57-93. In: WIEDENMANN, R. N.; ALOMAR, O. (Ed.). *Zoophytophagous Heteroptera: implications for life history and integrated pest management*. Lanham: Entomological Society of America, 1996. 202p.

OLIVEIRA, J.E.M., J.B. TORRES, A.F.C. MOREIRA & F.S. RAMALHO. Biologia de *Podisus nigrispinus* predando lagartas de *Alabama argillacea* em campo. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 37(1): 7-14, 2002.

RIBEIRO, J.M.C.; SCHNEIDER, M.; ISAIAS, T.; JURBERG, J.; GALVÃO, C. & GUIMARÃES, J.A. Role of salivary antihemostatic components in blood feeding by triatominae bugs (Heteroptera). Journal of Medical Entomology, 35(4): 599-610, 1998.

SANTOS, C.M.; JURBERG, J.; GALVÃO, C. & LENT, H. Análise morfológica do complexo salivar dos Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Entomología y Vectores, 4(5): 155-162, 1997.

STAMOPOULOS, D.C., DIAMANTIDIS, C. & CHLORIDIS, A. Activités enzymatiques du tube digestif du prédateur *Podisus maculiventris* (Hem.: Pentatomidae). Entomophaga 38: 493-499, 1993.

SWART, C.C. & FELGENHAUER, B.E. Structure and function of the mouthparts and salivary gland complex of the giant waterbug, *Belostoma lutarium* (Stål) (Hemiptera: Belostomatidae). Morphology, Histology and Fine Structure. Annals of the Entomological Society of America, 96(6): 870-882, 2003.

TERRA, W.R. & FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. Comparative Biochemistry and Physiology, 109B(1): 01-62, 1994.

TRAUGOTT, M.S. & STAMP, N.E. Effects of chlorogenic acid- and tomatine-fed caterpillars on performance of an insect predator. Oecologia, 109(2): 265-272, 1997.

VALICENTE, F.H. & O'NEIL, R.J. Effect of host plants and feeding regimes on selected life history characteristics of *Podisus maculiventris* (Say) (Heteroptera: Pentatomidae). *Biological Control*, 5(3): 449-461, 1995.

VIVAN, L.M.; TORRES, J.B. & VEIGA, A.F.S.L. Development and reproduction of a predatory stinkbug, *Podisus nigrispinus* in relation to two different prey types and environmental conditions. *BioControl*, 48(2): 155-168, 2003.

ZANUNCIO, J.C.; FERREIRA, A.T.; ZANUNCIO, T.V. & GARCIA, J.F. Influence of feeding on *Eucalyptus urophylla* seedlings on the development of the predatory bug *Podisus connexivus* (Hemiptera: Pentatomidae). *Medical Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent*, 58(2): 469-475, 1993.

ZANUNCIO, J.C.; ALVES, J.B.; ZANUNCIO, T.V. & GARCIA, J.F. Hemipterous predators of eucalypt defoliator caterpillars. *Forest Ecology and Management*, 65(1): 65-73, 1994.

ZANUNCIO, J.C.; ZANUNCIO, T.V.; GUEDES, R.N.C. & RAMALHO, F.S. Effect of feeding on three *Eucalyptus* species on the development of *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae) fed with *Tenebrio molitor* (Col.: Tenebrionidae). *Biocontrol Science and Technology*, 10(4): 443-450, 2000.

ZENG, F. & COHEN, A.C. Comparison of alpha-amylase and protease activities of a zoophytophagous and two phytozoophagous Heteroptera. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 126A(1): 101-106, 2000.

ZHU, Y.C.; ZENG, F. & OPPERT, B. Molecular cloning of trypsin-like cDNAs and comparison of proteinase activities in the salivary glands and gut of the

tarnished plant bug *Lygus lineolaris* (Heteroptera: Miridae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(9): 889-899, 2003.

## **CAPÍTULO I**

### **MORFOLOGIA DAS GLÂNDULAS SALIVARES DO PREDADOR *Podisus nigrispinus* (DALLAS) (HETEROPTERA: PENTATOMIDAE)**

---

---

**MORFOLOGIA DAS GLÂNDULAS SALIVARES DO PREDADOR**  
***Podisus nigrispinus* (DALLAS) (HETEROPTERA: PENTATOMIDAE)**

RESUMO – O sistema salivar de *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) é constituído por um par de glândulas principais e outro de glândulas acessórias, ambos localizados no tórax. As glândulas principais são bilobadas, o lóbo anterior é esférico e o posterior apresenta-se em forma de saco alongado aproximadamente quatro vezes mais longo que o anterior. Entre esses lóbos há uma constrição caracterizando um hilo onde se inserem dois ductos, o excretor e o da glândula salivar acessória. O ducto excretor insere-se próximo ao lóbo anterior da glândula principal e se funde com o ducto da outra glândula principal próximo ao estilete. As glândulas salivares principais e acessórias são supridas com uma densa rede de traquéias. O epitélio dos lóbos anterior e posterior das glândulas salivares principais de *P. nigrispinus* apresenta células achatadas com presença de mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso, microvilosidades curtas e irregulares. O núcleo das células do lóbo anterior é volumoso com predomínio de cromatina descondensada, enquanto que no lóbo posterior o núcleo das células apresenta forma irregular e cromatina condensada. A porção secretora da glândula salivar acessória de *P. nigrispinus* apresenta uma camada única de células colunares com cutícula espessa, com microvilosidades curtas e irregulares, havendo acúmulo de grânulos eletrondensos, mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso, vacúolos e o núcleo apresenta cromatina descondensada. No ducto da glândula salivar acessória de *P. nigrispinus*, o epitélio é mais baixo que na porção secretora, apresentando citoplasma vacuolizado, cuja porção apical emite longos prolongamentos finos até um espaço subcuticular preenchido por material eletrondenso.

PALAVRAS CHAVE: Glândulas salivares, Heteroptera, estereomicroscopia.

## INTRODUÇÃO

Os heterópteros predadores são importantes pelo seu potencial como agentes de controle biológico (DE CLERCQ, 2000). Esses predadores alimentam-se de presas e plantas devido a adaptações do aparelho bucal e do complexo enzimático dessas espécies (COHEN, 1990, 1995), o que possibilita a obtenção de umidade e nutrientes das plantas hospedeiras de suas presas (COHEN, 1996; LEMOS *et al.*, 2001; COLL & GUERSHON, 2002; EVANGELISTA *et al.*, 2003). Por isto, os percevejos são classificados como fitozoófagos ou zoofitófagos dependendo da importância da planta e da presa, respectivamente, para o desenvolvimento e reprodução desses inimigos naturais (COLL & GUERSHON, 2002).

O conhecimento do efeito de predadores em suas presas é necessário para estudos de ecologia de comunidades e aplicação do controle biológico de pragas (WHEELER, 2001). Entretanto, características do processo de digestão extra oral sugerem limitações potenciais para esses predadores (SWART & FELGENHAUER, 2003) e podem explicar o inter-relacionamento das adaptações morfológicas, comportamentais e bioquímicas para permitir maior eficiência no processo de utilização e ingestão de alimentos (COHEN, 1990).

As glândulas salivares dos Hemiptera estão associadas com a ingestão de nutrientes e suas secreções estão, geralmente, envolvidas no processo de digestão e lubrificação dos alimentos (BAPTIST, 1941; ALI, 1997). A digestão extra-oral de percevejos predadores é facilitada por secreções de enzimas digestivas das glândulas salivares desses insetos (COHEN & WHEELER, 1998). A saliva pode dissolver o alimento e apresentar enzimas para iniciar a digestão, além de exercer funções adicionais em alguns insetos (TERRA & FERREIRA, 1994; ALI, 1997).

As glândulas salivares de percevejos estão, normalmente, situadas no tórax com grande variação em número, tamanho e forma (BAPTIST, 1941). Estudos sobre a morfologia do sistema glandular de hemípteros tem sido realizados (BAPTIST, 1941; LOCOCO & HUEBNER, 1980; LACOMBE, 1999;

AZEVEDO *et al.*, 2003), especialmente sob o ponto de vista anatômico e ultraestrutural (KONIG *et al.*, 1993; LACOMBE, 1999; KOLSCH, 2000; GHANIM *et al.*, 2001; MEIRELLES *et al.*, 2003, REIS *et al.*, 2003).

O percevejo predador *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851) (Heteroptera: Pentatomidae) é uma espécie generalista utilizada em programas de manejo integrado de lagartas desfolhadoras de eucalipto no Brasil (ZANUNCIO *et al.*, 1994). Esse inimigo natural, além da alimentar-se de presas, exerce a fitofagia em plantas hospedeiras das mesmas (LEMOS *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2002; EVANGELISTA *et al.*, 2003). Devido à sua importância econômica e diversificação alimentar, o objetivo deste trabalho foi estudar a morfologia das glândulas salivares do predador *P. nigrispinus* com microscopia de luz e eletrônica de transmissão e varredura.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular de Microorganismos (LBCM) do Departamento de Ultraestrutura e Biologia Celular (DUBC) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) no Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. Indivíduos de *P. nigrispinus* foram obtidos de criação massal desse predador do laboratório de Controle Biológico de Insetos da Universidade Federal de Viçosa em Viçosa, Minas Gerais, onde são alimentados com pupas de *Tenebrio molitor* L., 1758 (Coleoptera: Tenebrionidae) em salas com temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $76 \pm 10\%$  de umidade relativa e fotoperíodo de 12:12h (L:E). Machos e fêmeas de *P. nigrispinus* foram imobilizados a  $-18^{\circ}\text{C}$  e as glândulas salivares foram retiradas com pinça em solução salina 0,1M (PBS), pH 7,2 e fixadas de acordo com a análise a ser realizada.

## **Anatomia**

As imagens de estereomicroscopia foram obtidas com as glândulas salivares de *P. nigrispinus* em solução salina. Essas glândulas foram fixadas durante duas horas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 e lavadas no tampão para microscopia eletrônica de varredura. Após isto, foram pós-fixadas durante 15 minutos em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão, desidratadas em série de acetona, secas em ponto crítico, metalizadas com uma camada de ouro de 20 nm e observadas em microscópio eletrônico de varredura Zeiss DSM 940.

## **Ultra-estrutura**

Glândulas salivares de *P. nigrispinus* foram fixadas durante duas horas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2, pós-fixadas durante 15 minutos em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,1 M com 0,8% de ferricianeto de potássio e 5 mM de CaCl<sub>2</sub>, desidratadas em série de acetona e embebidas, durante 24 horas, em uma mistura 1:1 de acetona e resina epon (PolyBed). À seguir, a mistura foi substituída por epon puro e polimerizada durante 48 horas a 60°C. Secções ultra-finas foram obtidas em ultra-micrótomo, contrastadas em citrato de chumbo e acetato de uranila a 5% e observadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM10C.

# **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## **Anatomia**

O sistema salivar de *P. nigrispinus* é constituído por um par de glândulas principais e outro de glândulas acessórias localizadas no tórax, de forma semelhante ao relatado para outros Heteroptera (BAPTIST, 1941; SWART & FELGENHAUER, 2003) e Auchenorrhyncha (AMMAR, 1986) embora existam exceções como verificado para *Triatoma infestans* apresentando três pares de

glândulas salivares (LOCOCO & HUEBNER, 1980; KONIG *et al.*, 1993; LACOMBE, 1999).

As glândulas salivares principais de *P. nigrispinus* são bilobadas, com o lóbo anterior esférico quando a glândula está cheia e apresentando coloração escura (Fig. 1A). Esse lóbo está localizado na região do protórax e projeta-se em direção à cabeça onde termina em fundo cego. O lóbo posterior das glândulas salivares principais apresenta forma de saco alongado com cerca de quatro vezes mais longo que o lóbo anterior, conteúdo translúcido e porção próxima ao lóbo anterior dilatada (Figs 1A e 2A). Entre os dois lóbos das glândulas salivares principais de *P. nigrispinus* há uma forte constrição, caracterizando um hilo onde se observa a inserção de dois ductos finos e independentes (Fig. 2B). Esta descrição assemelha-se àquela para *Pentatoma rufipes* L. (Heteroptera: Pentatomidae) (BAPTIST, 1941).

O ducto excretor das glândulas salivares principais se insere próximo ao lóbo anterior da mesma e se prolonga em direção à cabeça onde se funde com o outro ducto, do segundo par de glândula, próximo ao estilete.

O ducto que se insere próximo ao lóbo posterior, direciona-se para o mesotórax e apresenta dobras pouco regulares em forma de “U” nos 2/5 proximais de sua extensão (Figs. 1A e 2C). A partir desta extensão, o ducto acessório torna-se liso e se projeta em direção à cabeça onde, novamente, emerge em direção ao tórax. O ducto acessório sofre um abaulamento em sua porção final, constituindo a porção secretora da glândula acessória, a qual está aderida à porção terminal do lóbo posterior daquela glândula por uma fina traquéia (Figs. 2A, 3C e 3D). As glândulas salivares principais e acessórias de *P. nigrispinus* são supridas por uma rede de traquéias (Figs. 3C e 3D) como verificado para muitos percevejos (BAPTIST, 1941). No entanto, essas traquéias estão presentes, apenas, nas glândulas principais de diversas espécies Triatominae (LACOMBE, 1999).

## Ultra-estrutura

O epitélio do lóbo anterior das glândulas salivares principais de *P. nigrispinus* está constituído por uma camada única de células achatadas com núcleo volumoso e predomínio de cromatina descondensada (Fig. 5). A porção apical da célula mostra muitas microvilosidades curtas e irregulares (Figs. 4 e 5). No citoplasma apical há acúmulo de mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso, inclusões lipídicas, figuras mielínicas e grânulos de secreção com diferentes eletrondensidades (Fig. 5). Alguns grânulos de secreção apresentam conteúdo com eletrondensidade intensa e parecem ser eliminados por essas microvilosidades (Fig. 4). O conteúdo do lúmen das glândulas salivares de *P. nigrispinus* é muito eletrondenso, mas apresenta inclusões esféricas e eletrontransparentes (Figs. 4 e 5). A porção mediana da célula apresenta uma densa rede de retículo endoplasmático rugoso, elementos do complexo de Golgi, mitocôndrias e corpos densos tomados como lisossomos (Fig. 6). A porção basal da célula é caracterizada por invaginações curtas da membrana plasmática basal, algumas mitocôndrias e grandes vacúolos eletrontransparentes similares a endossomos (Figs. 6, 7 e 8). Externamente à membrana basal há uma túnica formada por células musculares e elementos traqueais (Fig. 12). Observa-se a presença de células de linhagem hemocitária semelhantes a plasmatócitos aderidos à membrana basal, as quais são caracterizadas por núcleo volumoso e pouco citoplasma (Figs. 7 e 8). A presença de células musculares no lóbo anterior de *P. nigrispinus* sugere que esse predador mobilize grande quantidade de saliva a partir desse lóbo como relatado para Heteropteros por BAPTIST (1941). A presença de citoplasma com bastante retículo endoplasmático rugoso (RER) foi, também, verificado para outros Hemiptera. *Peregrinus maidis* (Ashmead) (Auchenorrhyncha: Delphacidae) apresenta, bastante, RER em seu citoplasma e células musculares nos lóbos anterior e posterior. Isto foi relatado, aparentemente, apenas para a Sub-ordem Auchenorrhyncha (AMMAR, 1986), mas a presença dessas células musculares foi constatada nos lóbos anteriores e posteriores das glândulas salivares de *P. nigrispinus*.

O epitélio do lóbo posterior das glândulas salivares principais de *P. nigrispinus* é achatado e repleto de vesículas eletrtransparentes e cisternas do retículo endoplasmático rugoso (Figs. 9 e 10). A porção apical da célula, freqüentemente, se destaca pela eliminação de grandes porções do citoplasma para o lúmen preenchido por secreção eletrdensa e homogênea (Figs. 9 e 12). A porção basal da célula apresenta poucas invaginações da membrana plasmática basal e está assentada sobre uma espessa e eletrodensa membrana basal (Fig. 10). O núcleo é, bastante, irregular com regiões extensas de cromatina condensada (Fig. 11). Externamente há células musculares e traqueais (Fig. 12).

A porção secretora das glândulas salivares acessórias de *P. nigrispinus* está constituída por uma camada única de células colunares com cutícula espessa delimitando um lúmen vazio (Fig. 13). A cutícula que delimita o lúmen apresenta uma fina epicutícula externa e uma endocutícula de aspecto fibroso com reforços eletrdensos (Figs. 13 e 14). A porção apical da célula secretora tem muitas microvilosidades curtas e irregulares com acúmulo de grânulos eletrdensos e vacúolos (Fig. 14). A porção basal da célula é rica em mitocôndrias, com retículo endoplasmático rugoso, vacúolos e alguns grânulos eletrdensos (Figs. 15). O núcleo, caracteristicamente, apresenta cromatina descondensada (Fig. 8). A célula está assentada sobre uma fina membrana basal, sem células musculares externas.

O epitélio do ducto das glândulas salivares acessórias de *P. nigrispinus* é mais baixo que na porção secretora, com citoplasma bastante vacuolizado, cuja porção apical emite longos prolongamentos finos até um espaço subcuticular preenchido por material eletrdenso, seguindo-se uma epicutícula laminar espessa e uma fina epicutícula delimitando o lúmen que se mostra vazio (Figs. 16 e 17).

As glândulas salivares acessórias e seus ductos em percevejos podem ter caráter secretor (BAPTIST, 1941). A análise anatômica e histológica das glândulas salivares acessórias de *P. nigrispinus* sugere que suas células,

possivelmente, estejam associadas à secreção e transporte de substâncias à partir da hemolinfa. Estudos realizados com *Poecilometis punctiventris* (Stal) (Heteroptera: Pentatomidae) mostraram que as glândulas salivares acessórias dessa espécie sejam responsáveis pela produção aquosa da saliva e a mesma transporte proteínas de, até, 40kDa da hemolinfa para os ductos (MILES & SLOWIAK, 1970; 1976).

De forma geral, a morfologia e a histologia das glândulas salivares do predador *P. nigrispinus* assemelha-se às das demais espécies de percevejos estudadas, embora poucos estudos dessa natureza tenham sido realizados.

### **AGRADECIMENTOS**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMMAR, E.D. Ultrastructure of the salivary glands of the planthopper, *Peregrinus maidis* (Ashmead) (Homoptera: Delphacidae). International Journal of Insect Morphology and Embryology, 15 (5/6): 417-428, 1986.

ALI, D.W. The aminergic and peptidergic innervation of insect salivary gland. Journal of Experimental Biology, 200 (14): 3-8, 1997.

AZEVEDO, D.O.; SERRÃO, J.E.; ZANUNCIO JR., J.S.; MARTINS, G.F.; ZANUNCIO, J.C.; MARQUES-SILVA, S. & SOSSAI, M.F. Structure and protein pattern in the salivary gland of the obligate zoophytophage stinkbug *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae). Acta Microscopica, 12B, 2003. XIX Congress of the Brazilian Society for Microscopy and Microanalysis.

BAPTIST, B.A. The morphology and physiology of the salivary glands of Hemiptera-Heteroptera. Quarterly Journal of Microscopical Science, 83 (1): 91-139, 1941.

COHEN, A.C. Feeding adaptations of some predaceous heteropterans. Annals of the Entomological Society of America, 83(6): 1215-1223, 1990.

COHEN, A.C. Extra-oral digestion in predaceous terrestrial arthropoda. Annual Review of Entomology, 40(1): 85-103, 1995.

COHEN, A.C. Plant feeding by predatory Heteroptera: evolutionary adaptational aspects of trophic switching. In Alomar, O. & R.N. Wiedenmann (eds.), Zoophytophagous Heteroptera: implications for life history and integrated pest management. Lanham, Entomological Society of America, 202p., 1996.

COHEN, A.G. & WHEELER, A.G. Jr. Role of saliva in the highly destructive fourlined plant bug (Hemiptera: Miridae: Mirinae). Annals of the Entomological Society of America, 91 (1): 94 -100, 1998.

COLL, M. & GUERSHON, M. Omnivory in terrestrial arthropods: mixing plant and prey diets. Annual Review of Entomology, 47(1): 267-297, 2002.

DE CLERCQ, P. Predaceous stinkbugs (Pentatomidae: Asopinae). In: C.W. SCHAEFER & PANIZZI, A.R. (Eds.), Heteroptera of economic importance. CRC, Boca Raton, pp. 737-789, 2000.

EVANGELISTA JR. W.S.; GONDIM JR., M.G.C.; TORRES, J.B. & MARQUES, E.J. Efeito de plantas daninhas e do algodoeiro no desenvolvimento, reprodução e preferência para oviposição de *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae). Neotropical Entomology, 32 (4): 677-684, 2003.

GHANIM, M.; ROSSELL, R.C.; CAMPBELL, L.R.; HENRYK, C. BROWM, J.K. & ULLMAN, D.E. Digestive, salivary and reproductive organs of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) B type. Journal of Morphology, 248 (1): 22-40, 2001.

KOLSCH, G. The ultrastructure of glands and the production and function of the secretion in the adhesive capture apparatus of *Sternus* species (Coleoptera: Staphylinidae). Canadian Journal of Zoology, 78 (3): 465-475, 2000.

KONIG, B. Jr.; MASUKO, T.S. & ROSENBERG, B. Scanning electron microscopy of the *Rhodnius neglectus* (Hemiptera) labial salivary glands after starvation. Anatomischer Anzeiger, 175(5):411-416, 1993.

LACOMBE, D. Anatomia e histologia das glândulas salivares nos triatomíneos. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 94(4): 557-564, 1999.

LEMOS, W.P.; MEDEIROS, R.S.; RAMALHO, F.S. & ZANUNCIO, J.C. Effects of plant feeding on the development, survival and reproduction of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae). International Journal of Pest Management, 47 (2): 89-93, 2001.

LOCOCO, D. & HUEBNER, E. The ultrastructure of the female accessory gland, the cement gland, in the insect *Rhodnius prolixus*. Tissue & Cell, 12(3): 557-580, 1980.

MEIRELLES, R.M.; RODRIGUES I.S.; STEINDEL, M. & SOARES, M.J. Ultrastructure of the salivary glands of *Rhodnius domesticus* Neiva & Pinto, 1923 (Hemiptera: Reduviidae). Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology, 35(2):199-207, 2003.

MILES, P.W. & SLOWIAK, D. Transport of whole protein molecules from blood to saliva of a plant-bug. Experientia 26 (6): 611-612, 1970.

MILES, P.W. & SLOWIAK, D. The accessory salivary gland as the source of water in the saliva of Hemiptera: Heteroptera. *Experientia*, 32 (8): 1011-1012, 1976.

OLIVEIRA, J.E.M.; TORRES, J.B.; MOREIRA, A.F.C. & RAMALHO, F.S. Biologia de *Podisus nigrispinus* predando lagartas de *Alabama argillacea* em campo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37 (1): 7-14, 2002.

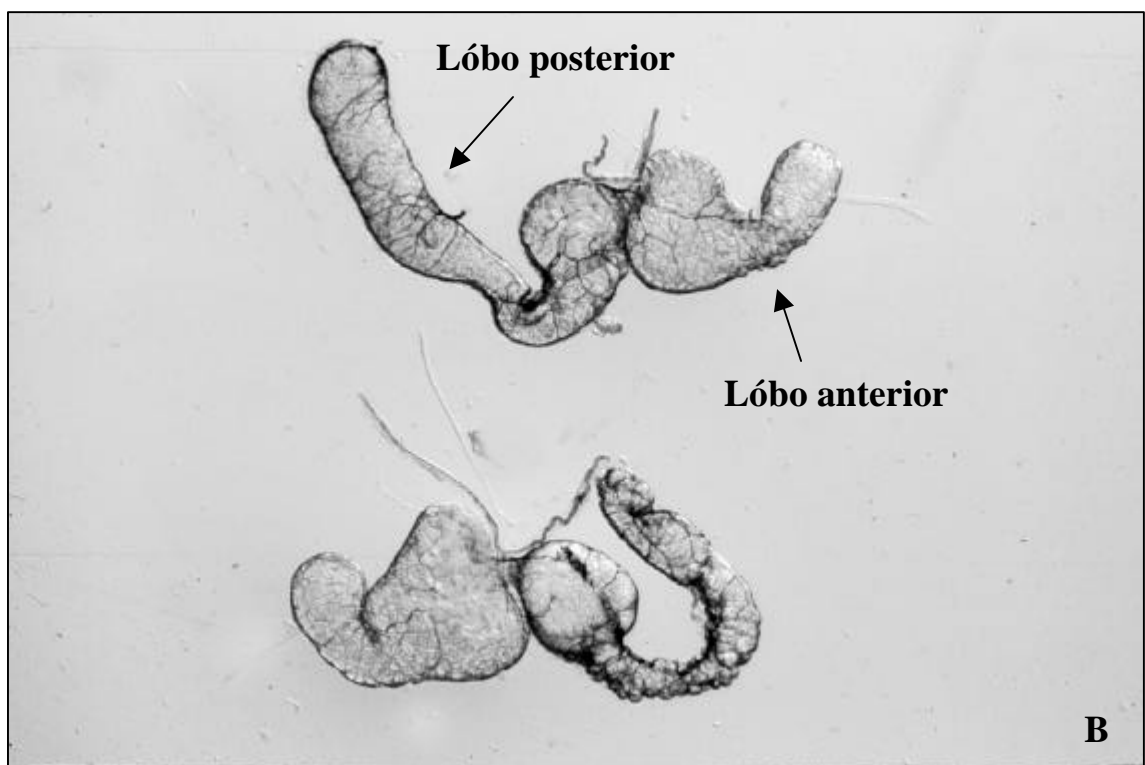
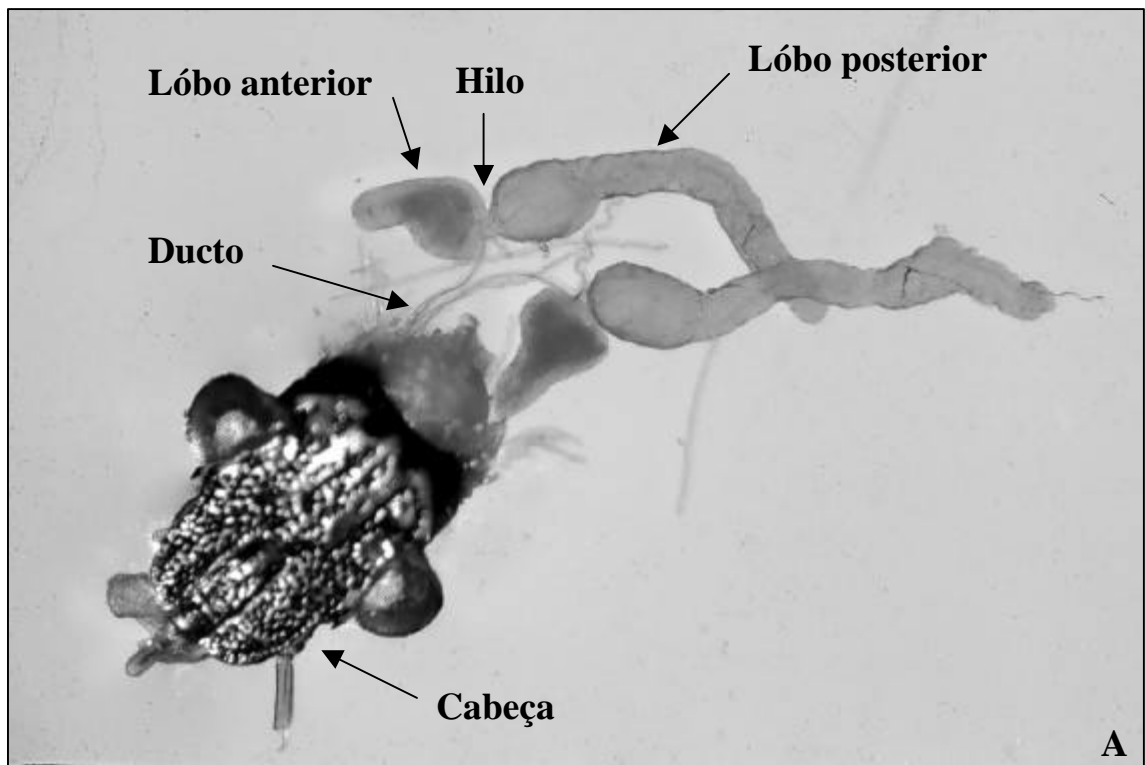
REIS, M.M.; MEIRELLES, R.M.S. & SOARES, M.J. Fine structure of the salivary glands of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Tissue & Cell*, 35 (5): 393-400, 2003.

SWART, C.C. & FELGENHAUER, B.E. Structure and function of the mouthparts and salivary gland complex of the giant waterbug, *Belostoma lutarium* (Stål) (Hemiptera: Belostomatidae). *Morphology, Histology and Fine Structure. Annals of the Entomological Society of America*, 96 (6): 870-882, 2003.

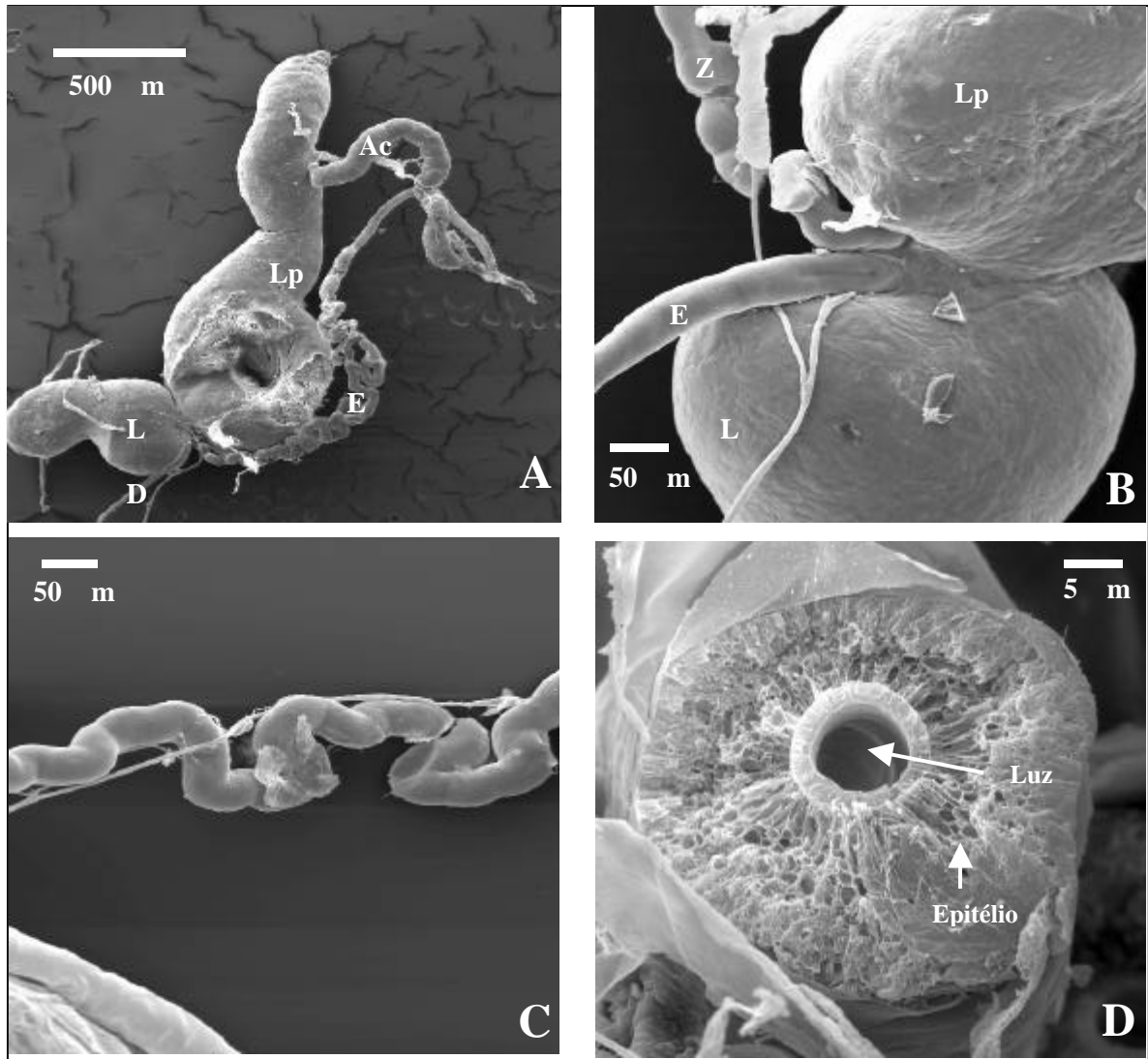
TERRA, W.R. & FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 109B (1): 01-62, 1994.

WHEELER, A.G. Jr. *Biology of plant bugs (Hemiptera: Miridae): pests, predators, opportunists.* Cornell University Press, Ithaca, NY, 2001.

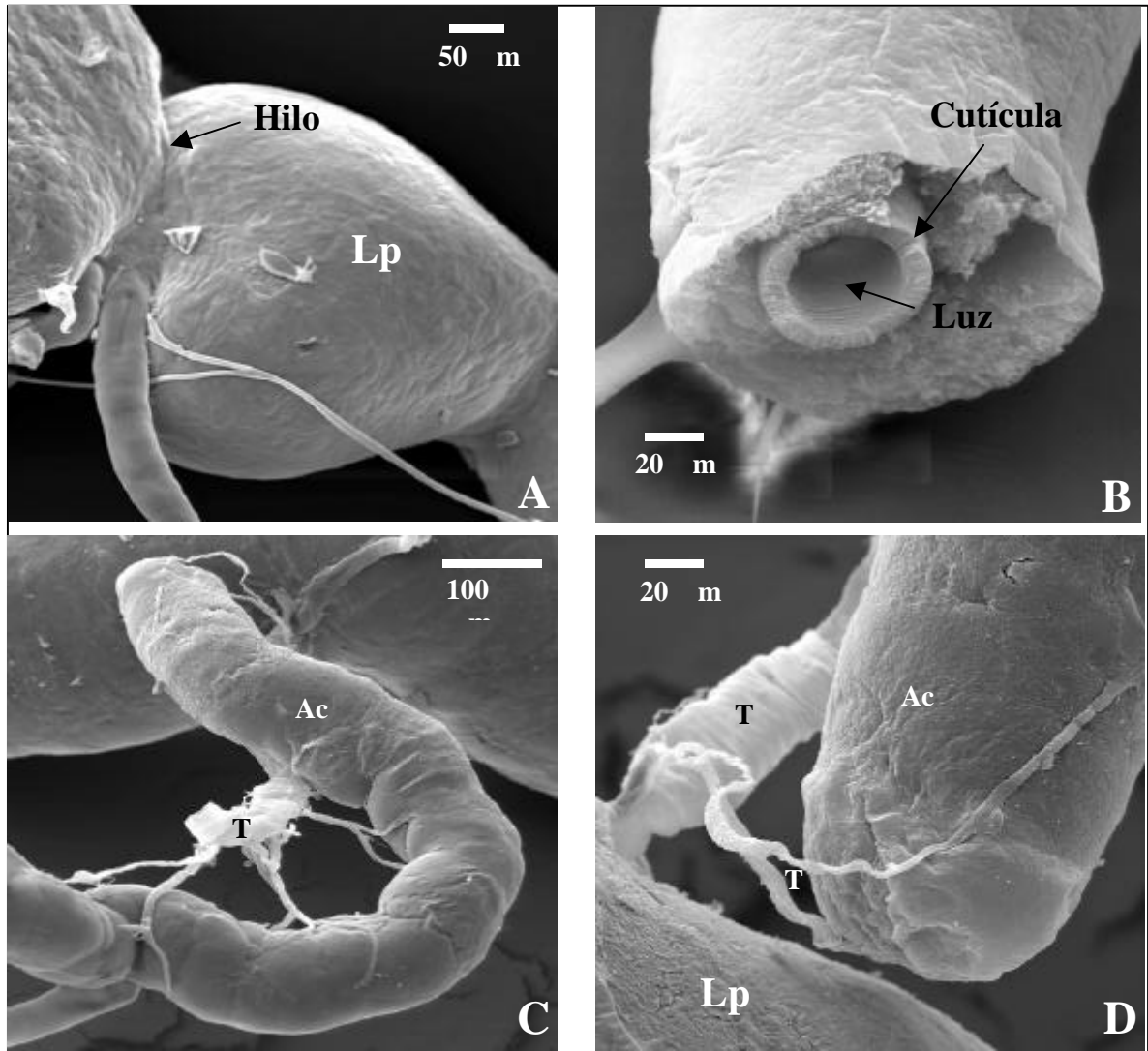
ZANUNCIO, J.C.; ALVES, J.B.; ZANUNCIO, T.V. & GARCIA, J.F.  
Hemipterous predators of eucalypt defoliator caterpillars. *Forest Ecology and Management*, 65 (1): 65-73, 1994.



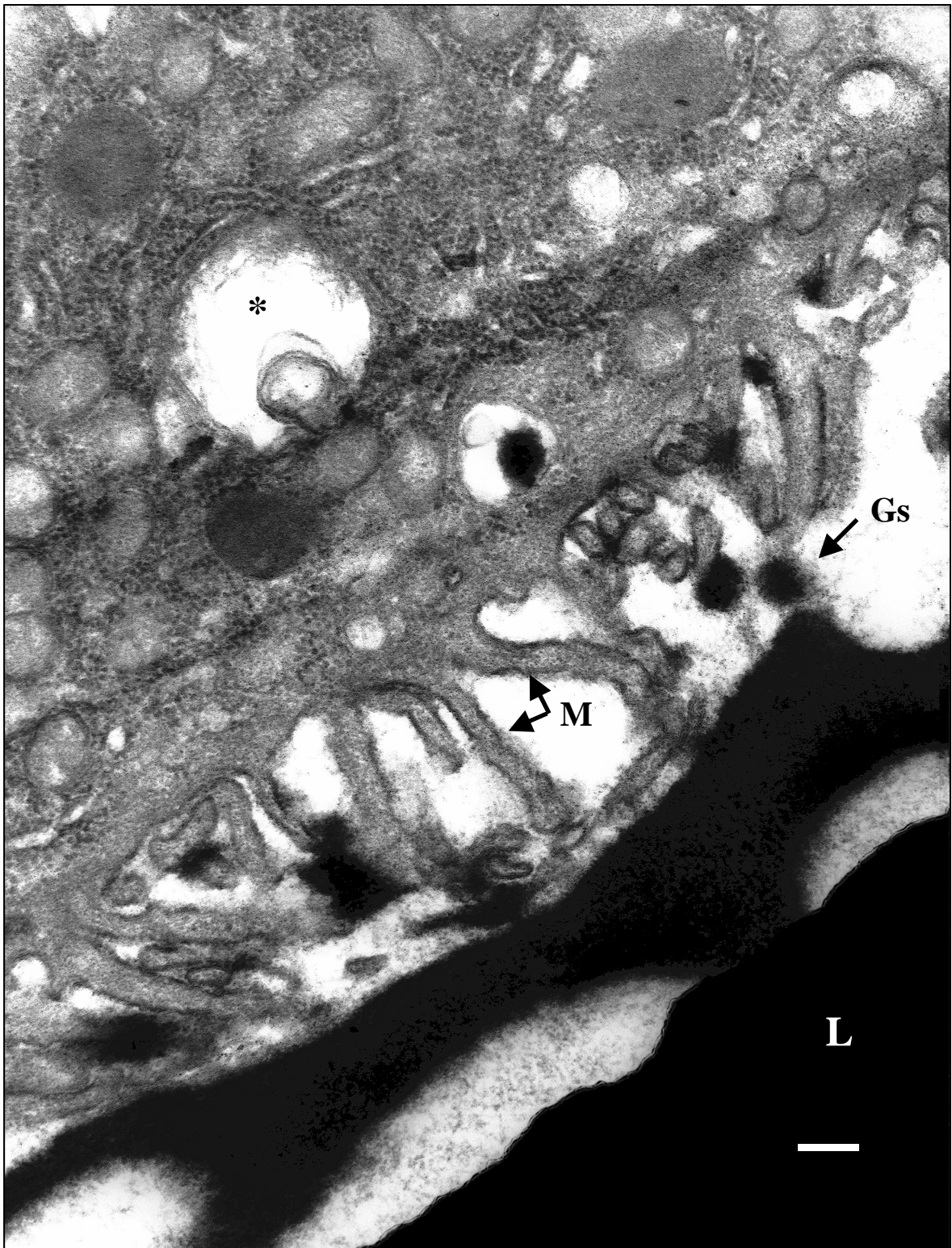
**Figura 1.** Glândulas salivares principais de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) através de estereomicroscopia. A) posição interna em relação ao corpo. B) detalhe das glândulas.



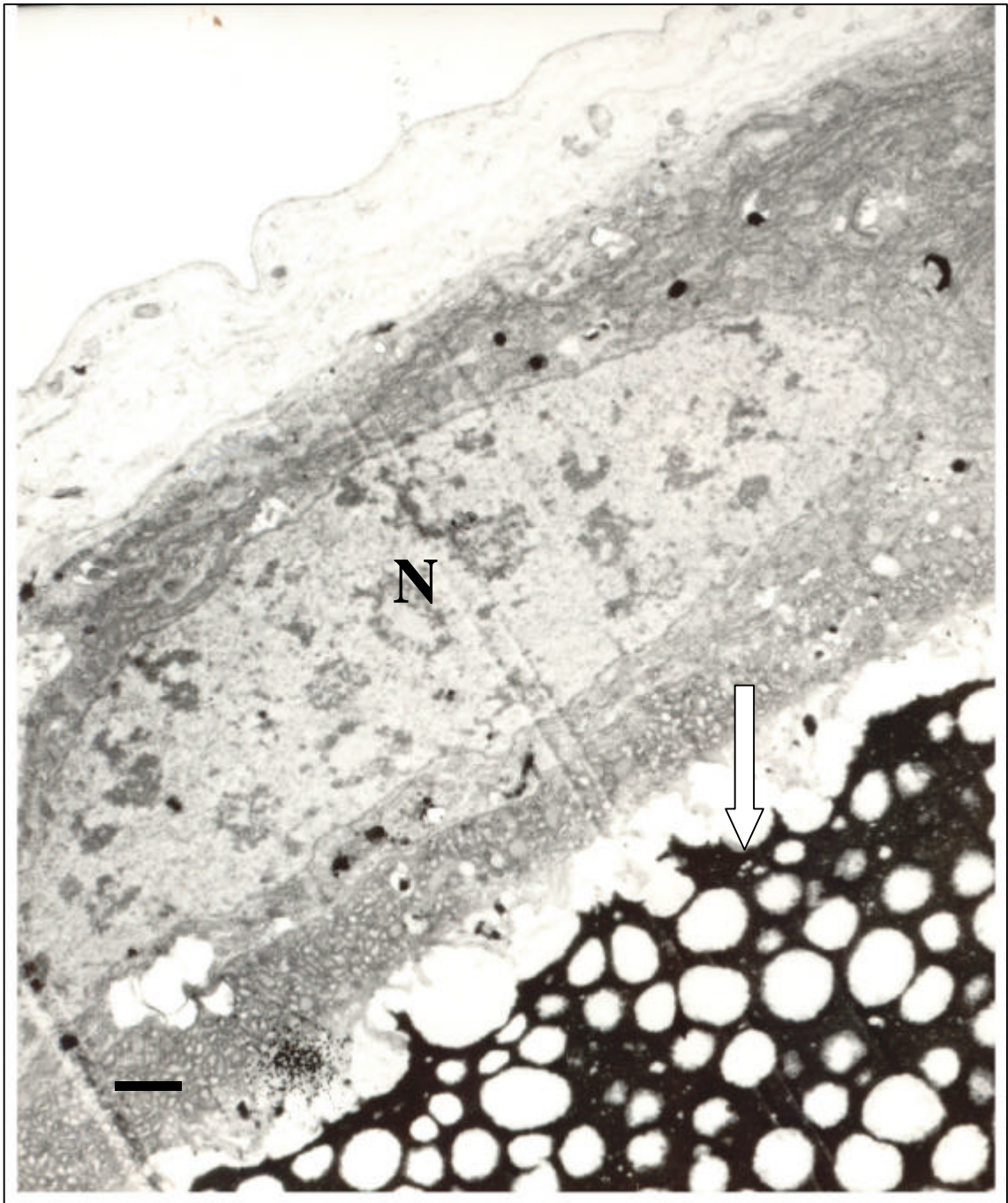
**Figura 2.** A) Micrografia eletrônica de varredura do complexo de glândulas salivares de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). (L) lóbulo anterior; (Lp) lóbulo posterior; (Ac) glândula acessória; (D) ducto excretor; (E) ducto da glândula acessória. B) Constrição entre os lóbulos anterior (L) e posterior (Lp) da glândula salivar principal. Detalhe mostrando a inserção do ducto excretor (E) no lóbulo anterior e a inserção do ducto da glândula acessória (Z) no lóbulo posterior. Morfologia externa (ziguezague) (C) e interna (D) do ducto da glândula acessória.



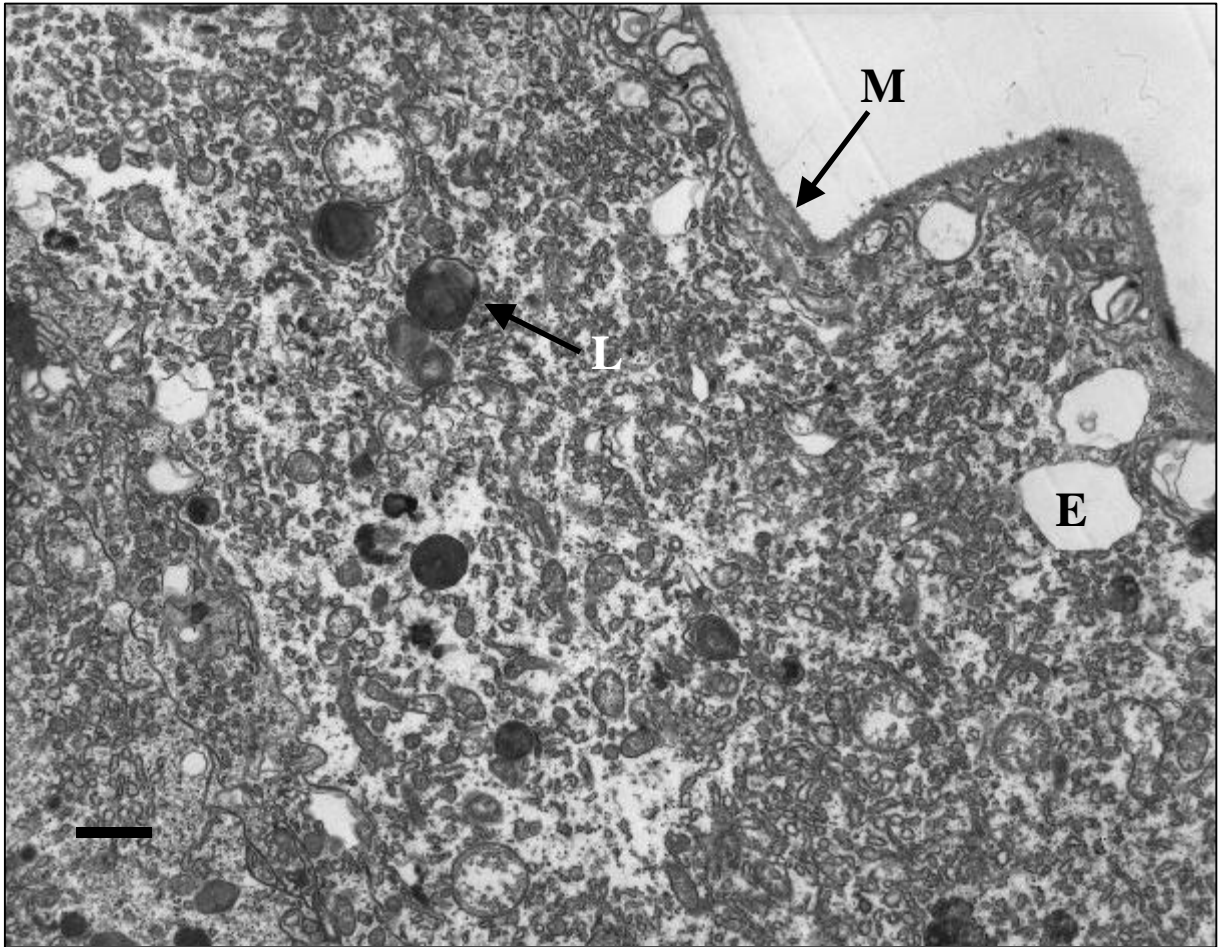
**Figura 3.** Morfologia externa (A, C e D) e interna (B) do ducto excretor (liso) mostrando a fixação da glândula acessória (Ac) ao lóbulo posterior da glândula principal (Lp) através de traquéias (T).



**Figura 4.** Micrografia do lóbulo anterior da glândula salivar principal de *Podisus nigrispinus* (Heteropter.: Pentatomidae). Detalhe da porção apical da célula da glândula. Secreção de saliva elétrondensa no lúmen da glândula (L), vacúolos elétron luscentes (\*), grânulos de secreção (Gs) entre as microvilosidades (M). Barra =0,026 m.



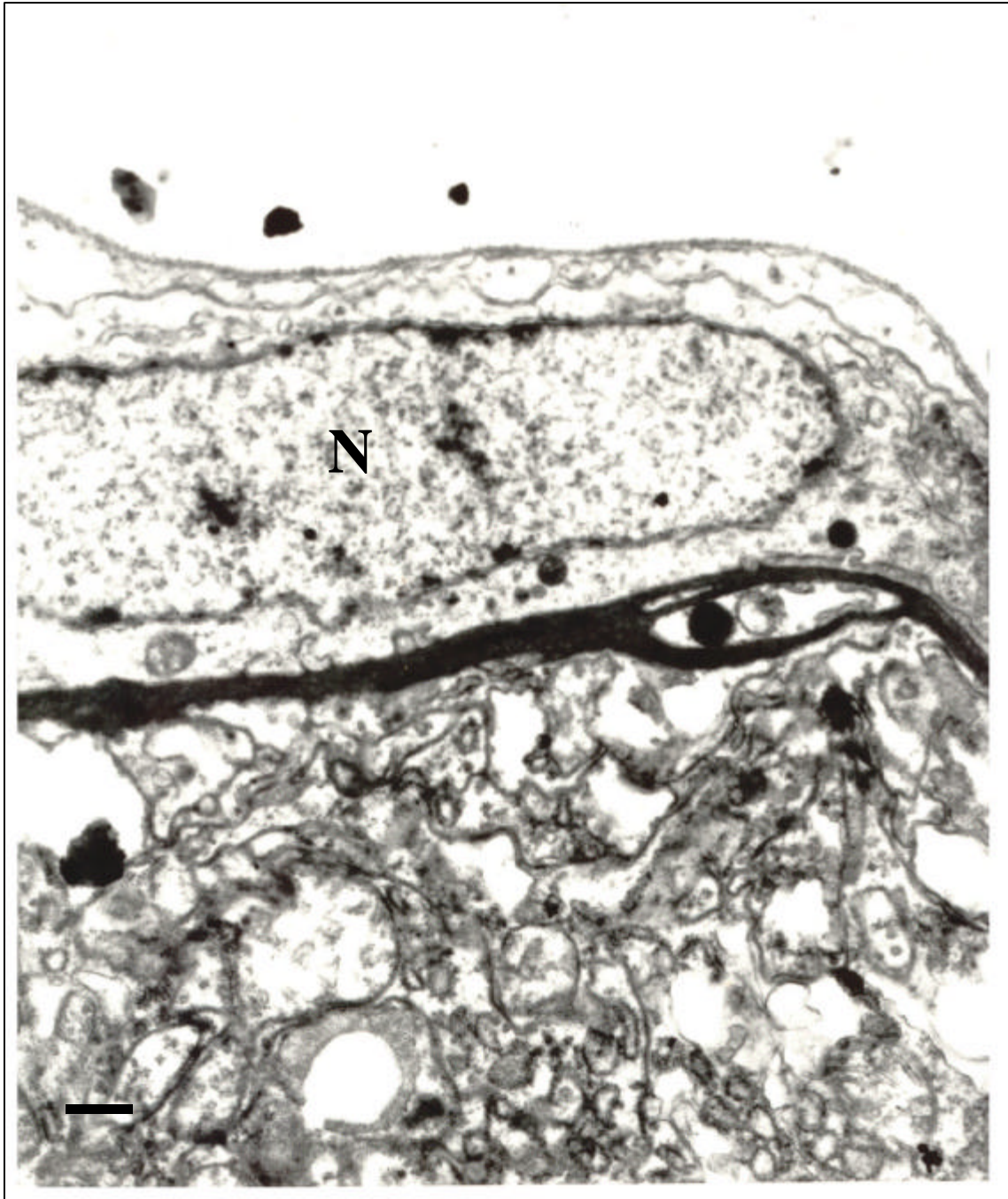
**Figura 5.** Micrografia do lóbulo anterior da glândula salivar de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). Núcleo volumoso (N), retículo endoplasmático rugoso (RER) e saliva bastante vacuolizada (seta). Barra = 0,70  $\mu$ m.



**Figura 6.** Micrografia do lóbulo anterior da glândula salivar de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). Invaginações curtas da membrana basal (M), lisossomos (L) e endossomos (E). Barra = 0,70  $\mu$ m.



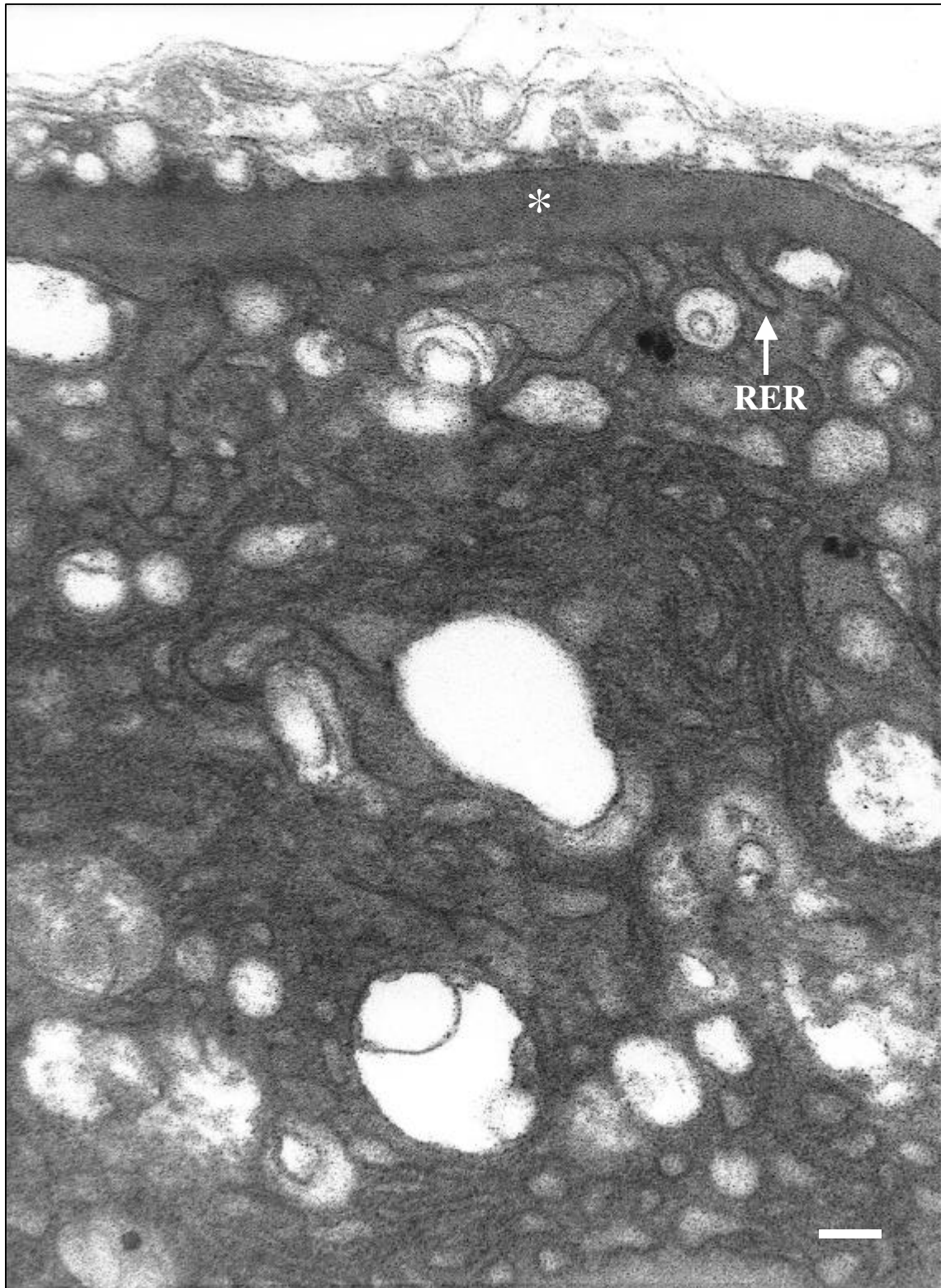
**Figura 7.** Micrografia do lóbulo anterior da glândula salivar de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). Detalhe da porção basal da célula da glândula. Vacúolos elétronaluscentes (\*), membrana basal espessa e elétrondensa (seta). Barra = 0,28  $\mu$ m.



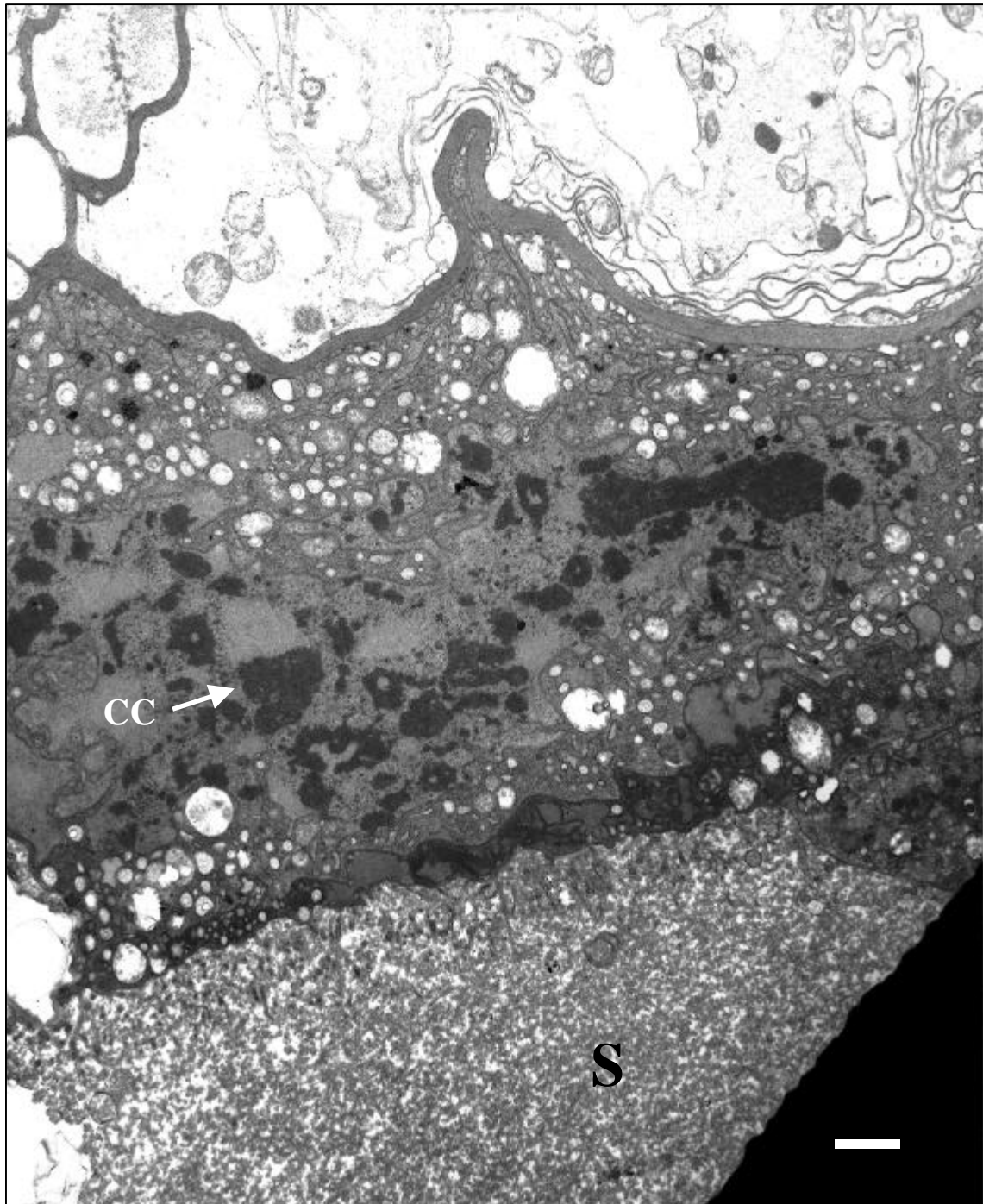
**Figura 8.** Micrografia do lóbulo anterior da glândula salivar de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). Células achatadas com núcleo grande (N). Barra= 0,32  $\mu$ m.



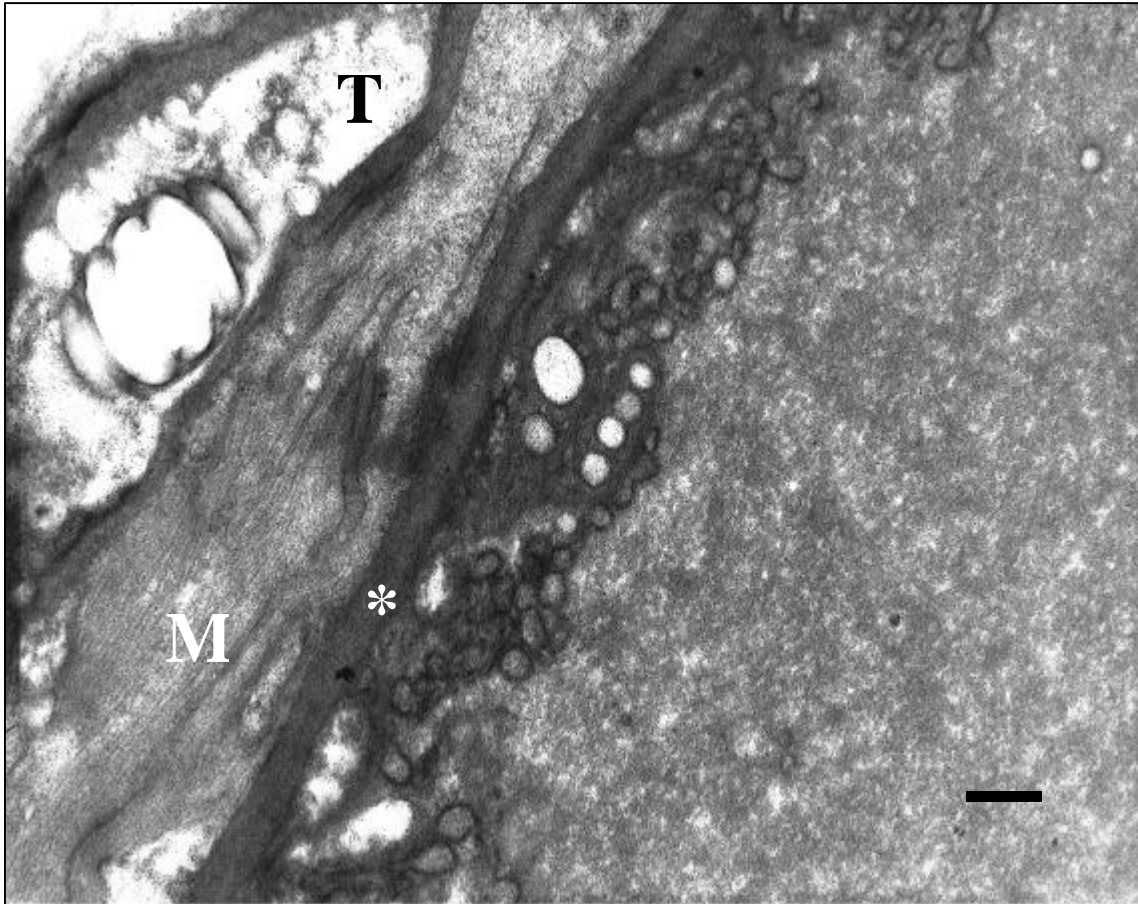
**Figura 9.** Micrografia do lóbulo posterior da glândula salivar de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) mostrando secreção salivar (S) homogênea e elétrondensa, membrana basal (MB), epitélio (EP) e musculatura (MU). Barra= 0,27  $\mu$ m.



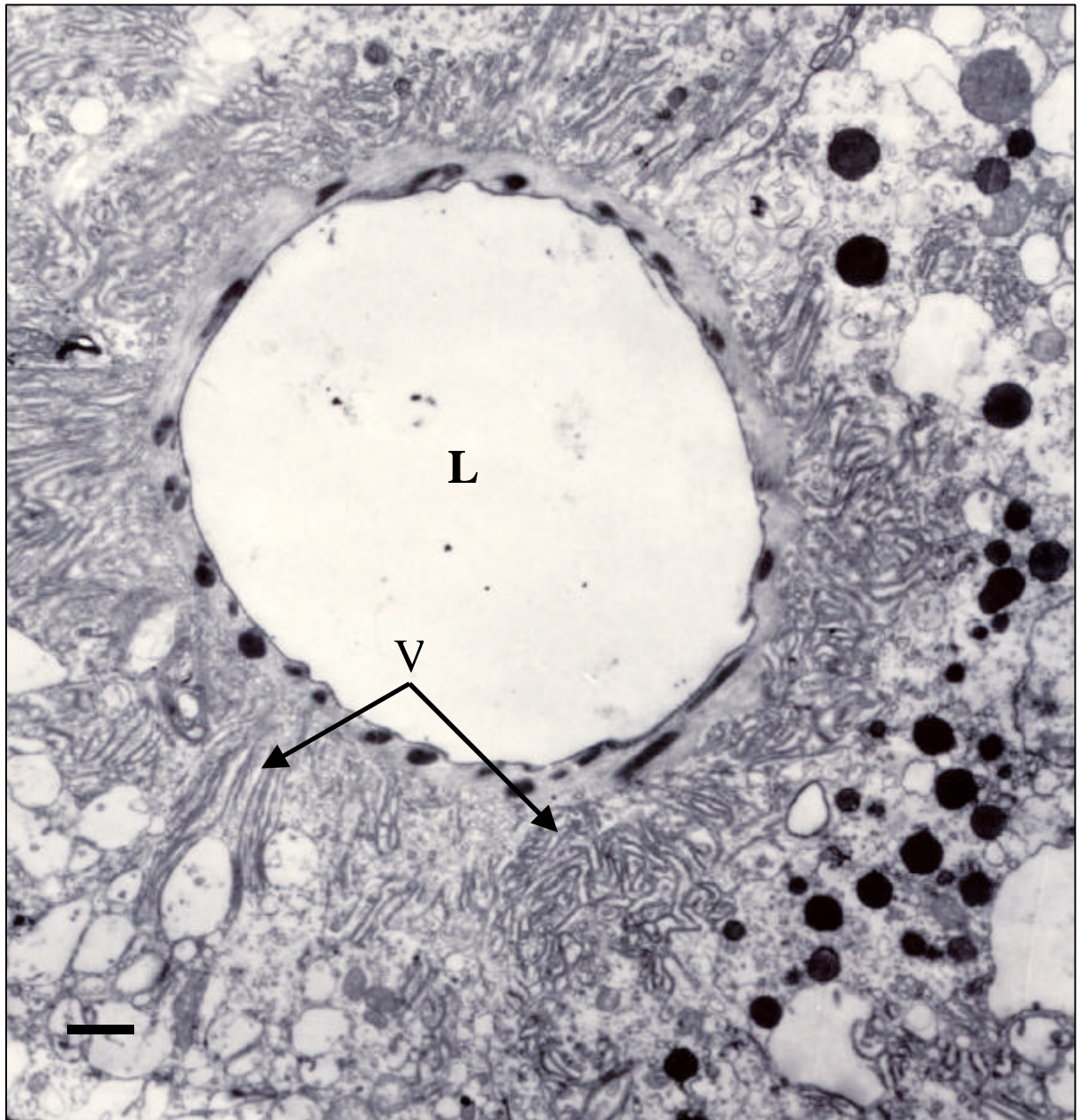
**Figura 10.** Micrografia do lóbulo posterior da glândula salivar de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). Detalhe da região basal da célula mostrando diversas cisternas de retículo endoplasmático rugoso (RER) logo abaixo da membrana basal (\*). Barra= 0,18  $\mu$ m.



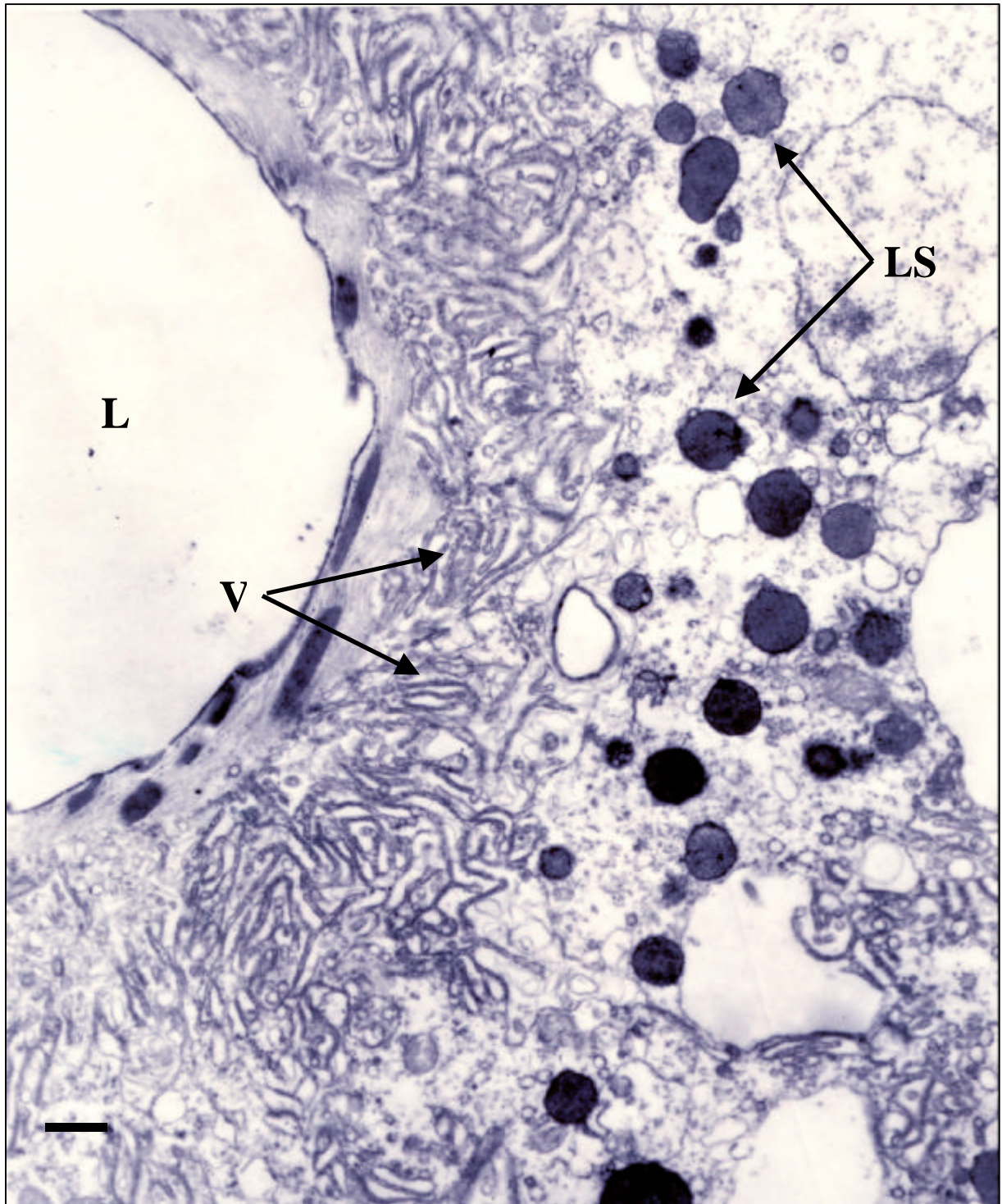
**Figura 11.** Micrografia do lóbulo posterior da glândula salivar de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). Detalhe da porção basal da célula da glândula. Há uma monocamada de células achatadas bastante vacuolizadas. O núcleo é irregular, com grumos de cromatina condensada (CC). Secreção salivar (S) homogênea pouco eletrondensa. Barra= 1,03  $\mu$ m.



**Figura 12.** Micrografia do lóbulo posterior da glândula salivar de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). Notar acima da membrana basal (\*) uma célula muscular (M) e uma traquéia (T). Barra= 0,56  $\mu$ m.



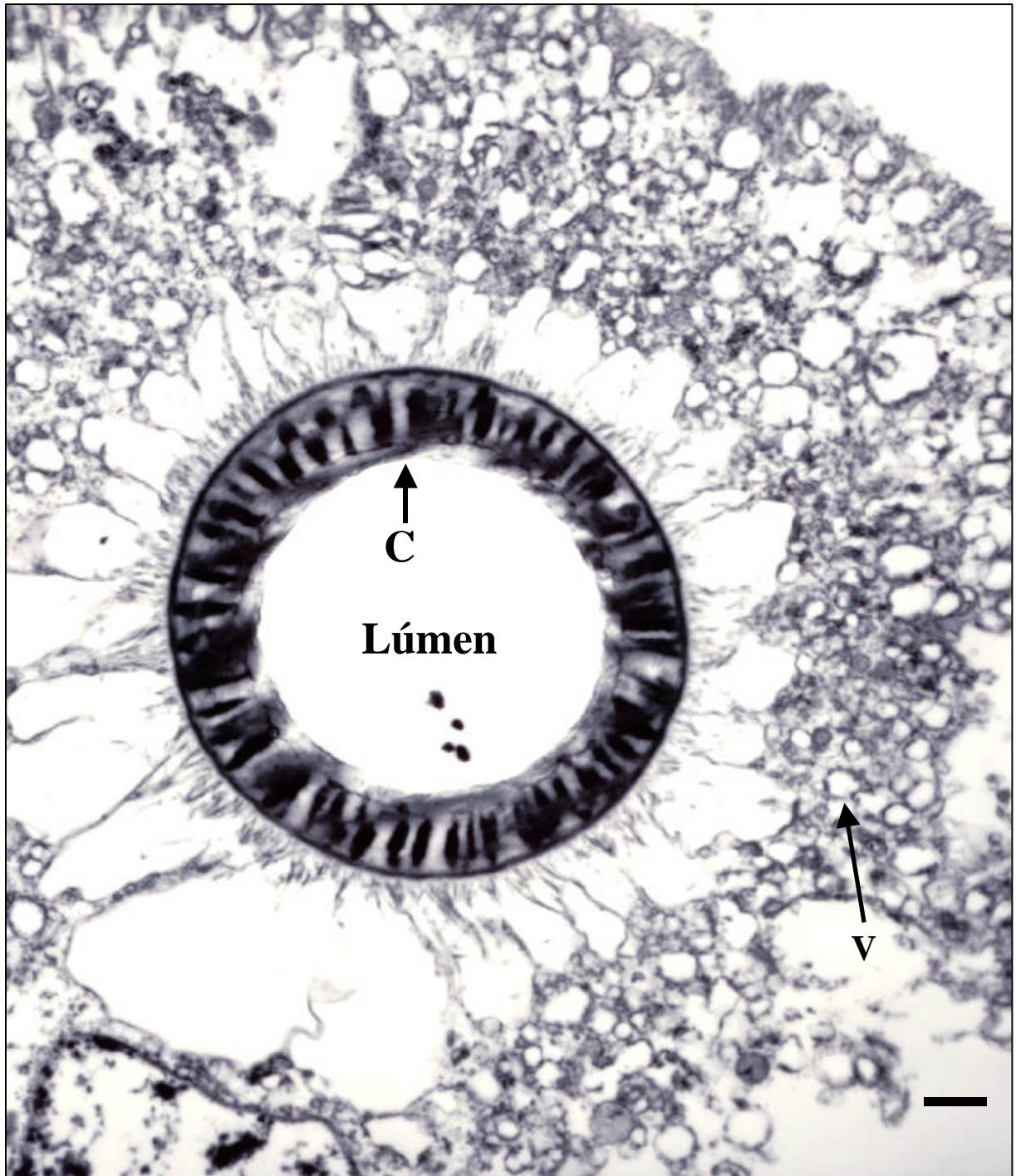
**Figura 13.** Micrografia da glândula salivar acessória de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). Corte em região próxima ao seu canal, mostrando lúmen (L) e vilosidades (V). Barra= 1,07  $\mu$ m.



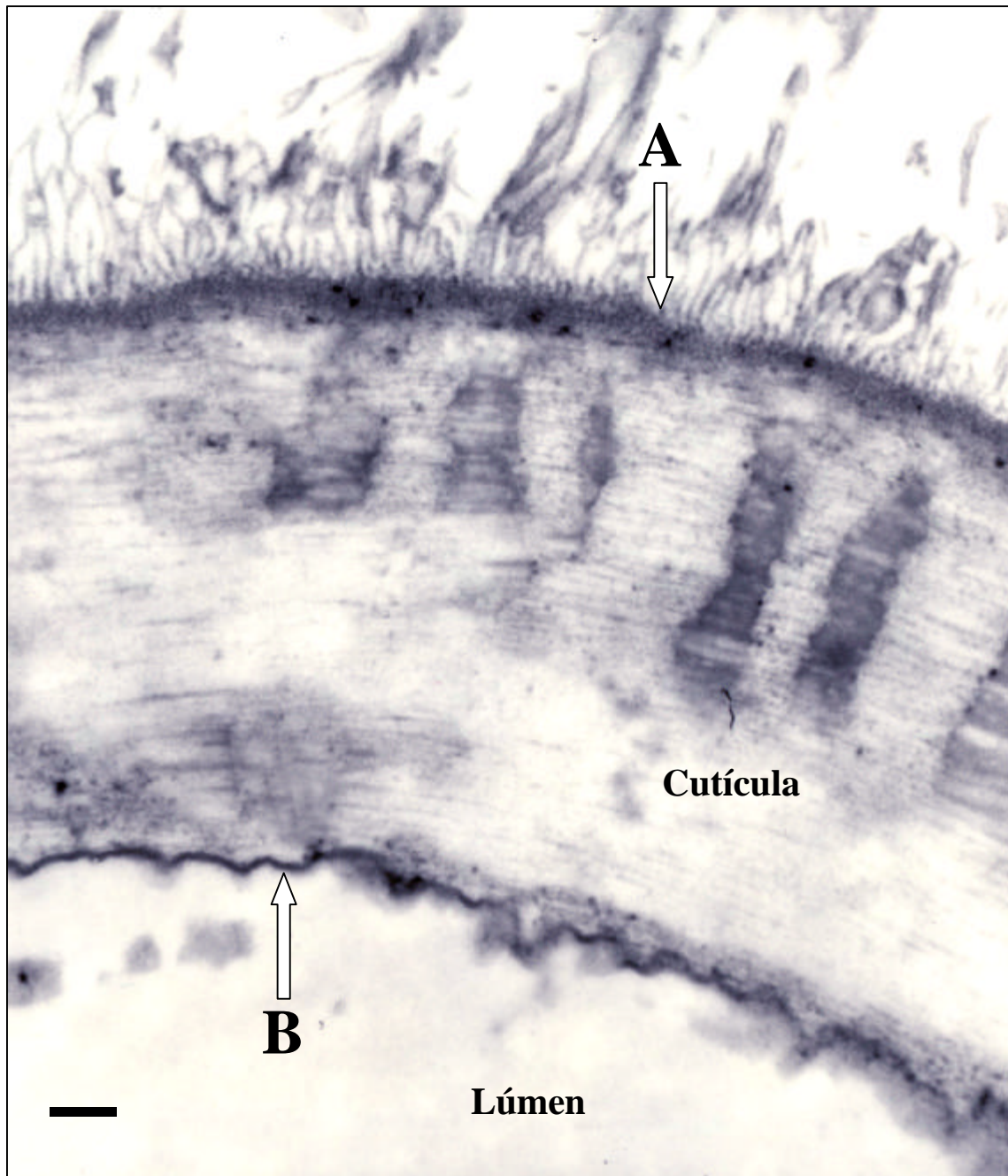
**Figura 14.** Micrografia da glândula salivar acessória de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). Vilosidades (V), lúmen (L) e lisossomos (LS). Barra= 0,60  $\mu$ m.



**Figura 15.** Micrografia da glândula salivar acessória de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). Núcleo (N) sem cromatina condensada e citoplasma contendo diversas cisternas de retículo endoplasmático liso. Barra= 1,07  $\mu$ m.



**Figura 16.** Micrografia do ducto da glândula salivar acessória de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). Dobras no ápice, cutícula (C), presença de vacúolos (V) e mitocôndrias. Barra= 1,34  $\mu$ m.



**Figura 17.** Micrografia do ducto da glândula salivar acessória de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). A) vilosidades do ápice e espaço subcuticular com material eletro denso; B) epicutícula elétron densa. Barra= 0,14 m.

## **CAPÍTULO II**

### **CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS EM EXTRATO DE GLÂNDULAS SALIVARES DE *Podisus nigrispinus* (HETEROPTERA: PENTATOMIDAE)**

---

---

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS EM  
EXTRATO DE GLÂNDULAS SALIVARES DE *Podisus nigrispinus*  
(DALLAS) (HETEROPTERA: PENTATOMIDAE)**

RESUMO – A caracterização bioquímico-enzimática do extrato de glândulas salivares de *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) mostrou a presença das enzimas digestivas amilase, lipase e proteases. O perfil da atividade específica de amilase sobre o amido e o de lipase sobre o tributirato de ditiopropanol apresentaram aumento linear com o aumento da quantidade do extrato. A atividade proteásica, determinada sobre a caseína em concentrações de 0 até 0,6 mg/mL, apresentou curva hiperbólica seguindo a cinética Michaeliana. A atividade específica tripsina-like, caracterizada com o substrato sintético N $\alpha$ -Benzoil-L-Arginil-p-Nitroanilida (L-BapNA) mostrou maiores atividades específicas a pH 5,0 e 8,0, com maior valor neste último e, também, maiores atividades a 25° C e 37,5° C. O efeito de inibidores sobre a atividade esterásica foi determinado em presença de benzamidina, um inibidor competitivo clássico dessa enzima e de TLCK, seu inibidor irreversível. Esses inibidores ocasionaram queda na atividade da tripsina-like com aumento da concentração. O gráfico de Michaelis-Mentem apresentou valor de  $K_M$  1,57 mM e  $V_{m\acute{a}x}$  0,166  $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$ . As glândulas salivares de *P. nigrispinus* contêm enzimas hidrolíticas com atividade catalítica que, possivelmente, estejam envolvidas no processo de predação e zoofágico desse predador.

PALAVRAS CHAVE: Enzimas hidrolíticas, glândula salivar, *Podisus nigrispinus*.

## INTRODUÇÃO

A ocorrência de percevejos predadores tem merecido atenção pelo papel desses organismos na redução dos níveis populacionais de pragas em reflorestamentos (ZANUNCIO *et al.*, 1994) e pelo fato de os métodos convencionais de controle das mesmas trazerem impacto negativo aos agroecossistemas, principalmente à fauna benéfica e ao meio ambiente (VAN LENTEREN & WOETS, 1990).

O controle biológico, como estratégia de controle de pragas, visa a redução do uso de inseticidas (VAN LENTEREN & WOETS, 1990). No Brasil, o controle biológico de lagartas desfolhadoras em áreas reflorestadas com eucalipto inclui liberações inoculativas ou inundativas de percevejos predadores (ZANUNCIO *et al.*, 1994; 2000), os quais tem tido sua biologia, fisiologia, ecologia e sistemática estudados (GRAZIA & HILDEBRAND, 1987). No entanto, estudos relacionados a aspectos bioquímicos e fisiológicos podem facilitar a utilização desses insetos em estratégias de controle de insetos-praga (COHEN, 1993; COGNI *et al.*, 2002; BOYD Jr., 2003).

A fisiologia da digestão varia entre espécies de heterópteros, pois esses organismos utilizam diferentes alimentos e digestão extra oral com a injeção de enzimas digestivas, na presa, antes da alimentação (COHEN, 1995), o que aumenta a eficiência digestiva dos mesmos (SWART & FELGENHAUER, 2003). Esses processos digestivos explicam as adaptações bioquímicas, morfológicas e comportamentais de heterópteros predadores para melhorarem a ingestão de alimento com conversão de, aproximadamente, 80% da presa e ingestão de 94% do alimento para sua própria biomassa (COHEN, 1989, 1990).

Os predadores, durante o ataque às presas, injetam biomoléculas produzidas nas glândulas salivares, cujas secreções melhoram a lubrificação, ingestão e digestão dos alimentos. As glândulas salivares desses insetos apresentam grande quantidade de enzimas digestivas como  $\alpha$ -glicosidases,  $\beta$ -galactosidases, amilases, tripsina e lipase (TERRA & FERREIRA, 1994). As proteases da saliva dos heterópteros são, na maioria das vezes, da classe das

serino proteases, que podem ser caracterizadas por inibidores, especificidade e pH ótimo (HORI, 1970; LAUREMA *et al.*, 1985; COHEN, 1993).

O percevejo *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) é uma espécie generalista utilizada em programas de controle biológico de lagartas desfolhadoras de eucalipto (ZANUNCIO *et al.*, 1994). Esse predador, além de se alimentar de presas, exerce fitofagia em plantas hospedeiras das mesmas, das quais pode obter nutrientes e umidade (LEMOS *et al.*, 2001; EVANGELISTA *et al.*, 2003). Esse comportamento deve-se a adaptações do aparelho bucal e do complexo enzimático digestivo de percevejos predadores, que possibilita aos mesmos exercerem, ocasionalmente, fitofagia sem danos às plantas hospedeiras (COHEN, 1996).

O conhecimento da constituição enzimática das glândulas salivares de percevejos predadores pode explicar a diversificação alimentar dessas espécies. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a natureza bioquímica do extrato de glândulas salivares de *P. nigrispinus* e caracterizar a atividade hidrolítica das enzimas presentes nos extratos dessas glândulas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Obtenção dos insetos, do extrato enzimático e da concentração protéica em extrato de glândulas salivares de *Podisus nigrispinus***

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Enzimologia do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais. Indivíduos de *P. nigrispinus* foram obtidos da criação massal desse predador do laboratório de Controle Biológico de Insetos da UFV onde são alimentados com pupas de *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) em salas com temperatura controlada a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $75 \pm 10\%$  de umidade relativa e fotoperíodo de 12:12h (L:E). Machos e fêmeas de *P. nigrispinus* foram imobilizados a  $-18^\circ\text{C}$  por sete

minutos. As glândulas salivares desses insetos foram retiradas e transferidas para tubos tipo eppendorf na proporção de 12 pares de glândulas para 200 µL de água deionizada, em banho de gelo, onde foram maceradas com auxílio de um bastão de vidro e, posteriormente, submetidas à centrifugação a 16000 g durante 25 minutos, para obtenção do extrato sobrenadante. O extrato era armazenado a 18°C e analisado para atividade enzimática e dosagem de proteínas, no dia seguinte. A concentração de proteína foi determinada de acordo com o método de BRADFORD (1976), utilizando-se soroalbumina bovina como padrão.

### **Atividades enzimáticas em extratos de glândulas salivares de *Podisus nigrispinus***

A atividade das enzimas amilase, lipase, protease e tripsina-like de *P. nigrispinus* foi determinada em amostras de 10 a 80 µL de extrato de glândulas salivares desse predador. A atividade da amilase foi determinada utilizando-se o kit enzimático BIOCLIN baseado na metodologia de CARAWAY (1959) modificada, que consiste na incubação de 10 L do extrato glandular em presença de 500 L de amido a 0,4 g/L e tampão monofosfato/fosfato dissódico 100mM, pH 7,0, por sete minutos e trinta segundos, a 37 °C, seguindo-se a leitura da absorbância a 660 nm. A atividade da amilase é expressa em Unidades de Amilase que representa a hidrólise total de 10mg de amido em 30 minutos a 37 °C

A atividade da lipase foi determinada com o kit enzimático BIOCLIN, segundo a metodologia de CHERRY & CRANDALL (1932) modificada. Os extratos (50 L) foram incubados em 1,0mL de tampão tris 100mM (hidroximetilamino metano), 100 L de DTNB 100mM (ácido ditionitrobenzóico) e 50 L de inibidor de proteases fenilmetil sulfonil fluoreto (PMSF), a 37°C, por trinta minutos. Após dois minutos acrescentaram-se 100 L de tributirato ditiopropanol 20mM. Após a incubação por 30 minutos a 37°C, foram adicionados 2,0mL de acetona para paralisar a reação. Este material foi submetido a centrifugação por cinco minutos a 3.500 rpm, em microcentrífuga de eppendorf e o sobrenadante levado ao espectrofotômetro para leitura a 410nm. A

atividade foi expressa em UI, que representa a conversão de 1,0 mol de substrato por minuto ou a formação de 1,0 mol de produto por minuto.

A atividade proteásica foi determinada pelo método de BEYNON & BOND (2001), que consiste na verificação da hidrólise do substrato azocaseína a 440 nm pelas proteases presentes no extrato. Amostras de azocaseína de 0 a 0,6 mg/mL foram incubadas a temperatura ambiente com 90 µL do extrato das glândulas salivares de *P. nigrispinus* em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 8,0 por 15 minutos. Após este tempo, 720µL de TCA a 10% (ácido tricloroacético) foram adicionados e a mistura deixada em repouso por 15 minutos. A seguir, o material foi centrifugado por cinco minutos a 14.000 rpm. Do sobrenadante transferiram-se 720 µL para um tubo contendo 840 µL de NaOH 1M e fez-se a leitura da absorbância a 440 nm.

A atividade tripsina-like (atividade esterásica) foi avaliada pelo método de ERLANGER *et al.* (1961), sendo o extrato incubado com N $\alpha$ -Benzoil-L-Arginil-p-Nitroanilida (L-BApNA) 5mM em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0 a 37,5°C em três repetições. As velocidades iniciais da reação foram determinadas pela formação de p-nitroanilida, pela medida da absorvância a 410 nm em função do tempo (2,5 minutos), utilizando-se o coeficiente de extinção molar 8800 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> do produto.

### **Efeito de pH, temperatura e dos inibidores benzamidina e tosil-L-lisina-clorometil-cetona (TLCK) na atividade tripsina-like em extratos de glândulas salivares de *Podisus nigrispinus***

O efeito de pH na atividade de tripsina-like, a 37,5°C sobre o substrato L-BApNA, foi determinado utilizando-se os seguintes sistemas tampão na concentração de 50 mM: ácido acético/acetato de sódio (pH 4,0-4,5); ácido cítrico/citrato de sódio (pH 5,0-5,5); monofosfato/fosfato dissódico (pH 6,0-7,0); Tris-HCl (pH 7,5-8,5) e ácido bórico/borato de sódio (pH 9,0 - 9,5).

O efeito da temperatura na atividade de tripsina-like sobre o substrato L-BApNA foi verificado usando-se solução-tampão Tris-HCl 0,05M (pH 8,0) a 10, 15, 20, 25, 30, 35, 37,5, 40, 45, 50 e 55 °C.

O efeito do inibidor competitivo benzamidina, na atividade de tripsina-like, foi observado em tampão tris-HCl 0,05M, pH 8,0 e temperatura de 37,5 °C, nas concentrações de 10, 100 e 1000 µM de benzamidina em presença do substrato L-BApNA.

O efeito do inibidor irreversível TLCK, sobre a atividade da tripsina-like, foi avaliado nas concentrações de 5 a 16,6µM em presença do substrato L-BApNA em tampão Tris-HCl, pH 8,0 e temperatura de 37,5 °C.

### **Determinação dos parâmetros cinéticos da protease tripsina-like nos extratos de glândulas salivares de *Podisus nigrispinus***

A determinação dos parâmetros cinéticos  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$  aparentes foi realizada em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 8,0 e temperatura de 37,5°C, utilizando-se o substrato L-BApNA na concentração de 0,25 a 16 mM. Os parâmetros cinéticos  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$  aparentes, no estado estacionário, foram obtidos por regressão não linear, empregando-se o software Enzifitter, Elsevier, Biosoft.

## **RESULTADOS**

O extrato de glândulas salivares de *P. nigrispinus* apresentou atividade de amilase, lipase, proteásica e de proteases tripsina-like. A atividade da amilase e da lipase aumentou com o aumento da concentração do extrato enzimático em solução (Figs. 1 e 2). A atividade de proteases totais em extrato de glândulas salivares de *P. nigrispinus* foi caracterizada pela hidrólise do substrato protéico azocaseína (Fig. 3).

A atividade de proteases tripsina-like, em extrato de glândulas salivares de *P. nigrispinus*, foi influenciada pelo pH, pela temperatura e pelos inibidores benzamidina e TLCK.

O perfil de atividade de proteases tripsina-like, entre pH 3,0 a 10,0, apresentou atividade a partir do pH 4,0, com picos de atividade em pH 5,0 e pH 8.0 (Fig. 4).

A atividade da tripsina-like foi maior a 37,5°C com queda brusca em temperaturas superiores, apresentando também um pico de atividade na temperatura de 25 °C (Fig. 5).

O inibidor benzamidina diminuiu a atividade enzimática da tripsina-like, a qual foi de 14,79 e 5,14 nM.s<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína, na ausência e na maior concentração de benzamidina, respectivamente (Fig. 6), correspondendo a um decréscimo de 65,2%. De forma semelhante, o inibidor TLCK diminuiu a atividade enzimática da tripsina-like que passou de 69,08 nM.s<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>, na ausência de TLCK, para 20,10 nM.s<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> na maior concentração desse inibidor (Fig. 7), correspondendo a 70,9% de inibição da atividade tripsina-like.

Os parâmetros cinéticos  $K_{M(ap)}$  e  $V_{máx(ap)}$  foram de 1,57 mM e de 0,1661  $\mu$ M.s<sup>-1</sup>, respectivamente.

## DISCUSSÃO

A presença de amilase no extrato de glândulas salivares de *P. nigrispinus* era esperada, pois esta enzima participa da digestão de glicogênio que é uma reserva, amplamente, encontrada nos tecidos de formas jovens de insetos. A presença desta enzima pode ser suficiente para caracterizar heterópteros como zoofitófagos, pois possibilita o uso de plantas na dieta desses predadores (COHEN, 1996; COLL & GUERSHON, 2002). Esta enzima é utilizada na digestão extra-oral de amido presente nos tecidos vegetais, sugerindo que esses predadores possam tornar-se pragas agrícolas (ZENG & COHEN, 2000; BOYD Jr., 2003). Entretanto, a caracterização de um predador como zoofitófago obrigatório deve considerar outros aspectos da biologia do inseto (aumento no potencial reprodutivo, na longevidade e na sobrevivência) como observado para *Brontocoris tabidus* (Signoret) (Heteroptera: Pentatomidae), pois a presença de amilase indica, apenas, a capacidade de digerir polissacarídeos de reserva que nos vegetais é o amido, mas nas presas desses insetos é o glicogênio. Além disso, *P. nigrispinus*, como todos os heterópteros, apresenta aparelho bucal picador-

sugador. Esse predador tem sido observado alimentando-se de plantas inserindo o estilete nos vasos condutores, sendo sabido que o amido está presente nos tecidos foliares, e não na seiva. Portanto, a presença de amilase nas glândulas salivares de *P. nigrispinus* é, apenas, uma indicação de que este pode digerir o glicogênio de suas presas no processo de digestão extra-oral.

A atividade de proteases, verificada pela hidrólise da azocaseína, em extrato de glândulas salivares de *P. nigrispinus*, apresentou perfil hiperbólico, seguindo o modelo cinético de Michaelis-Menten. O perfil da atividade proteásica do extrato de glândulas desse predador foi semelhante ao da hidrólise de caseína por tripsina e azotripsina bovina (OLIVEIRA *et al.*, 1993). Isto foi, também, semelhante ao relatado para *Creontiades dilutus* (Stal) (Heteroptera: Miridae) que apresentou alto nível de atividade proteásica (absorbância de 0,25 a 340 nm com azocaseína) (COLEBATCH *et al.*, 2001). As serino proteases são mais frequentes em glândulas salivares de Heteroptera e, dentre elas, a família das tripsinas-*like* é predominante (COHEN, 1993). As proteases tripsina-*like* são enzimas que possibilitam a zoofagia (COHEN, 2000) e a atividade das mesmas, em extrato de glândulas salivares de *P. nigrispinus*, sugere que esse inseto seja, primariamente, predador. *Perillus bioculatus* (Fabr.) (Heteroptera: Pentatomidae) apresentou resultado semelhante ao encontrado para *P. nigrispinus* com atividade de proteases de 4,79 UI/mg de proteína (ASHOURI *et al.*, 1998). Endopeptidases como tripsina-*like*, injetadas por percevejos predadores, hidrolisam e liquefazem as proteínas estruturais da presa (COHEN, 1995) pois estas são as principais enzimas envolvidas no processo da digestão extra oral de *Zelus renardii* Kolenati (Heteroptera: Reduviidae) (COHEN, 1993) e de *C. dilutus* e *L. lineolaris* (COLEBATCH *et al.*, 2001; ZHU *et al.*, 2003). A atividade de proteases tripsina-*like* pode refletir o sucesso do processo de predação de percevejos Asopinae, pois a digestão extra oral aumenta a absorção de nutrientes (COHEN, 1990) e reduz o tempo de manipulação da presa (KASPARI, 1990), que é influenciado pelo tamanho da mesma (COGNI *et al.*, 2002). A presença dessas proteases em extrato de glândulas de *P. nigrispinus* sugere que esse predador possa utilizar

proteínas estruturais e insolúveis de suas presas pelo fato de as mesmas participarem, diretamente, do processo de digestão extra oral.

As proteases das glândulas salivares de *P. nigrispinus* foram ativas em pH 4,0 a 10,0, sendo o pH ótimo alcalino (pH = 8,0), o que sugere a presença de serino proteases, como determinado para *Lygus rugulipennis* Poppius (Heteroptera: Miridae) e *Z. renardii* que apresentaram pH ótimo a 8,0 e 7,5, respectivamente (LAUREMA *et al.*, 1985; COHEN, 1993). Tripsinas-like, em geral, são mais ativas em pH alcalino na faixa de 8,0 a 10,0 (TERRA & FERREIRA, 1994; COLEBATCH *et al.*, 2001), o que se assemelha a atividade dessas enzimas em extrato de glândulas de *P. nigrispinus*, com picos de atividades em pH 5,0 e 8,0. A ocorrência de mais de um pico de atividade, em diferentes valores de pH, pode estar relacionada à presença de outras formas de tripsina-like no extrato enzimático desse predador (MOFFATT & LEHANE, 1990). A atividade de proteases em glândulas salivares de *C. dilutus* apresentou crescimento exponencial com aumento do pH, o que pode estar relacionado com formas menos ativas dessas enzimas no extrato de glândulas salivares de percevejos predadores. Essas enzimas podem ser, posteriormente, ativadas no tubo digestivo conforme observado para *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera: Muscidae) (MOFFATT & LEHANE, 1990).

As proteases tripsina-like apresentaram picos altos de atividade a 25° e 37,5°C, o que sugere, novamente, a presença de diferentes formas das mesmas no extrato de glândulas salivares de *P. nigrispinus*. Isto corrobora resultados para *Z. renardii*, com pico de atividade a 35 e a 45°C, para tripsina-like (COHEN, 1993). A maior atividade dessas enzimas em temperaturas acima de 30°C possibilita maior sucesso de predação por *P. nigrispinus* em regiões tropicais, e com menor tempo de manipulação da presa.

Os inibidores de serino proteases TLCK e benzamidina reduziram a atividade das proteases das glândulas salivares de *P. nigrispinus*, evidenciando a presença de serino proteases no extrato das mesmas. A benzamidina é uma amidina sintética aromática que funciona como inibidor competitivo de tripsina (MARES-GUIA *et al.*, 1981; OLIVEIRA *et al.*, 1993). O efeito desse inibidor,

sobre a atividade de tripsina-like, confirma a existência de enzimas desse complexo em extratos de glândulas salivares do predador *P. nigrispinus*, pois a hidrólise do substrato L-BApNA diminuiu em presença desse inibidor com redução de 65,2% da atividade de tripsina-like. A benzamidina promoveu inibição de 80% na atividade proteásica em glândulas salivares de *L. lineolaris* sendo o principal inibidor dessa atividade enzimática, juntamente com a aprotinina, outro inibidor (ZHU *et al.*, 2003). O efeito do inibidor TLCK na atividade de tripsina-like foi, também, verificado em *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre) (Lepidoptera: Noctuidae) com redução superior a 50% da atividade dessas enzimas (NOVILLO *et al.*, 1999). Esse inibidor reduziu em 64% a atividade de tripsina-like no tubo digestivo de *Locusta migratoria* (L.) (Orthoptera: Acrididae) (LAM *et al.*, 2000). Esses resultados sugerem que a inibição da atividade de proteases tripsina-like pelo TLCK pode variar entre espécies. Isto ocorre devido às concentrações dessas enzimas nas glândulas salivares e no tubo digestivo dos insetos, como também à afinidade desse inibidor pelo centro ativo dessas diferentes formas de enzimas.

O perfil de atividade versus concentração de substrato mostra que a atividade esterásica seguiu a cinética Michaeliana com curva hiperbólica na faixa de concentração de substrato analisada. A caracterização cinética de proteases tripsina-like de insetos sobre L-BApNA foi determinada para *Chrysomya bezziana* Villeneuve (Diptera: Calliphoridae) que apresentou  $K_m$  de 1,14 mM para tripsina-like purificada (MUHARSINI *et al.*, 2001) e para *L. migratoria* com  $K_m$  de 0,47 mM (LAM *et al.*, 2000). Esses resultados, apesar de semelhantes, sugerem que a atividade de proteases tripsina-like pode variar entre espécies de insetos.

## **CONCLUSÃO**

Os mecanismos fisiológicos da digestão extra oral e o seu significado na organização dos processos digestivos de percevejos predadores foram avaliados com determinações de pH, temperatura, efeito de substratos, inibidores e parâmetros cinético-enzimáticos. Isto permitiu concluir que as glândulas salivares de *P. nigrispinus* possuem enzimas hidrolíticas como amilase, lipase e tripsina-like com pronunciada atividade catalítica as quais estão, certamente, envolvidas no processo de predação e zoofágico desse inimigo natural.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHOURI, A.; OVERNEY, S.; MICHAUD, D. & CLOUTIER, C. Fitness and feeding are affected in the two-spotted stinkbug, *Perillus bioculatus*, by the cysteine proteinase inhibitor, oryzastatin I. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 38(2): 74-83, 1998.

BEYNON, R.J. & BOND, J.S. Proteolytic enzymes: a practical approach, 2<sup>nd</sup> edition, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, 2001.

BOYD Jr., D.W. Digestive enzymes and stylet morphology of *Deraeocoris nigrifulus* (Uhler) (Hemiptera: Miridae) reflect adaptations for predatory habits. Annals of the Entomological Society of America, 96(5): 667-671, 2003.

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, 72(2): 248-254, 1976.

CARAWAY, W.T. A stable starch substrate for the determination of amylase in serum and other body fluids. American Journal of Clinical Pathology, 32(1): 97-99, 1959.

CERRY, I.S. & CRANDALL, L.A. The specificity of pancreatic lipase: its appearance in the blood after pancreatic injury. American Journal of Physiology, 100(1): 266-270, 1932.

COGNI, R.; FREITAS, A.V.L. & AMARAL FILHO, B.F. Influence of prey size on predation success by *Zelus longipes* L. (Het., Reduviidae). Journal of Applied Entomology 126(2-3): 74-78, 2002.

COHEN, A.C. Food consumption, food utilization and metabolic rates of *Geocoris punctipes* fed *Heliothis virescens* eggs. *Entomophaga*, 29(1): 361-367, 1984.

COHEN, A.C. Ingestion efficiency and protein consumption of a heteropteran predator. *Annals of the Entomological Society of America*, 82(4): 495-499. 1989.

COHEN, A.C. Feeding adaptations of some predaceous heteropterans. *Annals of the Entomological Society of America*, 83(6): 1215-1223, 1990.

COHEN, A.C. Organization of digestion and preliminary characterization of salivary tripsin-like enzymes in a predaceous heteropteran, *Zelus renardii*. *Journal of Insect Physiology*, 39(10): 823-829, 1993.

COHEN, A.C. Extra-oral digestion in predaceous terrestrial arthropoda. *Annual Review of Entomology*, 40(1): 85-103, 1995.

COHEN, A.C. Plant feeding by predatory Heteroptera: evolutionary adaptational aspects of trophic switching. In Alomar, O. & R.N. Wiedenmann (eds.), *Zoophytophagous Heteroptera: implications for life history and integrated pest management*. Lanham, Entomological Society of America, 202p., 1996.

COHEN, A.C. How carnivorous bugs feed. In: C.W. SCHAEFER & PANIZZI, A.R. (Eds.), *Heteroptera of economic importance*. CRC, Boca Raton, pp. 563-570, 2000.

COHEN, A.C. & WHEELER, A.G. Jr. Role of saliva in the highly destructive fourlined plant bug (Hemiptera: Miridae: Mirinae). *Annals of the Entomological Society of America*, 91(1): 94 -100, 1998.

COLEBATCH, G.M.; EAST, P. & COOPER, P. Preliminary characterization of digestive proteases of a green mirid, *Creontiades dilutus* (Hemiptera: Miridae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31(4-5): 415-423, 2001.

COLL, M. & GUERSHON, M. Omnivory in terrestrial arthropods: mixing plant and prey diets. *Annual Review of Entomology*, 47(1): 267-297, 2002.

ERLANGER, B.F.; KOKOWSKY, N. & COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 95(1): 271-278, 1961.

EVANGELISTA JR. W.S.; GONDIM JR., M.G.C.; TORRES, J.B. & MARQUES, E.J. Efeito de plantas daninhas e do algodoeiro no desenvolvimento, reprodução e preferência para oviposição de *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae). *Neotropical Entomology*, 32(4): 677-684, 2003.

GRAZIA, J. & HILDEBRAND, R. Hemípteros predadores de insetos. In: Encontro sulbrasileiro de controle biológico de pragas, Passo Fundo, 1986. AEAPF/CNPT/EMBRAPA, p.21-37. 1987.

HORI, K. Some variations in the activities of salivary amylase and protease of *Lygus disponi* Linnavnori (Hemiptera: Miridae). *Applied Entomology and Zoology*, 5(1):51-61, 1970.

KASPARI, M. Prey preparation and the determinants of handling time. *Animal Behavior*, 40(1): 118-126, 1990.

LAM, W.; COAST, G.M. & RAYNE, R.C. Characterisation of multiple trypsins from the midgut of *Locusta migratoria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30(1): 85-94, 2000.

LAUREMA, A.; VARIS, L. & MIETTINEN, D. Studies on enzymes in the salivary glands of *Lygus rugulipennis* (Hemiptera: Miridae). *Insect Biochemistry*, 15(2): 211-224, 1985.

LEMOS, W.P.; MEDEIROS, R.S.; RAMALHO, F.S. & ZANUNCIO, J.C. Effects of plant feeding on the development, survival and reproduction of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae). *International Journal of Pest Management*, 47(2): 89-93, 2001.

MARES-GUIA, M.; ROGANA, E.; AMORIN, A.F. & MAGALHÃES-ROCHA, N.M. Kinetic evidence for a two-state, hybrid model for the trypsin activation by modifiers. *The Journal of Biological Chemistry*, 256(4): 1661-1668, 1981.

MOFFATT, M.R. & LEHANE, M.J. Trypsin is storage as an inactive zymogen in the midgut of *Stomoxys calcitrans*. *Insect Biochemistry*, 20(7): 719-723, 1990.

MUHARSINI, S.; DALRYMPLE, B.; VEROCOLO, T.; HAMILTON, S.; WILLADSEN, P. & WIYFFLS, G. Biochemical and molecular characterization of serine proteases from larvae *Chrysomya bezziana*, the old screw worm fly. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31(11): 1029-1040, 2001.

NOVILLO, C., CASTAÑERA, P. & ORTEGO, F. Isolation and characterization of two digestive trypsin-like proteinase from larvae of the stalk com borer, *Sesamia nonagrioides*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29(2): 177-184, 1999.

OLIVEIRA, M.G.A.; ROGANA, E.; ROSA, J.C.; REINHOLD, B.B.; ANDRADE, M.H.; GREENE, L.J. & MARES-GUIA, M. Tyrosine 151 is part of the substrate activation binding site. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(36): 26893-26903, 1993.

SWART, C.C. & FELGENHAUER, B.E. Structure and function of the mouthparts and salivary gland complex of the giant waterbug, *Belostoma lutarium* (Stål) (Hemiptera: Belostomatidae). Morphology, Histology and Fine Structure. Annals of the Entomological Society of America, 96(6): 870-882, 2003.

TERRA, W.R. & FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. Comparative Biochemistry and Physiology, 109B(1): 01-62, 1994.

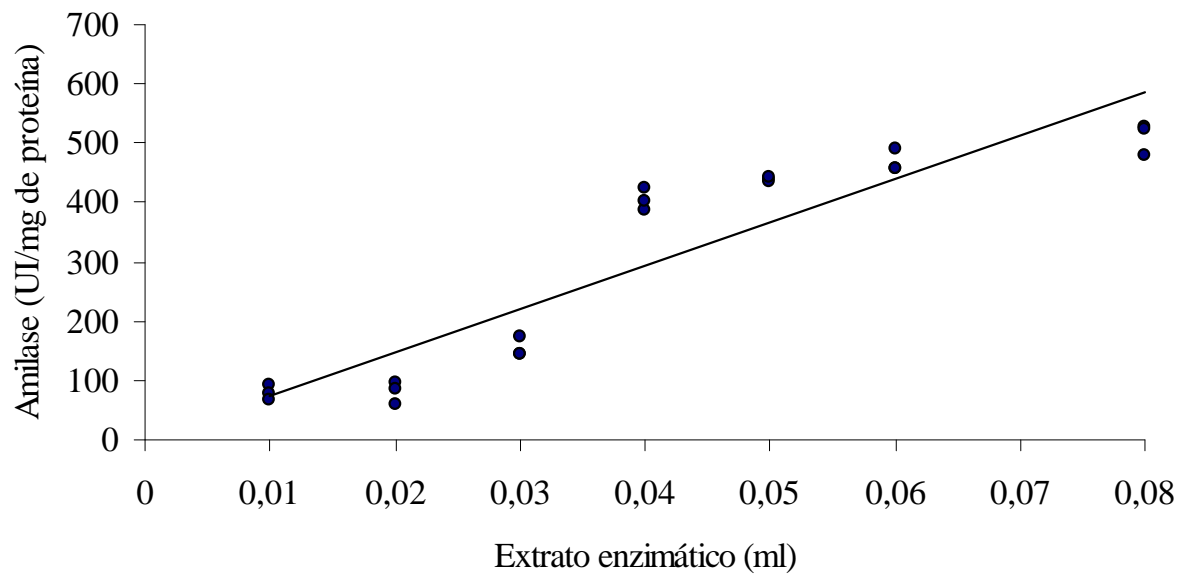
VAN LENTEREN, J.C. & WOETS, J. Biological and integrated pest control in greenhouses. Annual Review of Entomology, 33(1) : 239-269, 1990.

ZANUNCIO, J.C.; ALVES, J.B.; ZANUNCIO, T.V. & GARCIA, J.F. Hemipterous predators of eucalypt defoliator caterpillars. Forest Ecology and Management, 65(1): 65-73, 1994.

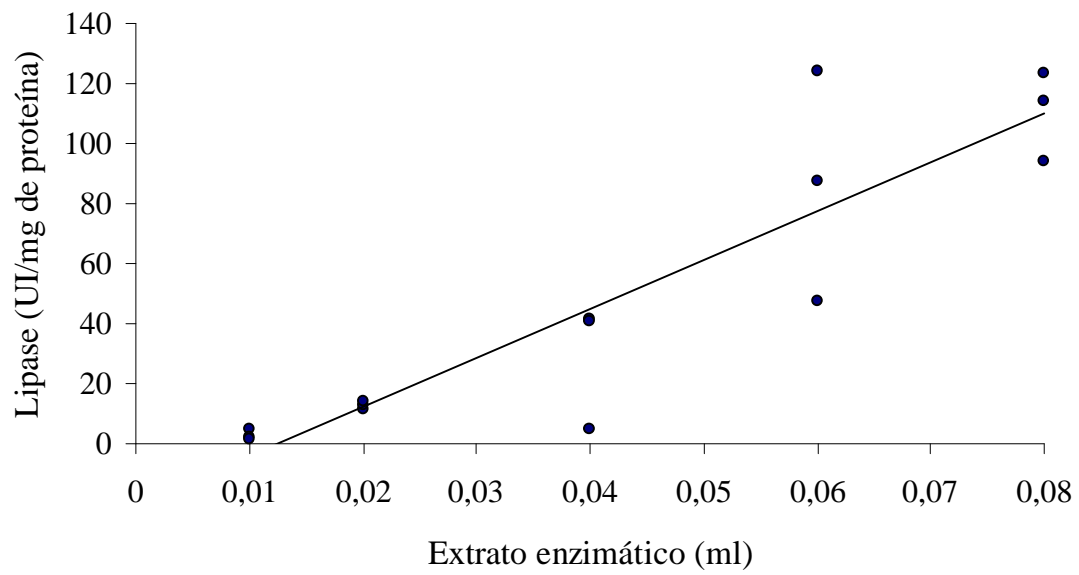
ZANUNCIO, J.C.; ZANUNCIO, T.V.; GUEDES, R.N.C. & RAMALHO, F.S. Effect of feeding on three *Eucalyptus* species on the development of *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae) fed with *Tenebrio molitor* (Col.: Tenebrionidae). Biocontrol Science and Technology, 10: 443-450, 2000.

ZENG, F. & COHEN, A.C. Comparison of alpha-amylase and protease activities of a zoophytophagous and two phytozoophagous Heteroptera. Comparative Biochemistry and Physiology, 126A(1): 101-106, 2000.

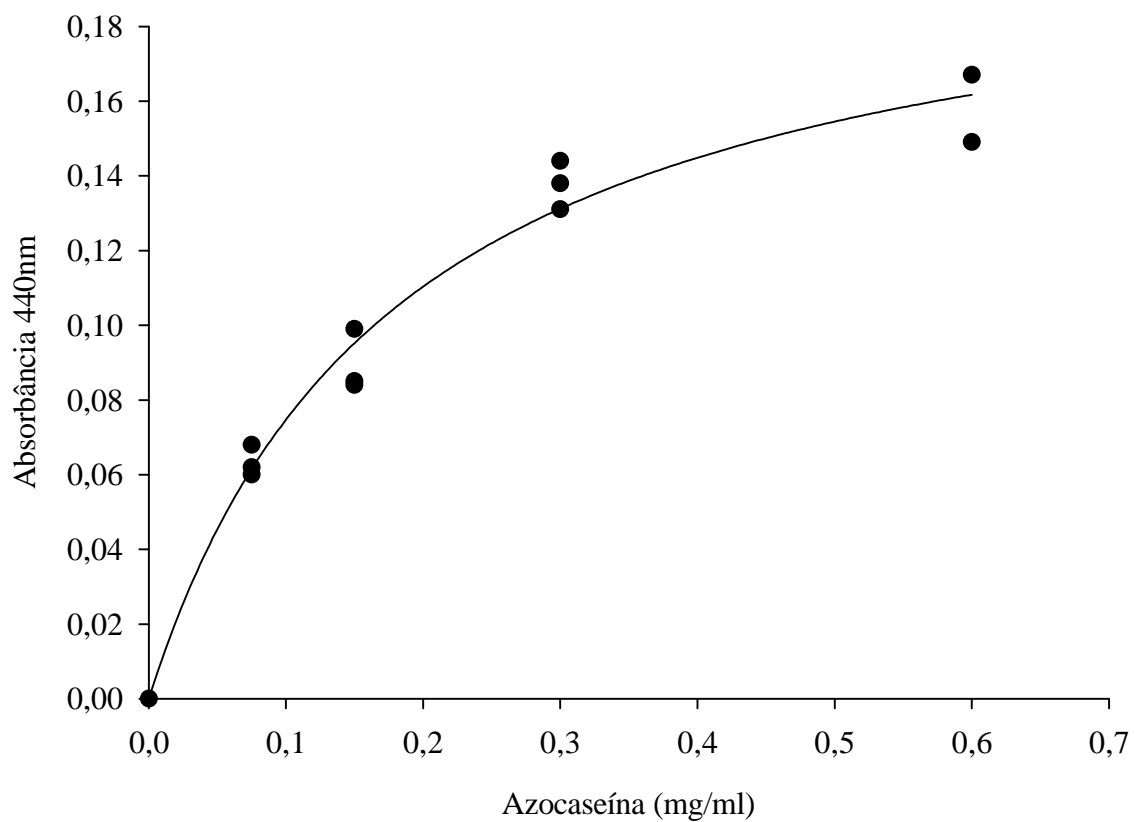
ZHU, Y.C.; ZENG, F. & OPPERT, B. Molecular cloning of trypsin-like cDNAs and comparison of proteinase activities in the salivary glands and gut of the tarnished plant bug *Lygus lineolaris* (Heteroptera: Miridae). Insect Biochemistry and Molecular Biology, 33(9): 889-899, 2003.



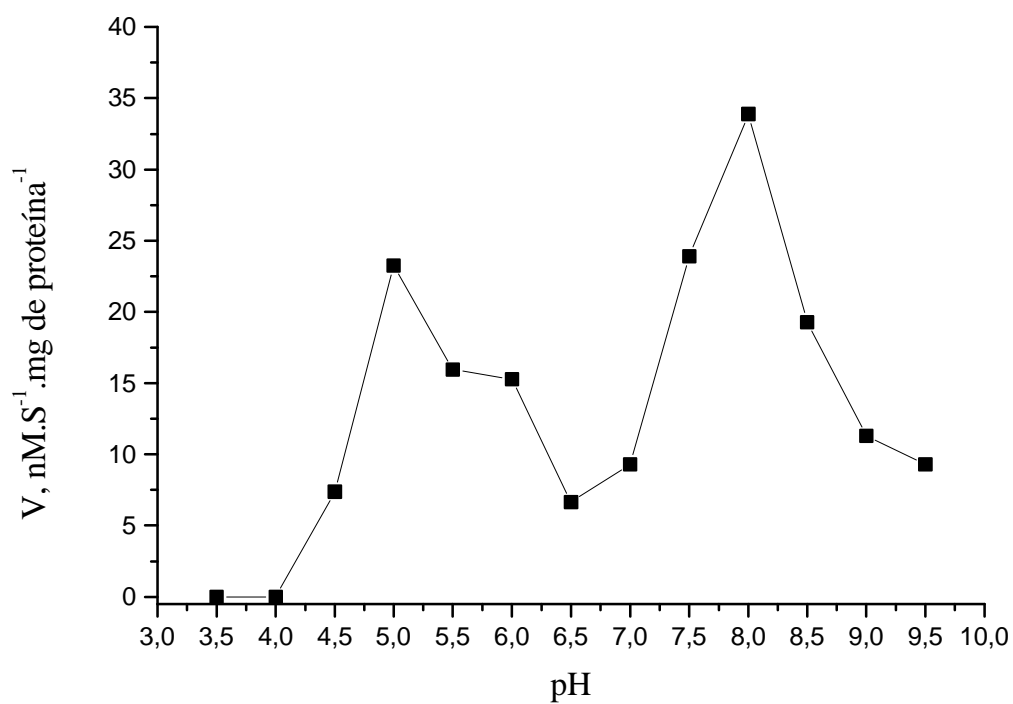
**Figura 1.** Atividade de amilase em função da quantidade de extrato de glândulas salivares de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae).



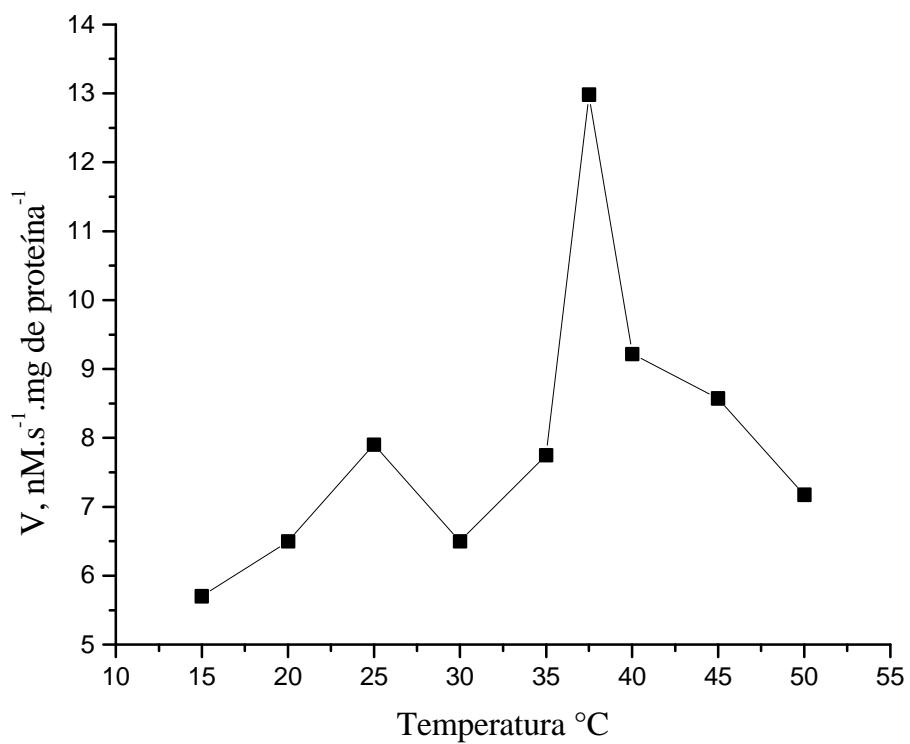
**Figura 2.** Atividade de lipase em função da quantidade de extrato de glândulas salivares de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae).



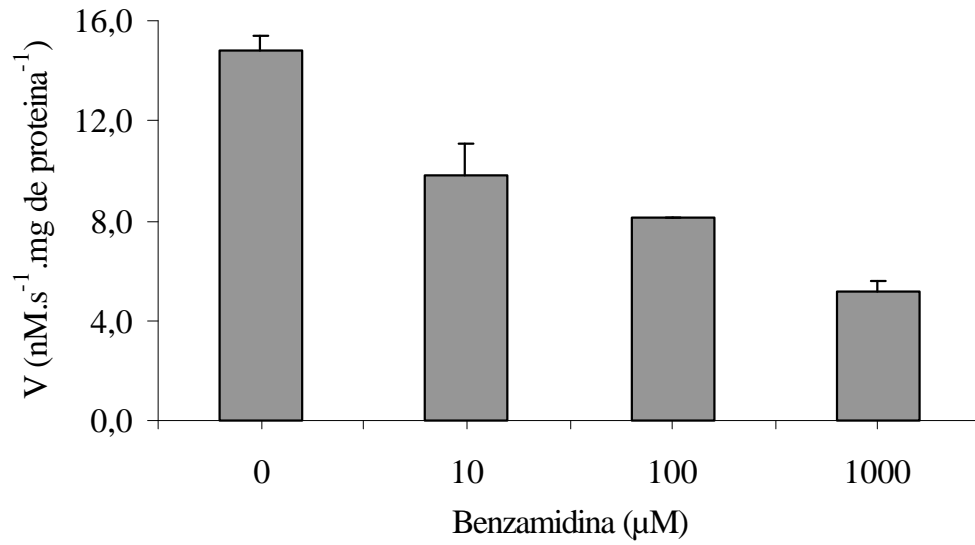
**Figura 3.** Hidrólise de azocaseína por proteases presentes em extrato de glândulas salivares de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae).



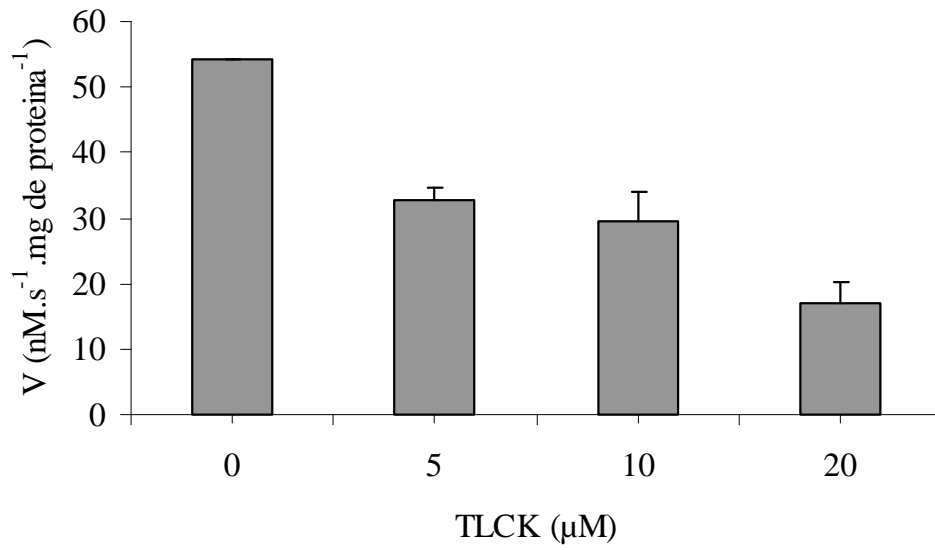
**Figura 4.** Atividade de proteases tripsina-like em extratos de glândulas salivares de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) em diferentes valores de pH.



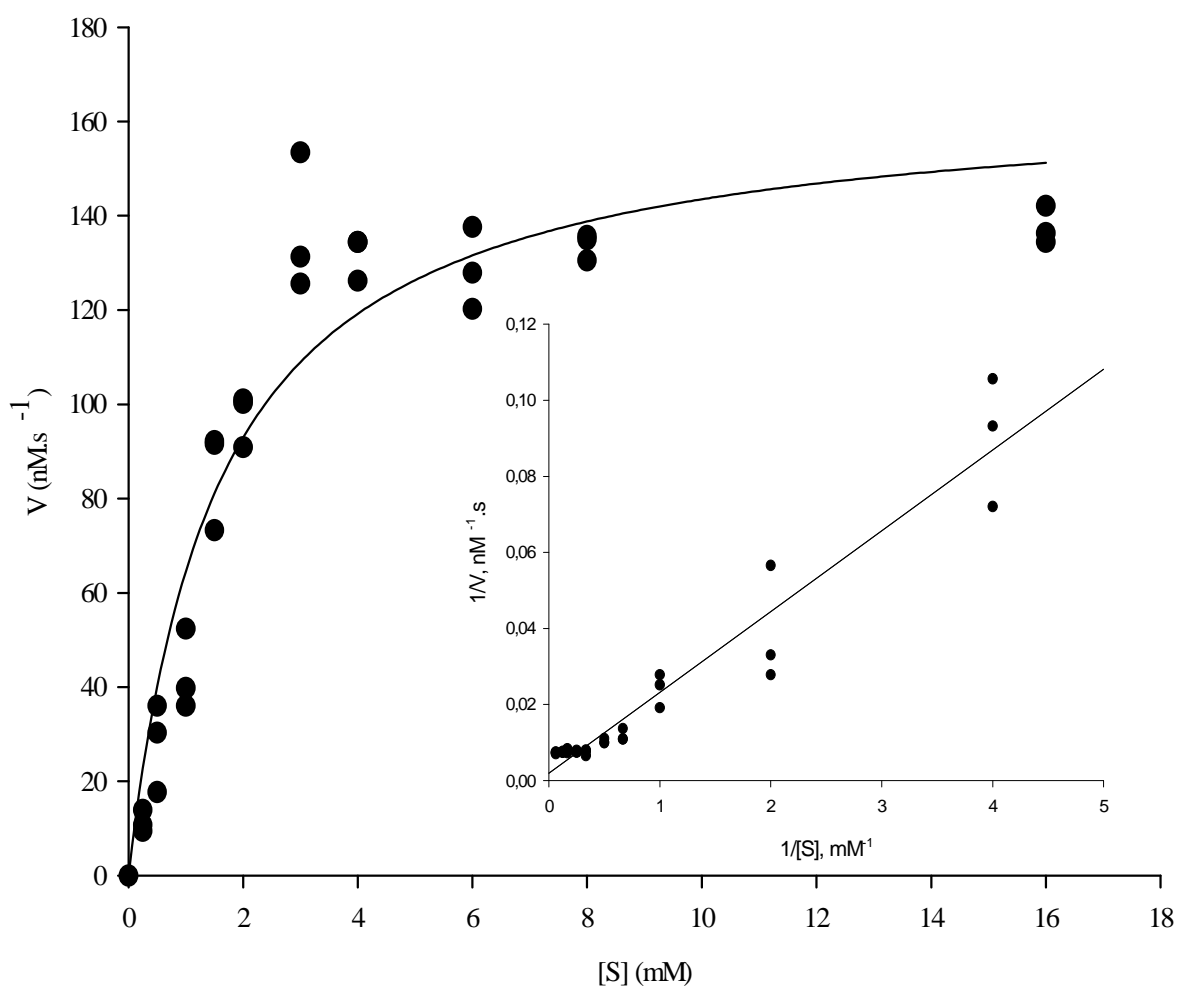
**Figura 5.** Atividade de proteases tripsina-like em extratos de glândulas salivares de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) em diferentes temperaturas.



**Figura 6.** Atividade de proteases tripsina-like em extratos de glândulas salivares de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) em diferentes concentrações do inibidor benzamidina.



**Figura 7.** Atividade de proteases tripsina-like em extratos de glândulas salivares de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) em diferentes concentrações do inibidor TLCK.



**Figura 8.** Gráfico de Michaelis – Menten da atividade da protease tripsina-like em extratos de glândula salivar de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) sobre o substrato L-BApNa. Inserção: Gráfico de Lineweaver-Burk. A linha traçada contínua foi baseada em dados teóricos, utilizando-se a equação de Michaelis – Menten para a obtenção de valores de  $K_M$  e  $V_{\text{máx}}$ , os pontos são experimentais.